



Terapêutica Genética da Insuficiência Cardíaca: a Realidade Atual, a Utopia Futura

Sílvia Filipe de Sousa Cirne Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor Manuel de Carvalho Rodrigues

junho de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Sílvia Filipe de Sousa Cirne Santos, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 39255 do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 29 / 06 / 2023

Sílvia Filipe de Sousa Cirne Santos

Dedicatória

Ao meu avô.

"Life is made of ever so many partings welded together." -Charles Dickens

Agradecimentos

Um agradecimento especial ao Professor Doutor Manuel de Carvalho Rodrigues pela orientação, por todo o apoio, pela dedicação e toda a disponibilidade demonstrados ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais o apoio incondicional constante e todas as oportunidades que deram e me conferiram a possibilidade de alcançar este sonho. Obrigada por todo o incentivo e motivação e pela confiança depositada.

À minha irmã, obrigada por ser a minha melhor amiga e a maior torcedora pelo meu sucesso. Obrigada pelo ombro amigo sempre disponível e todo o carinho.

Agradeço a todos os meus amigos que me acompanharam neste percurso por todo o incentivo, carinho e amizade, que tornaram os últimos 6 anos memoráveis.

Resumo

A insuficiência cardíaca é uma doença altamente complexa com um grande impacto na qualidade de vida dos doentes, continuando a ser a principal causa de morbidade e mortalidade a nível mundial. Em Portugal estima-se que existam mais de 400000 indivíduos afetados. Acarreta também uma elevada pressão económica e sobre o sistema de saúde.

Apesar de todos os avanços conseguidos na terapêutica convencional da insuficiência cardíaca com conseqüente redução da mortalidade, as terapêuticas farmacológicas atuais ou intervenções cirúrgicas não apresentam impacto na taxa de sobrevivência a cinco anos e podem apresentar efeitos adversos indesejados, não se mostrando, portanto, eficazes.

Atualmente, os mecanismos fisiopatológicos da insuficiência cardíaca já são bem conhecidos, tendo sido identificadas várias vias moleculares que contribuem para o desenvolvimento desta condição. Assim, a terapêutica genética é uma abordagem inovadora com elevado potencial para o tratamento da insuficiência cardíaca. O objetivo da terapêutica genética para a insuficiência cardíaca é inibir a apoptose celular, reduzir a remodelação cardíaca adversa e aumentar a contratilidade cardíaca através da transfeção de cardiomiócitos altamente eficiente.

Nas últimas décadas tem ocorrido um grande volume de investigação na área, o que permitiu que os primeiros ensaios clínicos em humanos decorressem na última década. Apesar do otimismo inicial, nenhum ensaio conseguiu cumprir os objetivos finais delineados. Contudo, a área continua em evolução com novas descobertas contínuas.

Esta monografia irá explorar o estado atual da terapêutica genética para insuficiência cardíaca, focando nos avanços mais recentes, desafios e possíveis direções futuras, incluindo tecnologias emergentes, novos alvos e estratégias para melhorar a eficiência na entrega de genes e a expressão de transgenes a longo prazo.

Palavras-chave

Insuficiência cardíaca; terapêutica genética; insuficiência cardíaca crônica; terapêutica genética da insuficiência cardíaca

Abstract

Heart failure is a highly complex disease with a significant impact on patients' quality of life, remaining the leading cause of morbidity and mortality worldwide. In Portugal, it is estimated that there are over 400,000 affected individuals. It also imposes a high economic burden and strains the healthcare system.

Despite the advancements achieved in conventional therapy for heart failure, resulting in reduced mortality, current pharmacological therapies or surgical interventions have not shown an impact on five-year survival rates and may have undesired adverse effects, thus lacking efficacy.

Currently, the pathophysiological mechanisms of heart failure are well-known, and several molecular pathways contributing to the development of this condition have been identified. Therefore, gene therapy is an innovative approach with great potential for the treatment of heart failure. The goal of gene therapy for heart failure is to inhibit cellular apoptosis, reduce adverse cardiac remodeling, and increase cardiac contractility through highly efficient transfection of cardiomyocytes.

In recent decades, a significant volume of research has been conducted in this area, leading to the initiation of the first clinical trials in humans in the last decade. Despite the initial optimism, none of these trials have successfully achieved the intended endpoints. However, the field continues to evolve with ongoing new discoveries.

This monograph will explore the current state of gene therapy for heart failure, focusing on the latest advancements, challenges, and potential future directions, including emerging technologies, new targets, and strategies to improve gene delivery efficiency and long-term transgene expression.

Keywords

Heart failure;gene therapy;chronic heart failure;gene therapy for heart failure

Índice

Dedicatória.....	v
Agradecimentos	vii
Resumo.....	ix
Abstract	xi
Índice.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Acrónimos	xvii
1. Introdução	1
1.1 Insuficiência Cardíaca.....	1
Classificação da NYHA.....	3
Opções de tratamento atuais e as suas limitações.....	4
1.2 Terapêutica genética	6
1.3 Material e Métodos	8
2. Discussão	9
2.1. Alvos da terapêutica genética da insuficiência cardíaca.....	11
SERCA2a	11
Adenilil ciclase 6 (AC6)	13
S100A1	13
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	13
Fator 1 derivado de célula estromal (SDF-1)	13
Junctofilina-2 (JP2)	14
2.2. Ensaio Clínicos	14
2.3. O futuro da terapêutica genética da insuficiência cardíaca	16
3. Conclusão.....	21
4. Bibliografia	23
5. Anexos.....	31
5.1 Anexo 1 – Sintomas e sinais típicos de insuficiência cardíaca.....	31
5.2 Anexo 2 – Causas de insuficiência cardíaca	32

5.3 Anexo 3 – vetores representativos utilizados na terapêutica genética cardíaca .. 33

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação funcional da NYHA.....	3
Tabela 2. Ensaios clínicos realizados	15

Lista de Acrônimos

β ARKct	Peptídeo c-terminal da cinase de recetor β -adrenérgico
AAV	Vírus adeno-associado
AC	Adenilil ciclase
ARNI	Recetor da angiotensina – inibidor da neprilisina
ATP	Adenosina trifosfato
BNP	Péptido natriurético cerebral
CV	Cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
FE	Fração de ejeção
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
GRK-2	Cinase de recetor acoplada à proteína G2
HbA1c	Hemoglobina glicada
I-1	Inibidor-1
IC	Insuficiência Cardíaca
ICFep	Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção preservada
ICFER	Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção reduzida
ICFRlr	Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção ligeiramente reduzida
IECA	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
IMC	Índice de massa corporal
JP2	Junctofilina-2
LVAD	Dispositivo de assistência do ventrículo esquerdo
miRNA	microRNA
MRA	Antagonista de recetores de aldosterona
mRNA	RNA mensageiro
NT-proBNP	Peptídeo natriurético N-terminal pró-B do plasma
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PLB	Fosfolamban
PP-1	Proteína fosfatase-1
RNA	Ácido ribonucleico
SDF-1	Fator 1 derivado de célula estromal

SERCA2a	<i>Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SGLT2	Cotransportador Sódio-Glicose 2
TFG	Taxa de filtração glomerular
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

1. Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica complexa progressiva em que o coração não é capaz de bombear sangue suficiente para alcançar os requisitos metabólicos dos tecidos, resultante de um enchimento ventricular ou fração de ejeção (FE) deficientes, o que por sua vez leva aos sintomas cardinais clássicos de dispneia e fadiga e sinais de IC como edema ou crepitações pulmonares (1,2).

A IC crónica (ICC) permanece a principal causa de morbidade e mortalidade a nível global, acarretando grandes encargos económicos e sociais. Embora estejam a ser feitos progressos constantes e substanciais na redução da mortalidade por IC com o uso de tratamentos convencionais, as intervenções farmacológicas e cirúrgicas inovadoras não têm sido eficazes a aumentar as taxas de sobrevivência a cinco anos(3).

A IC representa a principal causa de hospitalização em indivíduos com idade superior a 65 anos, o que atesta o impacto da síndrome nos países desenvolvidos (4).

O impacto económico desta síndrome é muito elevado e em países desenvolvidos os custos diretos da IC representam cerca de 2% do orçamento total para a saúde. Em termos globais, estima-se que o valor tenha ascendido aos 102 mil milhões de euros em 2012, numa amostra que engloba 92,4% de todos os países e 98,7% da população mundial para esse ano (5,6)

O conceito de terapêutica genética é alcançar expressão adequada do gene terapêutico transferido no órgão alvo, que começa a produzir o RNA ou proteína desejados.

Esta revisão tem como principal objetivo analisar o estado atual da terapêutica genética no tratamento da insuficiência cardíaca e perspetivar as suas aplicações futuras.

1.1 Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica altamente heterogénea e complexa caracterizada pela apresentação de sintomas cardinais como dispneia, edemas dos membros inferiores e fadiga que podem ser acompanhados por sinais como o aumento da pressão venosa jugular, crepitações pulmonares e edemas periféricos. Uma anomalia estrutural e/ou funcional do coração resulta em pressões intracardíacas elevadas e/ou débito cardíaco inadequado em repouso e/ou durante exercício (7).

Qualquer condição que leve a uma alteração estrutural ou funcional do ventrículo pode predispor um doente a desenvolver IC, sendo, por isso, a sua etiologia altamente variável. A causa mais comum é a disfunção miocárdica. Contudo, patologias valvulares, pericárdicas ou endocárdicas, bem como aberrações de ritmo ou condução podem causar ou contribuir para a IC. Em países desenvolvidos, a doença arterial coronária é a causa predominante tanto em homens como em mulheres, sendo responsável por 60-75% dos casos. A hipertensão também contribui para o desenvolvimento de IC em 75% dos doentes. É importante realçar que estas causas potenciam-se mutuamente para aumentar o risco de IC, assim como a Diabetes mellitus. Contudo em 20-30% dos casos a etiologia não pode ser definida exatamente. Infecções virais prévias ou exposição a toxinas (álcool, quimioterapia, ...) também podem levar a cardiomiopatia dilatada. Além disso, um grande número de casos de cardiomiopatia dilatada parecem estar ligados a mutações genéticas específicas, como por exemplo, no citoesqueleto. A maioria das formas de cardiomiopatia dilatada são herdadas de forma autossômica dominante, já tendo sido identificadas mutações em genes que codificam proteínas do citoesqueleto, como desmina, miosina cardíaca, ou vinculina, e proteínas da membrana nuclear, como a laminina (1,2,7,8).

O diagnóstico de IC é apoiado por pelo menos um dos seguintes elementos: níveis elevados de peptídeo natriurético (NT-proBNP \geq 125 pg/mL ou BNP \geq 35 pg/mL) e/ou evidência objetiva de congestão pulmonar cardiogénica ou sistémica em exames complementares de diagnóstico, como o ecocardiograma ou raio-x torácico (7).

De acordo com as *guidelines* mais atuais da ESC, os doentes podem ser divididos em três vastas categorias. Insuficiência Cardíaca com Fração de ejeção preservada (ICFep), se $FE \geq 50\%$ ou IC com fração de ejeção reduzida (ICFer), se $FE \leq 40\%$. Os doentes com FE compreendidas entre os 41% e os 49% são incluídos na categoria de IC com fração de ejeção ligeiramente reduzida (ICFElr). O mesmo doente pode transitar entre faixas de FE (7).

A IC também pode ocorrer como resultado de disfunção ventricular direita. Esta ocorre principalmente no contexto de hipertensão pulmonar induzida por disfunção do ventrículo esquerdo (VE) (1,2,7).

IC crónica descreve aqueles com um diagnóstico de IC estabelecido e um início gradual dos sintomas. Se a ICC sofrer deterioração, podemos descrevê-la como IC descompensada. Os sintomas também podem ter um início agudo, considerando-se, nesse caso, IC aguda.

Para o âmbito desta monografia, irei concentrar-me na ICC.

Classificação da NYHA

A classificação da New York Heart Association (NYHA) é uma classificação funcional utilizada para descrever a gravidade da IC, sendo dos mais fortes preditores independentes de prognóstico na IC (9,10).

Tabela 1. Classificação funcional da NYHA

Classe I	Sem limitação de atividade física. A atividade física normal não causa fadiga excessiva, palpitações, dispneia ou angina.
Classe II	Limitação ligeira da atividade física. Conforto em períodos de descanso, mas as atividades físicas normais causam falta de ar, cansaço ou palpitações.
Classe III	Limitações marcadas na atividade física. Conforto em períodos de descanso, mas atividade física ligeira causa falta de ar, cansaço ou palpitações.
Classe IV	Incapacidade de realizar qualquer atividade física sem desconforto; Podem estar presentes sintomas em períodos de descanso; Qualquer atividade física aumenta o desconforto.

A IC é um problema crescente a nível mundial, afetando mais de 64 milhões de pessoas e espera-se que a sua prevalência aumente com o envelhecimento populacional. Estima-se que a prevalência da IC em países desenvolvidos seja cerca de 2% da população adulta e os dados de incidência revelam que a IC afeta entre 5-10 pessoas por cada 1000, anualmente. A prevalência pode ser traduzida numa curva exponencial, aumentando com a idade, atingindo 6-10% da população com idade > 65 anos. Apesar da incidência ser maior nos homens, as mulheres compõem 50% da população afetada devido à sua maior esperança de vida (8,11).

Em Portugal, a prevalência global da ICC na população adulta foi estimada no estudo EPICA em 4,36%, atingindo os 7,63% na faixa dos 60-69 anos, atingiu 12,67% na faixa dos 70-79 anos e 16,14% acima dos 80 anos (11,12).

Um estudo realizado em 2018 tentou estimar a prevalência atual e as previsões futuras tendo por base o estudo EPICA, bem como os dados do Censo 2011 e projeções populacionais. A projeção sugere que o número de doentes com IC em Portugal continental aumentará cerca de 7% em 2018, 30% em 2035 e 33% em 2060, relativamente a 2011,

traduz-se num número absoluto de 397 805, 479 921 e 494 191 indivíduos afetados, respetivamente (11).

De acordo com o estudo EPICA, constatou-se que a ICFEp é a mais frequente, seguida da ICFEr.

Pensa-se que cerca de 50% dos doentes tenham ICFEr e 50% tenham ICFEp/ICFEIr (8,11).

Após o diagnóstico inicial de IC, os doentes são hospitalizados em média uma vez por ano. Contudo, a maioria das hospitalizações (63%) parecem não estar relacionadas com causas CV. Fibrilhação auricular, um IMC elevado, uma HbA1c aumentada, bem como uma TFG estimada reduzida são preditores para hospitalizações de IC(8,11,12).

Os doentes com ICFEp normalmente são mais velhos e frequentemente mulheres, sendo que apresentam mais frequentemente comorbilidades não-CV do que doentes com ICFEr (7,10,11).

Os fatores de risco predisponentes mais relevantes para a IC, identificados na população em geral, incluem: doença arterial coronária, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes, tabagismo e obesidade. A presença de múltiplas comorbilidades é um dos principais determinantes do prognóstico e da qualidade de vida dos doentes (7,10,11).

Opções de tratamento atuais e as suas limitações

Os objetivos principais da farmacoterapia atual são a redução da mortalidade, a prevenção de hospitalizações recorrentes e a melhoria do estado clínico, da capacidade funcional e da qualidade de vida (2,4,7,13).

Os tratamentos atuais da ICFEr passam pela modulação do sistema de renina-angiotensina-aldosterona e do sistema nervoso simpático. Para estes efeitos utilizam-se IECA, ARNI, beta-bloqueantes, ou MRA, que demonstraram melhorar a sobrevivência e reduzir os sintomas de doentes com ICFEr. É, então, recomendada a tríade terapêutica IECA/ARNI, beta-bloqueante e MRA (7).

Em doentes com ICFEr a adição à tríade terapêutica de inibidores da SGLT-2 como a Dapagliflozina e a Empagliflozina diminui o risco de hospitalização e morte (7).

Em doentes com uma classe NYHA II-IV pode ser necessária a administração de diuréticos de ansa se apresentarem sinais e/ou sintomas de congestão (2,7).

Apesar dos avanços na terapêutica farmacológica, a morbidade e mortalidade da IC continuam elevadas (4).

No caso da IC FEI ainda não existem recomendações concretas de tratamento farmacológico para além da administração de diuréticos de ansa para aliviar sintomas congestivos, uma vez que não existem estudos suficientes que contemplem este subgrupo. Poderá, no entanto, ser considerada a mesma terapêutica da IC FE (1,7).

Até agora nenhuma terapêutica farmacológica demonstrou resultados na redução da mortalidade e morbidade de doentes com IC FE. Em doentes com IC FE estão recomendados o rastreio e tratamento de etiologias e comorbilidades CV e não-CV. O sacubitril/valsartan e a espironolactona poderão diminuir as hospitalizações neste subgrupo (1,7,14,15).

Tratamentos não farmacológicos podem incluir dispositivos cardíacos como dispositivos de assistência do ventrículo esquerdo (LVAD) ou intervenções cirúrgicas (16,17).

Em doentes com IC muito avançada ou refratária a terapêutica médica, o único tratamento poderá ser o transplante cardíaco (7,17).

A terapêutica farmacológica da IC parece ter atingido um plateau que dificilmente conseguirá ser superado num futuro próximo (16,18,19).

Apesar do prognóstico ter melhorado consideravelmente nas últimas décadas, continua desfavorável e a qualidade de vida dos doentes também está marcadamente afetada. O prognóstico tende a ser melhor na IC FE ou IC FEI e também em mulheres.

O prognóstico da IC sintomática é reservado, mesmo com avanços recentes na terapêutica. Estudos na comunidade indicam que 30-40% dos doentes morrem dentro de um ano desde o diagnóstico e 50-70% morrem dentro de 5 anos (1,7,8).

1.2 Terapêutica genética

A terapêutica genética é uma abordagem terapêutica que utiliza a entrega de material genético nas células de um paciente para corrigir ou modificar um gene específico que está a causar uma doença ou disfunção. O objetivo da terapêutica genética é tratar ou prevenir doenças, abordando os fatores genéticos subjacentes que contribuem para a condição (20). Existem vários componentes-chave envolvidos na terapêutica genética:

Entrega de Gene: Material genético, como DNA ou RNA, é introduzido nas células do paciente para entregar o gene terapêutico. Isso pode ser realizado utilizando vetores, que são geralmente vírus modificados para transportar o material genético desejado. Os vetores virais atuam como veículos de entrega, transferindo o gene terapêutico para as células-alvo (21,22).

Genes Terapêuticos: O material genético introduzido contém os genes terapêuticos com a intenção de corrigir ou modificar os genes defeituosos ou disfuncionais associados à doença. Esses genes terapêuticos podem substituir um gene defeituoso, introduzir um novo gene ou modificar a expressão de genes existentes. Os genes específicos visados dependem da doença a ser tratada (20,23–25).

Técnicas de Edição Genética: Além da entrega de gene, técnicas de edição genética podem ser utilizadas na terapêutica genética para modificar diretamente o genoma do paciente. A ferramenta de edição genética mais comumente utilizada é o CRISPR-Cas9, que pode editar precisamente seções específicas de DNA. A edição genética permite modificações precisas, como a correção de mutações que causam doenças ou a remoção de genes prejudiciais (20,26).

Células-Alvo: A terapêutica genética pode visar diferentes tipos de células, dependendo da doença em tratamento. Por exemplo, pode direcionar células no tecido afetado, como células musculares cardíacas no caso de doenças cardíacas, ou células do sistema imunológico para aprimorar sua função em imunoterapia. A seleção de células-alvo depende da doença específica e do resultado terapêutico desejado (20,27).

Objetivos do Tratamento: A terapêutica genética visa abordar a causa genética subjacente de uma doença e alcançar benefícios terapêuticos. Esses objetivos podem variar dependendo da doença, mas podem incluir a restauração da função normal do gene, a

substituição de genes ausentes ou defeituosos, o aprimoramento de funções celulares ou a modulação da expressão genética para obter o efeito terapêutico desejado (20).

Os vetores mais utilizados são os plasmídeos, os adenovírus com um perfil de expressão curto e vírus adeno-associados (AAV), lentivírus e retrovírus que são adequados à expressão prolongada dos genes terapêuticos. Os vetores utilizados na terapêutica genética devem ter bons perfis de segurança, causando o menor número de efeitos adversos possível (20,21,28,29).

Os plasmídeos e adenovírus proporcionam expressão transgênica apenas a curto prazo, enquanto AAVs conseguem aumentar os níveis de transgenes terapêuticos até um ano. Os AAVs também podem ter afinidade para tecidos específicos, e já foram identificados vários serotipos cardíacos, como o AAV1, AAV8 e AAV9. Contudo a presença de anticorpos neutralizantes no indivíduo pode limitar o efeito terapêutico pretendido (20,21,26,27).

A primeira terapêutica genética aprovada no mundo ocidental em 2012 foi desenvolvida para a deficiência de lipoproteína lípase, uma doença autossômica recessiva rara devido a uma mutação no gene LPL que causa níveis plasmáticos de triglicéridos elevados. Desde então já foi também aprovada uma TG para a distrofia retiniana hereditária (20,30).

Como referido anteriormente, os tratamentos disponíveis atualmente ficam aquém das necessidades demonstradas pelos doentes. Há, então, necessidade de descobrir e desenvolver estratégias terapêuticas novas e melhoradas. Assim, a terapêutica genética pode ser uma solução para o tratamento da IC que leve a uma melhoria da qualidade de vida do doente e a uma diminuição da mortalidade.

1.3 Material e Métodos

A realização desta monografia teve por base a pesquisa de artigos nas bases de dados *Pubmed* e *ScienceDirect*, sendo que o último acesso às mesmas ocorreu em junho de 2023. Para a pesquisa utilizou-se combinações das seguintes palavras-chave, em inglês: “*Heart failure, gene therapy, treatment, management, epidemiology*”.

Os artigos selecionados foram restringidos a apenas dois idiomas: português e inglês. As publicações foram selecionadas de acordo com a relevância do seu conteúdo e foi dada preferência a publicações posteriores a 2018, com vista a refletir a informação mais atual, embora tenham sido utilizadas publicações anteriores para contextualização de conceitos.

A pesquisa foi completada com consulta de documentos de entidades científicas, como por exemplo da *American Heart Association*, e da *European Society of Cardiology*.

Consideraram-se ensaios clínicos, estudos observacionais, revisões sistemáticas e meta-análises.

2. Discussão

A ideia da terapêutica genética para a IC é que genes exógenos (transgenes) produzam proteínas que permitam colmatar deficiências patológicas ou contrariar processos moleculares prejudiciais que condicionam as alterações inerentes à IC.

A IC pode resultar de uma cardiopatia hereditária, de efeitos cumulativos de múltiplas variantes em diversos genes ou de doenças subjacentes, como a hipertensão ou diabetes mellitus (7).

A história da terapêutica genética cardíaca começou com o estudo publicado por Leiden et al. em 1990. Os autores transfetaram cardiomiócitos de ratos, *in vivo*, ao injetar DNA plasmídico contendo o gene da β -galactosidase diretamente na parede do VE, sendo que foi encontrada atividade no miocárdio da β -galactosidase até 4 semanas após a transferência. Desde então que a área da TG CV tem visto grande investigação com os primeiros ensaios clínicos a surgirem na última década (19,31).

A patofisiologia e os mecanismos moleculares da IC são bem conhecidos de momento. Contudo, os tratamentos farmacológicos disponíveis demonstram uma eficácia muito limitada. A TG foi então proposta como alternativa. Ao fim de largos anos de investigação, o primeiro ensaio clínico a chegar à fase 2 e a testar a transmissão genética da ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático, o CUPID2, não proporcionou resultados encorajadores. Contudo, existem mais ensaios em curso, onde vetores virais mais eficientes e novos alvos potenciais estão a ser estudados (19).

Atualmente, os estudos de terapêutica genética focam-se em abordar, por exemplo, anormalidades nas trocas de cálcio, sinalização beta-adrenérgica e regeneração cardíaca, utilizando, por exemplo RNAs não codificantes, a regulação da tradução de mRNA ou células estaminais pluripotentes. O objetivo principal destas terapêuticas é melhorar a contratilidade do miocárdio, induzir angiogénese ou a citoproteção (28).

A regulação atípica do cálcio nos cardiomiócitos é um fator essencial da IC, e a diminuição da atividade da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) afeta a função cardíaca sistólica e diastólica normais pela regulação anormal do cálcio. A SERCA2a permite o relaxamento cardíaco ao sequestrar cálcio no retículo sarcoplasmático. Assim, muitos dos genes alvos estudados são reguladores da SERCA2a. A proteína S100A1, que se liga ao cálcio, é encontrada nos cardiomiócitos e controla vias relacionadas com o cálcio,

resultando em alterações da contratilidade cardíaca e homeostasia da energia. A S100A1 aumenta a atividade da SERCA2a e ao mesmo tempo coordena o fornecimento de energia à célula ao aumentar a produção mitocondrial de ATP. O aumento da expressão de S100A1 demonstrou melhorar a função cardíaca sem evidência de aumento da incidência de arritmias. O fosfolamban (PLB) é um péptido que regula o manuseamento de cálcio nos cardiomiócitos através da regulação da SERCA2a. A fosforilação do PLB interrompe a sua inibição na SERCA2a. Desta forma uma inibição parcial do PLB poderá melhorar a função cardíaca. De notar que pessoas que sofrem de depleção total de PLB tendem a sofrer de cardiomiopatia dilatada. A proteína fosfatase-1 (PP-1) apresenta níveis aumentados na IC e o seu inibidor, inibidor-1 (I-1) níveis diminuídos. Ela é responsável pela desfosforilação de múltiplos substratos e pela monitorização de vários processos biológicos, como a contração muscular e a sobrevivência celular. Assim, esta dupla poderá ser um alvo, uma vez que a PP-1 desfosforila o PLB e o I-1 promove a fosforilação do PLB, aumentando a atividade da SERCA2a. Os pequenos modificadores relacionados à ubiquitina (SUMO-1) preservam e estabilizam os níveis de SERCA2a, melhorando, assim, a função cardíaca (28).

Outra característica da IC é a disfunção do recetor β -adrenérgico. A cinase de recetor acoplada à proteína G2 (GRK-2) interfere no sistema β -adrenérgico, levando à perda da reserva contrátil e à insuficiência cardíaca. O peptídeo c-terminal da cinase de recetor β -adrenérgico (β ARKct) inibe a GRK-2. Assim, o β ARKct melhora o desempenho cardíaco e retarda a progressão da ICC por meio da inibição da GRK-2, podendo ser um alvo terapêutico que já demonstrou resultados positivos em modelos animais (3,28,32).

O 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) é um segundo mensageiro da via do recetor β -adrenérgico, regulando muitas respostas celulares e funções intracelulares. Os níveis de cAMP diminuem no coração em falência. A manipulação da sinalização dependente de cAMP por meio da transferência genética aumenta a função cardíaca, mas tem consequências indesejáveis a longo prazo na frequência cardíaca e na homeostase energética, permanecendo uma abordagem controversa na TG para a IC (28).

A adenilil ciclase (AC) é uma enzima vital para a síntese de cAMP. A AC6 é uma isoforma cardíaca de AC, ativada pelo β 1AR. Com a dessensibilização do recetor β -adrenérgico, a expressão da AC6 também diminui em miócitos em falência. A exclusão da AC6 reduz a fosforilação de PLB e a atividade de SERCA2a e leva a distúrbios no manuseio de cálcio. A sobreexpressão de AC leva ao aumento dos níveis de cAMP, contornando o sistema β -adrenérgico disfuncional. A sobreexpressão de AC6 aumenta a fosforilação de PLB, alivia a

inibição de SERCA2a e aumenta a captação e armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático em cardiomiócitos, resultando no aumento da contratilidade do VE, melhoria da função cardíaca e sobrevivência (28).

2.1. Alvos da terapêutica genética da insuficiência cardíaca

SERCA2a

Desde a década de 90, vários grupos de investigação concluíram que a SERCA2a está diminuída na IC.

A SERCA2a é uma bomba importante para a homeostasia citosólica do cálcio nos cardiomiócitos. Trabalha em coordenação com os canais de rianodina e permutadores Na^+/Ca^{2+} , removendo Ca^{2+} do citosol durante a repolarização/relaxamento dos ventrículos. A atividade da SERCA2a é modulada pela proteína membrana PLB. Existe evidência que a SERCA2a está infra-regulada em corações com IC, levando a que haja uma menor reabsorção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático durante a diástole e, portanto, uma capacidade de relaxamento diminuída. Por outro lado, a capacidade de contratilidade também fica afetada (19).

Este alvo foi o primeiro a ser testado em contexto de ensaio clínico, com o estudo CUPID (*Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease*) (33).

O Vetor escolhido para transportar os transgenes SERCA2a foi o serotipo I do AAV. O ensaio CUPID2 testou a administração de SERCA2a pelo AAV1 em doentes com ICC ou cardiomiopatias não-isquémicas. Apesar das fases iniciais terem demonstrado um bom perfil de segurança e alguns efeitos benéficos, a fase 2b final do CUPID não foi bem-sucedida, pois, apesar de positivos, o CUPID2 não conseguiu atingir nenhum dos objetivos finais delineados. O vetor AAV1 foi administrado numa infusão intracoronária única. A fase 2b envolveu 250 doentes distribuídos por um grupo de estudo e um grupo placebo. O tratamento com AAV2/SERCA2a não prolongou o tempo até ao primeiro evento terminal e não teve efeitos em nenhum dos objetivos como a classe funcional NYHA, o teste de distância percorrida em 6 minutos ou nos níveis de NT-proBNP, quando comparado com o grupo placebo. Estes resultados podem-se dever à população selecionada ou aos objetivos traçados. Além disso, a absorção do vetor AAV foi cerca de 1000 vezes inferior no miocárdio

do que nos modelos animais (19,33). Desta forma, ainda poderá ser melhorada a eficiência da transdução.

Os ensaios clínicos AGENT-HF, centrado em doentes com IC congestiva e SERCA-LVAD, centrado em doentes portadores de um LVAD, subsequentes ao CUPID2 e baseados na mesma tecnologia, foram interrompidos prematuramente após os resultados neutros do CUPID2 (34,35). Os resultados publicados por ambos os ensaios não demonstraram melhorias nem cumpriram os objetivos delineados, contudo estes resultados não têm qualquer significância estatística devido ao tamanho extremamente reduzido da população estudada.

Existem esforços para modificar o AAV para ter maior tropismo pelo miocárdio. Destes resultaram o clone genético da cápside M41, que demonstrou uma eficiência de transdução dez vezes maior no coração do que no fígado; o BNP116 é um vetor sintético com afinidade muscular 2-3 vezes maior do que no fígado (19).

Aparentemente, a eficiência de transferência de genes em grande parte dos ensaios clínicos CV anteriores tem sido muito baixa para alcançar efeitos clínicos significativos. Geralmente, em modelos animais pré-clínicos, foram utilizadas doses por quilograma de vetores de transferência de genes muito mais elevadas do que as possíveis de alcançar em ensaios clínicos em humanos (27). Os métodos de entrega intra-arterial parecem ser muito menos eficientes do que as injeções intramiocárdicas ou intramusculares. Consequentemente, é provável que a concentração de genes terapêuticos nos tecidos-alvo não tenha atingido níveis suficientes e/ou não tenha persistido tempo suficiente para alcançar efeitos. Proteínas terapêuticas secretadas têm maior probabilidade de produzir efeitos positivos, pois atualmente é muito difícil alcançar eficiência de transdução superior a 10%-20% no coração humano ou músculos periféricos. Fatores como volume por injeção e propriedades de ligação à matriz dos vetores e transgenes afetam a distribuição dos produtos de transgene nos tecidos tratados (36).

A deleção de exões é também um método alternativo baseado no sistema de *splicing* do RNA. Ao remover um exão que se encontra perto da mutação detetada, é possível corrigir a sequência de leitura, de onde pode originar uma proteína parcialmente funcional. Esta técnica pode ser manipulada ao administrar oligonucleótidos *antisense* que têm como objetivo sequências específicas em exões (28).

Adenilil ciclase 6 (AC6)

Como já foi referido anteriormente, a AC6 cataliza a conversão de ATP em cAMP. O cAMP é produzido em resposta à estimulação β -adrenérgica pelas catecolaminas e modula a excitação-contração cardíaca levando a efeitos inotrópicos positivos. Estudos realizados em modelos suínos melhoraram a função cardíaca e reverteram a remodelação patológica do VE. Em roedores, a sua sobreexpressão prolongou a vida de ratos com cardiomiopatia genética e reduziu arritmias. Um ensaio clínico de fase 2 com doentes com ICFe, mostrou melhorias na função do VE quando comparada à terapêutica farmacológica convencional (19,32,37).

S100A1

A S100A1 é uma proteína que modula o ciclo do cálcio no retículo sarcoplasmático e a função mitocondrial. Ela exerce efeitos anti-hipertróficos, inotrópicos e antiarrítmicos e atenua o esgotamento de energia na IC. A S100A1 encontra-se significativamente reduzida em modelos animais de IC, bem como em humanos, sendo, portanto, um potencial alvo para a TG. Um estudo testou a administração de AAV9-S100A1 num modelo animal suíno que conseguiu restabelecer as trocas de cálcio nos cardiomiócitos e no retículo sarcoplasmático e homeostasia energética do miocárdio (19,38).

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O VEGF-B poderá ser também um alvo para a terapêutica genética da IC. Foi testada a administração de VEGF-B através do vetor AAV9 em modelos animais com resultados benéficos, como o atraso no início de descompensação cardíaca e oposição ao desenvolvimento de apoptose. Também esta a ser estudado o VEGF-D. O estudo demonstrou boa eficácia de transferência do gene e conseguiu induzir angiogénese e proliferação de vasos linfáticos, melhorando a função cardíaca (19,39,40).

Fator 1 derivado de célula estromal (SDF-1)

O SDF-1 é uma citocina que não tem efeitos diretos na função cardíaca, mas estimula processos de reparação endógenos, incluindo a angiogénese. O SDF-1 mostrou afetar a fixação das células estaminais, a sobrevivência dos cardiomiócitos e a remodelação ventricular em modelos animais de ICC. Existe também evidência que sugere que o SDF-1

é suficiente para induzir reparação cardíaca. Num primeiro ensaio clínico foram submetidos a terapêutica com SDF-1, administrada através de plasmídeo numa abordagem transendocárdica direta, 17 indivíduos com cardiomiopatia isquémica (19,41).

Este ensaio obteve resultados positivos que levaram a um ensaio de fase 2, STOP-HF, que incluiu 93 indivíduos com ICFEr de etiologia isquémica. A terapêutica foi administrada em várias injeções endomiocárdicas utilizando um cateter. O objetivo final principal definido foi a distância a pé percorrida em seis minutos ao fim de quatro meses, mas o estudo não cumpriu este objetivo. Aqui também a eficiência de transferência de genes foi demasiado baixa para atingir objetivos mensuráveis. Contudo, neste estudo os indivíduos com as menores FE, que receberam as doses mais altas de SDF-1, mostraram resultados positivos, podendo então ser a potencial população alvo (19,42). O estudo RETRO-HF irá testar um plasmídeo semelhante, utilizando uma técnica de entrega retrógrada, mas ainda não divulgou resultados (28,43,44).

Junctofilina-2 (JP2)

Um estudo publicado em 2022 descobriu um novo mecanismo em que a JP2, um componente essencial da excitação-contração do coração, é clivada e liberta um fragmento N-terminal (JP2NT) que se transloca no núcleo e funciona como um repressor transcricional de genes relacionados com IC. Estudaram então a administração de vetores AAV2/9 com JP2NT em ratos. Os resultados demonstraram que a abordagem foi eficaz a atrasar a progressão de IC e houve uma reversão da transcrição de genes relacionados com a IC (45).

2.2. Ensaio Clínicos

Na última década decorreram vários ensaios clínicos em humanos que testaram várias abordagens de TG para a IC. Na tabela seguinte encontra-se um resumo dos ensaios que já se encontram concluídos ou que foram cancelados prematuramente.

Tabela 2. Ensaios clínicos realizados

ENSAIO	VETOR	GENE	FASE, n	OBJETIVOS	RESULTADO
CUPID-2	AAV1	SERCA2a	Fase I Ib, 243	Tempo para eventos CV recorrentes	Negativo
SERCA-LVAD	AAV1	SERCA2a	Fase II, 5	Segurança e viabilidade	Cancelado
AGENT-HF	AAV1	SERCA2a	Fase II, 9	Alterações no volume telessistólico	Cancelado
STOP-HF	Plasmídeo	SDF-1	Fase II, 93	Distância percorrida em 6 minutos	Negativo, mas demonstrou segurança
RETRO-HF	Plasmídeo	SDF-1	Fase I/II, 72	Distância percorrida em 6 minutos	-
AC6	Adenovírus 5	AC6	Fase II, 56	Duração de exercício, alterações à FE	Aumentou a função do VE quando comparado à terapêutica convencional
FLOURISH	Adenovírus 5	AC6	Fase III, 0	Hospitalização devido a IC até 12 meses	Cancelado

Além dos ensaios já concluídos, de momento estão a decorrer vários ensaios na área. O ensaio HF-REVERT é um ensaio de fase II com 280 participantes, que está a estudar o impacto da administração mensal de CDR132L, um oligonucleótido sintético que inibe o microRNA-132-3p nos cardiomiócitos, afetando a expressão de genes envolvidos na remodelação cardíaca adversa. O miRNA-132 afeta diversas vias patológicas na IC e a sua inibição pelo CDR132L demonstrou melhorar a função cardíaca e reduzir a remodelação cardíaca adversa, fibrose e hipertrofia em modelos suínos (46,47).

O NAN-CS101 é um ensaio de fase I com 12 participantes com IC classe NYHA III em que é administrado o NAN-101, composto pelo transgene I-1 com o vetor BNP116 (48). A inibição da proteína fosfatase-1 através da sobreexpressão do I-1 demonstrou reverter a disfunção cardíaca, melhorando a FEVE num modelo suíno (49).

O GenePHIT é um ensaio de fase II com 150 participantes com IC classe NYHA III que também irá investigar o impacto da administração intracoronária de NAN101 (50).

O MUSIC-HFrEF1/CUPID-3 é um ensaio fase I/II com 56 participantes com ICFe classe III/IV que irá avaliar a eficácia do AAV1/SERCA2a (51).

2.3. O futuro da terapêutica genética da insuficiência cardíaca

A terapêutica genética pode promover a regeneração cardíaca. O objetivo é impedir a evolução da remodelação patológica que ocorre pós-isquémia ao substituir áreas de miocárdio morto com miocárdio funcional e vascularizado. A principal estratégia que foi proposta foi a transplantação de células estaminais pluripotentes, como mioblastos originários de músculo estriado ou células estaminais progenitoras cardíacas ou não cardíacas, que se diferenciam em cardiomiócitos ou outras linhas celulares maduras .

Outra abordagem pode ser a estimulação da proliferação de tecido viável sobrevivente. Apesar dos cardiomiócitos apresentarem uma capacidade de regeneração muito baixa, existem estudos efetuados em vários laboratórios que demonstraram que a sobreexpressão de vários reguladores do ciclo celular podem levar à proliferação endógena de cardiomiócitos, tornado, por isso esta, uma hipótese realista.

A abordagem seletiva dos sinais intracelulares envolvidos nestes processos poderá ser uma nova estratégia para a TG da IC (19).

Por exemplo, a sobreexpressão transgênica da ciclina A2, que está normalmente silenciada nos coração pós-natal, estimulou a proliferação de cardiomiócitos, tendo sido benéfica após enfarte miocárdico. A sobreexpressão forçada da cinase 2 dependente da ciclina também causou um aumento nos antigénios nucleares associados à replicação de DNA em corações de ratos transgênicos, seguido de um aumento transitório da proliferação de cardiomiócitos e ao aparecimento de cardiomiócitos mononucleares menos diferenciados. A sobreexpressão de ciclinas G1 também demonstrou síntese de DNA, embora com padrões anormais de multinucleação. A sobreexpressão de ciclina D2 induziu crescimento regenerativo e regressão do enfarte.

Por outro lado, foi reportado que a deleção do fator de transcrição Meis1, um regulador do desenvolvimento cardíaco normal, foi suficiente para reativar a mitose de cardiomiócitos no coração adulto, sem efeitos adversos na função cardíaca. O Tbx20, um gene necessário para a proliferação dos cardiomiócitos durante o desenvolvimento cardíaco, pode atuar como um repressor transcricional do Mes1. Assim, a sobreexpressão de Tbx20 aumentou a proliferação de cardiomiócitos e preservou a função cardíaca após um enfarte do miocárdio em ratos adultos (19).

Nas últimas décadas aprendemos que cadeias de RNA não codificantes podem ter impacto e contribuir para a homeostasia celular e para a patogénese de doenças. Tem sido feita investigação em que medida estas moléculas contribuem para IC ou poderão ser utilizadas como biomarcadores (52).

Uma direção alternativa de pesquisa tem-se concentrado no papel dos miRNAs na proliferação das células cardíacas. Os miRNAs funcionam como interruptores que coordenam a expressão de vários genes. São cadeias de RNA não codificante de 18-25 nucleótidos que regulam moléculas de mRNA (28,53,54). Foi constatado em roedores que a administração de antagonistas da família de microRNAs-15 estava associada a um maior número de cardiomiócitos mitóticos no período pós-natal. Este estudo sugeriu a possibilidade de que os microRNAs, importantes moduladores da tradução do mRNA, possam ser direcionados para obter regeneração cardíaca. Investigações subsequentes identificaram a via Hippo como alvo dos miRNAs pró-regenerativos. A via Hippo é uma cascata de cinases que controla o tamanho dos órgãos em organismos mamíferos, regulando o tamanho das células, a proliferação, a apoptose, a sobrevivência, a diferenciação e a migração em órgãos em desenvolvimento. Essa via de sinalização, que impede a proliferação de cardiomiócitos adultos e a regeneração pós-natal, está aumentada na IC humana.

Recentemente, a via Hippo foi "desligada" pela deleção do *Salv* num modelo de roedores com IC isquêmica. Os cardiomiócitos com deficiência de Hippo apresentaram aumento da expressão de genes pró-proliferativos e de resposta ao stress, como o gene de controlo da qualidade mitocondrial *Park2*. Os roedores tratados apresentaram redução da fibrose e melhor recuperação da função cardíaca (19).

Novos alvos terapêuticos com potencial curativo estão continuamente a ser descobertos. A complexidade da síndrome significa que os potenciais alvos são abundantes e poderão ser diferentes em doentes diferentes (24).

É de notar que, apesar de frequentemente a IC ser causada por doença coronária avançada, os genes terapêuticos utilizados para a IC têm sido muito diferentes dos utilizados na investigação da TG da doença coronária e isquemia miocárdica. A combinação com terapêuticas angiogénicas de curta duração poderá equilibrar o metabolismo cardíaco alterado e a microcirculação na IC. O VEGF-B já demonstrou vários efeitos úteis, como atividade cardíaca específica angiogénica e melhoria no metabolismo energético cardíaco (36).

Com métodos de entrega de genes aprimorados e vetores mais eficientes, juntamente com estratégias transgênicas de intervenção alinhadas para uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença e a descoberta de novos alvos, poderão ser testadas novas abordagens que irão promover o progresso da área.

No que toca a vetores ainda é necessário mais desenvolvimento na área para melhorar a eficácia de transdução e minimizar os efeitos adversos. A modificação dos vetores existentes pode ser feita através da modificação de promotores, minimização da proporção de vetores vazios e alteração das propriedades da cápside.

Recentemente, a transferência de ácidos nucleicos com nanopartículas degradáveis lentamente e exossomas têm-se mostrado abordagens terapêuticas promissoras, e estão a ser desenvolvidos novos genes de tratamento, como o *S100A1*, e vetores com melhor tropismo cardíaco para a terapêutica da IC (22).

Os doentes incluídos nos ensaios clínicos realizados até agora sofrem de IC grave nos últimos estadios com diversas comorbilidades, sendo a sua capacidade regenerativa muito inferior à dos modelos animais utilizados (28) Assim, também deverá ser explorada a hipótese de aplicar esta terapêutica em fenótipos de doentes diferentes e não, apenas

naqueles em que todos os outros tratamentos já falharam e este é o último recurso, uma vez que estes doentes podem não ter a capacidade de reagir à terapêutica. É provável que apenas alguns subgrupos de doentes respondam à terapêutica genética (40). Por outro lado, estão a ser investigados biomarcadores que podem assistir na seleção de doentes (55).

Os objetos finais utilizados tradicionalmente, como a sobrevivência ou a tolerância ao exercício, talvez sejam demasiado exigentes nos doentes gravemente afetados. Existe uma necessidade clara de desenvolver objetivos finais validados para os substituir, baseados na presença de fluxo colateral, melhoria metabólica ou redução de utilização de serviços hospitalares que pudessem captar melhor os benefícios terapêuticos potenciais (36).

Os métodos de administração da TG também poderão ser modificados e melhorados. A infusão retrógrada no seio coronário poderá levar a uma transdução mais alargada do que a infusão intracoronária ou injeção intramiocárdica (28). Outro método promissor é o MCARD, que é um circuito recirculante fechado que limita a exposição sistémica, aumentando a exposição do miocárdio ao agente.

Por outro lado, deve-se avaliar se pode haver várias administrações, porque muitas doenças CV crónicas tendem a progredir, sendo provavelmente necessário existirem intervenções repetidas (36).

No futuro, seria importante desenvolver vetores nos quais a expressão do transgene possa ser regulada por pequenas moléculas ou estímulos fisiológicos. Vetores integrativos podem ser mais bem utilizados em aplicações em que defeitos genéticos exigem um efeito de tratamento ao longo da vida. Seria importante determinar, em estudos pré-clínicos e em ensaios de fase 1, se o produto do transgene pode realmente ser medido no plasma ou nos tecidos-alvo e se um efeito de dose pode ser demonstrado.

Outra área com grande potencial de evolução é a terapêutica da ICFEp, uma vez que não existem sequer terapêuticas farmacológicas recomendadas que melhorem o prognóstico da doença. A inclusão destes indivíduos nos ensaios clínicos futuros deve ser uma prioridade.

3. Conclusão

A insuficiência cardíaca desenvolve-se gradualmente e, enquanto na fase inicial, direcionar a terapêutica para a força miocárdica, a contratilidade e a remodelação cardíaca pode ser útil; nas fases posteriores, a apoptose dos cardiomiócitos, a fibrose e as arritmias trazem desafios significativos para as terapêuticas tardias.

Como a IC requer o tratamento da maioria dos cardiomiócitos ventriculares, são necessários vetores e técnicas de entrega de genes muito eficientes. Os vetores AAV têm mostrado eficácia e poderão ser melhorados para terem um tropismo altamente elevado para o miocárdio. Além disso, a elevada prevalência de anticorpos pré-existentes contra muitos serotipos de AAV continua a ser uma preocupação (36).

Além disso, são necessários métodos de entrega extremamente eficazes. Está a ser estudada a utilização de diversos métodos, incluído novas abordagens, para determinar qual o método de entrega mais eficaz. A infusão coronária retrógrada e o MCARD mostram-se como os mais promissores de momento.

Apesar do grande entusiasmo e dos resultados pré-clínicos positivos, a tradução clínica da TG cardiovascular ainda não obteve muito sucesso. Existem muitos fatores que podem contribuir para essa falta de sucesso, incluindo a entrega insuficiente do gene ao local-alvo, o que compromete o potencial dos transgenes; uma duração muito curta da expressão dos transgenes devido a estratégias específicas de transdução; conhecimento insuficiente sobre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes; e, frequentemente, um *design* de ensaio clínico com poder estatístico insuficiente.

Apesar dos desafios que permanecem por ultrapassar, a terapêutica genética é uma oportunidade realista para o tratamento da IC e poderá vir a traduzir-se numa alternativa terapêutica muito brevemente.

Já foram identificados vários alvos com elevado potencial terapêutico que demonstraram efeitos positivos em modelos animais.

Recentemente, a transferência de ácidos nucleicos com nanopartículas degradáveis lentamente e exossomas têm-se mostrado abordagens terapêuticas promissoras (19,22)

Novos alvos moleculares com potencial curativo notável têm sido e continuam a ser identificados. A entrega de ácidos nucleicos não codificantes, como os microRNAs, está-se a mostrar eficaz para induzir a regeneração cardíaca, exibindo propriedades curativas até então atribuídas apenas a células estaminais (36).

A maioria dos ensaios clínicos realizados, demonstraram um ter um bom perfil de segurança, mesmo após um período de follow-up de 10 anos, o que também deve encorajar a continuação da investigação na área (36).

4. Bibliografia

1. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* [Internet]. 2022 May 3 [cited 2023 Jun 26];145(18):E895–1032. Available from: www.ahajournals.org/journal/circ
2. Bozkurt B, Coats AJ, Tsutsui H, Abdelhamid M, Adamopoulos S, Albert N, et al. Universal Definition and Classification of Heart Failure: A Report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure. *J Card Fail* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2023 Jun 19];27(4):387–413. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33663906/>
3. Yin Z qiang. Progress in Gene Therapy for Chronic Heart Failure. 2018 [cited 2023 Jun 18]; Available from: <http://journal.hsforum.com>
4. Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *The Lancet*. 2015 Feb 28;385(9970):812–24.
5. Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol*. 2014 Feb 15;171(3):368–76.
6. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020 Oct 17;396(10258):1204–22.
7. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Baumbach A, Böhm M, Burri H, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* [Internet]. 2021 Sep 21 [cited 2023 Jun 20];42(36):3599–726. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>

8. Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2023 Jun 19];22(8):1342–56. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejhf.1858>
9. Dolgin Martin, New York Heart Association. Criteria Committee. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 1994 [cited 2023 Jun 26];334. Available from: <https://www.worldcat.org/title/29430883>
10. Ceia F, Fonseca C, Mota T, Morais H, Matias F, Costa C, et al. Aetiology, comorbidity and drug therapy of chronic heart failure in the real world: the EPICA substudy. *Eur J Heart Fail* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2023 Jun 19];6(6):801–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.ejheart.2004.09.003>
11. Fonseca C, Brás D, Araújo I, Ceia F. Insuficiência cardíaca em números: estimativas para o século XXI em Portugal. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2018 Feb 1;37(2):97–104.
12. Ceia F, Fonseca C, Mota T, Morais H, Matias F, De Sousa A, et al. Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: The EPICA study. *Eur J Heart Fail*. 2002 Aug 1;4(4):531–9.
13. Snipelisky D, Chaudhry SP, Stewart GC. The Many Faces of Heart Failure. *Card Electrophysiol Clin* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 3];11:11–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2018.11.001>
14. Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in Perspective. *Circ Res*. 2019 May 24;124(11):1598–617.
15. Upadhya B, Kitman DW. Heart failure with preserved ejection fraction: New approaches to diagnosis and management. *Clin Cardiol*. 2020 Feb 1;43(2):145–55.
16. Willerson JT. The Medical and Device-Related Treatment of Heart Failure. *Circ Res*. 2019 May 24;124(11):1519.
17. Miller L, Birks E, Guglin M, Lamba H, Frazier OH. Use of Ventricular Assist Devices and Heart Transplantation for Advanced Heart Failure. *Circ Res*. 2019 May 24;124(11):1658–78.

18. Correale M, Tricarico L, Fortunato M, Mazzeo P, Nodari S, Di Biase M, et al. New Targets in Heart Failure Drug Therapy. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2021 May 5 [cited 2023 Jun 26];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34026873/>
19. Gabisonia K, Recchia FA. Gene therapy for Heart Failure: New Perspectives.
20. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science* [Internet]. 2018 Jan 12 [cited 2023 Jun 22];359(6372). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29326244/>
21. Kotterman MA, Schaffer D V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jun 26];15(7):445–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24840552/>
22. Chen J, Guo Z, Tian H, Chen X. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. 2016 Mar 16 [cited 2023 Jun 26];3:16023. Available from: </pmc/articles/PMC4822651/>
23. Katz MG, Fargnoli AS, Tomasulo CE, Pritchette LA, Bridges CR. Model-specific selection of molecular targets for heart failure gene therapy. *J Gene Med* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2023 Jun 26];13(10):573–86. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jgm.1610>
24. Guo M, Guo G, Ji X. Genetic polymorphisms associated with heart failure: A literature review. *J Int Med Res* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Jun 26];44(1):15. Available from: </pmc/articles/PMC5536573/>
25. Hayward C, Patel HC, Welch S, Patel K, Lyon AR. Gene Therapy in Heart Failure. *eLS* [Internet]. 2017 Jan 16 [cited 2023 Jun 26];1–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0025274>
26. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (1979) [Internet]. 2014 Nov 28 [cited 2023 Jun 26];346(6213). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1258096>

27. Rissanen TT, Ylä-Herttua S. Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol Ther* [Internet]. 2007 Jul [cited 2023 Jun 20];15(7):1233–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17505481/>
28. Korpela H, Siimes S, Lampela J, Airaksinen J, Valli K, Turunen M, et al. Gene therapy for ischaemic heart disease and heart failure. 2021 [cited 2023 Mar 23]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.13308>
29. Greenberg B. Gene therapy for heart failure. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2023 Jun 26];27(3):216–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28063800/>
30. Haddley K. Alipogene tiparvovec for the treatment of lipoprotein lipase deficiency. *Drugs Today (Barc)* [Internet]. 2013 Mar [cited 2023 Jun 26];49(3):161–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23527320/>
31. Lin H, Parmacek MS, Morle G, Bolling S, Leiden JM. Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. *Circulation* [Internet]. 1990 [cited 2023 Jun 27];82(6):2217–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2173647/>
32. Kieserman JM, Myers VD, Dubey P, Cheung JY, Feldman AM. Current Landscape of Heart Failure Gene Therapy. *J Am Heart Assoc*. 2019 May 21;8(10).
33. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID): A phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 2011 Jul 19;124(3):304–13.
34. Hulot JS, Salem JE, Redheuil A, Collet JP, Varnous S, Jourdain P, et al. Effect of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a on ventricular remodelling in patients with advanced systolic heart failure: results from the AGENT-HF randomized phase 2 trial. *Eur J Heart Fail* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Jun 26];19(11):1534–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28393439/>
35. Lyon AR, Babalis D, Morley-Smith AC, Hedger M, Suarez Barrientos A, Foldes G, et al. Investigation of the safety and feasibility of AAV1/SERCA2a gene transfer in

- patients with chronic heart failure supported with a left ventricular assist device – the SERCA-LVAD TRIAL. *Gene Therapy* 2020 27:12 [Internet]. 2020 Jul 15 [cited 2023 Jun 27];27(12):579–90. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41434-020-0171-7>
36. Ylä-Herttuala S, Baker AH. Cardiovascular Gene Therapy: Past, Present, and Future. [cited 2023 Jun 18]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.027>.
 37. Hammond HK, Penny WF, Traverse JH, Henry TD, Watkins MW, Yancy CW, et al. Intracoronary gene transfer of adenylyl cyclase 6 in patients with heart failure: A randomized clinical trial. *JAMA Cardiol.* 2016 May 1;1(2):163–71.
 38. Pleger ST, Shan C, Ksienzyk J, Bekeredjian R, Boekstegers P, Hinkel R, et al. Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model. *Sci Transl Med.* 2011 Jul 20;3(92).
 39. Pajula J, Lähtenvuo J, Lähtenvuo M, Honkonen K, Halonen P, Häätinen OP, et al. Adenoviral VEGF-D Δ N Δ C gene therapy for myocardial ischemia. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2022 Dec 22 [cited 2023 Jun 26];10:999226. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36619378>
 40. Hartikainen J, Hassinen I, Hedman A, Kivelä A, Saraste A, Knuuti J, et al. Adenoviral intramyocardial VEGF-D Δ N Δ C gene transfer increases myocardial perfusion reserve in refractory angina patients: a phase I/IIa study with 1-year follow-up. *Eur Heart J* [Internet]. 2017 Sep 9 [cited 2023 Jun 20];38(33):2547. Available from: </pmc/articles/PMC5837555/>
 41. Penn MS, Mendelsohn FO, Schaer GL, Sherman W, Farr M, Pastore J, et al. An open-label dose escalation study to evaluate the safety of administration of nonviral stromal cell-derived factor-1 plasmid to treat symptomatic ischemic heart failure. *Circ Res* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2023 Jun 20];112(5):816–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23429605/>
 42. Cannone V, Ledwidge M, Watson C, McKie PM, Burnett JC, McDonald K. STOP-HF Trial: Higher Endogenous BNP and Cardiovascular Protection in Subjects at Risk for Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci.* 2021 Jun 1;6(6):497–504.

43. Study to Evaluate the Safety and Efficacy of JVS-100 Administered to Adults With Ischemic Heart Failure - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2023 Jun 27]. Available from: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01961726>
44. Hulot JS, Ishikawa K, Hajjar RJ. Gene therapy for the treatment of heart failure: promise postponed. *Eur Heart J* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Jun 20];37(21):1651–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26922809/>
45. Wang J, Shi Q, Wang Y, Dawson LW, Ciampa G, Zhao W, et al. Gene Therapy with the N-Terminus of Junctophilin-2 Improves Heart Failure in Mice. *Circ Res* [Internet]. 2022 Apr 29 [cited 2023 Jun 26];130(9):1306–17. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.121.320680>
46. Batkai S, Genschel C, Viereck J, Rump S, Bär C, Borchert T, et al. CDR132L improves systolic and diastolic function in a large animal model of chronic heart failure. *Eur Heart J* [Internet]. 2021 Jan 7 [cited 2023 Jun 27];42(2):192–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33089304/>
47. Study to Assess Efficacy and Safety of CDR132L in Patients With Reduced Left Ventricular Ejection Fraction After Myocardial Infarction - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2023 Jun 27]. Available from: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05350969?term=gene&cond=Heart+Failure&draw=7&rank=60>
48. NAN-101 in Patients With Class III Heart Failure - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2023 Jun 27]. Available from: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04179643?term=gene&cond=Heart+Failure&draw=6&rank=48>
49. Watanabe S, Ishikawa K, Fish K, Oh JG, Motloch LJ, Kohlbrenner E, et al. Protein Phosphatase Inhibitor-1 Gene Therapy in a Swine Model of Nonischemic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2017 Oct 3 [cited 2023 Jun 27];70(14):1744–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28958332/>
50. Phosphatase Inhibition by Intracoronary Gene Therapy in Subjects With Non-Ischemic NYHA Class III Heart Failure - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2023 Jun 27]. Available from:

<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05598333?term=gene&cond=Heart+Failure&draw=2&rank=8>

51. Modulation of SERCA2a of Intra-myocytic Calcium Trafficking in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2023 Jun 27]. Available from: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04703842?term=srd-001&cond=Heart+Failure&draw=2&rank=1>
52. Das S, Shah R, Dimmeler S, Freedman JE, Holley C, Lee JM, et al. Noncoding RNAs in Cardiovascular Disease: Current Knowledge, Tools and Technologies for Investigation, and Future Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Genom Precis Med* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2023 Jun 19];13(4):E000062. Available from: www.ahajournals.org/journal/circgen
53. Wang S, Lv T, Chen Q, Yang Y, Xu L, Zhang X, et al. Transcriptome sequencing and lncRNA-miRNA-mRNA network construction in cardiac fibrosis and heart failure. *Bioengineered* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 26];13(3):7118–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35235759/>
54. Ilieva M, Panella R, Uchida S. MicroRNAs in Cancer and Cardiovascular Disease. *Cells*. 2022 Nov 1;11(22).
55. Ylä-Herttuala S, Bridges C, Katz MG, Korpisalo P. Angiogenic gene therapy in cardiovascular diseases: dream or vision? *Eur Heart J* [Internet]. 2017 May 5 [cited 2023 Jun 20];38(18):1365. Available from: [/pmc/articles/PMC5837788/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27811111/)

5. Anexos

5.1 Anexo 1 – Sintomas e sinais típicos de insuficiência cardíaca

Table 6 Symptoms and signs typical of heart failure

Symptoms	Signs
Typical	More specific
Breathlessness	Elevated jugular venous pressure
Orthopnoea	Hepatojugular reflux
Paroxysmal nocturnal dyspnoea	Third heart sound (gallop rhythm)
Reduced exercise tolerance	Laterally displaced apical impulse
Fatigue, tiredness, increased time to recover after exercise	
Ankle swelling	
Less typical	Less specific
Nocturnal cough	Weight gain (>2 kg/week)
Wheezing	Weight loss (in advanced HF)
Bloated feeling	Tissue wasting (cachexia)
Loss of appetite	Cardiac murmur
Confusion (especially in the elderly)	Peripheral oedema (ankle, sacral, scrotal)
Depression	Pulmonary crepitations
Palpitation	Pleural effusion
Dizziness	Tachycardia
Syncope	Irregular pulse
Bendopnea ^a	Tachypnoea
	Cheyne-Stokes respiration
	Hepatomegaly
	Ascites
	Cold extremities
	Oliguria
	Narrow pulse pressure

© ESC 2021

HF = heart failure.

^aThis symptom of advanced HF corresponds to shortness of breath when leaning forward.⁶⁷

Retirado de McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Celutkiene, J., Chioncel, O., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Crespo-Leiro, M. G., Farmakis, D., Gilard, M., & Heymans, S. (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. In *European Heart Journal* (Vol. 42, Issue 36, pp. 3599–3726). Oxford University Press.

5.2 Anexo 2 – Causas de insuficiência cardíaca

Table 5 Causes of heart failure, common modes of presentation and specific investigations

Cause	Examples of presentations	Specific investigations
CAD	Myocardial infarction Angina or “angina-equivalent” Arrhythmias	Invasive coronary angiography CT coronary angiography Imaging stress tests (echo, nuclear, CMR)
Hypertension	Heart failure with preserved systolic function Malignant hypertension/acute pulmonary oedema	24 h ambulatory BP Plasma metanephrines, renal artery imaging Renin and aldosterone
Valve disease	Primary valve disease e.g., aortic stenosis Secondary valve disease, e.g. functional regurgitation Congenital valve disease	Echo – transoesophageal/stress
Arrhythmias	Atrial tachyarrhythmias Ventricular arrhythmias	Ambulatory ECG recording Electrophysiology study, if indicated
CMPs	All Dilated Hypertrophic Restrictive ARVC Peripartum Takotsubo syndrome Toxins: alcohol, cocaine, iron, copper	CMR, genetic testing Right and left heart catheterization CMR, angiography Trace elements, toxicology, LFTs, GGT
Congenital heart disease	Congenitally corrected/repai red transposition of great arteries Shunt lesions Repaired tetralogy of Fallot Ebstein’s anomaly	CMR
Infective	Viral myocarditis Chagas disease HIV Lyme disease	CMR, EMB Serology
Drug-induced	Anthracyclines Trastuzumab VEGF inhibitors Immune checkpoint inhibitors Proteasome inhibitors RAF+MEK inhibitors	
Infiltrative	Amyloid Sarcoidosis Neoplastic	Serum electrophoresis and serum free light chains, Bence Jones protein, bone scintigraphy, CMR, CT-PET, EMB Serum ACE, CMR, FDG-PET, chest CT, EMB CMR, EMB
Storage disorders	Haemochromatosis Fabry disease Glycogen storage diseases	Iron studies, genetics, CMR (T2* imaging), EMB α -galactosidase A, genetics, CMR (T1 mapping)
Endomyocardial disease	Radiotherapy Endomyocardial fibrosis/eosinophilia Carcinoid	CMR EMB 24 h urine 5-HIAA
Pericardial disease	Calcification Infiltrative	Chest CT, CMR, right and left heart catheterization
Metabolic	Endocrine disease Nutritional disease (thiamine, vitamin B1 and selenium deficiencies) Autoimmune disease	TFTs, plasma metanephrines, renin and aldosterone, cortisol Specific plasma nutrients ANA, ANCA, rheumatology review
Neuromuscular disease	Friedreich’s ataxia Muscular dystrophy	Nerve conduction studies, electromyogram, genetics CK, electromyogram, genetics

5-HIAA = 5-hydroxyindoleacetic acid; ACE = angiotensin-converting enzyme; ANA = anti-nuclear antibody; ANCA = anti-nuclear cytoplasmic antibody; ARVC = arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; BP = blood pressure; CAD = coronary artery disease; CMP = cardiomyopathy; CMR = cardiac magnetic resonance; CK = creatinine kinase; CT = computed tomography; ECG = electrocardiogram; Echo = echocardiography; EMB = endomyocardial biopsy; FDG = fluorodeoxyglucose; GGT = gamma-glutamyl transferase; HIV = human immunodeficiency virus; h = hour; LFT = liver function test; LGE = late gadolinium enhancement; MEK = mitogen-activated protein kinase; PET = positron emission tomography; TFT = thyroid function test; VEGF = vascular endothelial growth factor.

© ESC 2021

Retirado de McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Celutkiene, J., Chioncel, O., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Crespo-Leiro, M. G., Farmakis, D., Gilard, M., & Heymans, S. (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. In *European Heart Journal* (Vol. 42, Issue 36, pp. 3599–3726). Oxford University Press.

5.3 Anexo 3 – vetores representativos utilizados na terapêutica genética cardíaca

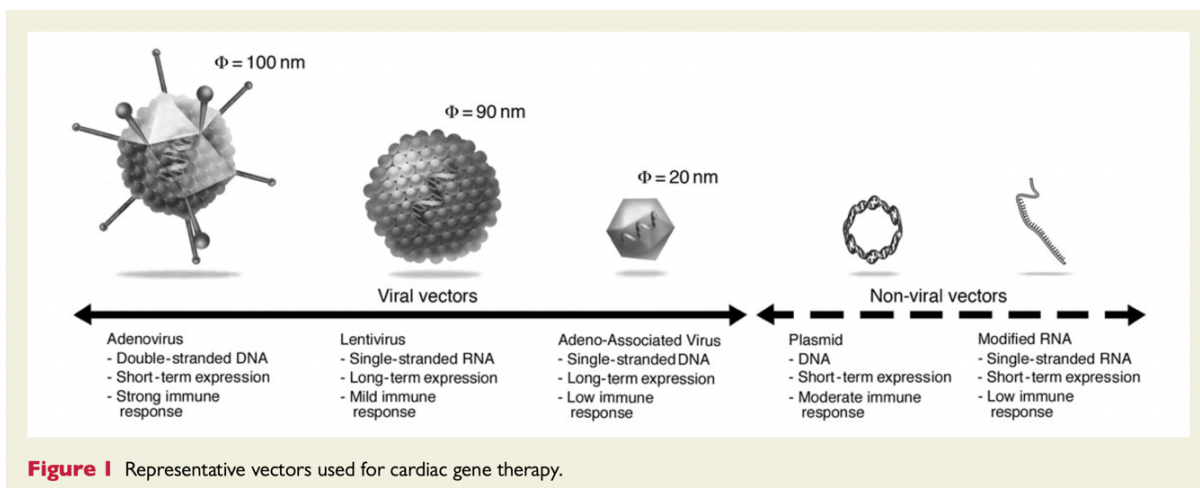


Figure 1 Representative vectors used for cardiac gene therapy.

Retirado de Hulot JS, Ishikawa K, Hajjar RJ. Gene therapy for the treatment of heart failure: promise postponed. *Eur Heart J* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Jun 20];37(21):1651–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26922809/>