

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

# **Gene Therapies for Macular Dystrophies: Current strategies and future prospects**

Tiago André Calado Pereira Bastos

**M**

2025



# **Gene Therapies for Macular Dystrophies: Current strategies and future prospects**

## **Estudante:**

Tiago André Calado Pereira Bastos

up201907203@icbas.up.pt

Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº228, 4050-313, Porto

## **Orientador:**

Professor Doutor João Melo Beirão

Professor Catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Assistente Hospitalar Graduado de Oftalmologia – Centro Hospitalar Universitário de Santo António - Hospital de Santo António

Junho, 2025

Porto, Junho de 2025

Assinado por: **Tiago André Calado Pereira Bastos**  
Num. de Identificação: 15268320  
Data: 2025.06.06 16:51:28 +0100

Assinatura digital – Tiago André Calado Pereira Bastos

Assinado por: **João Nuno Melo Beirão**  
Num. de Identificação: 06957438  
Data: 2025.06.05 14:36:56+01'00'

Assinatura– Prof. Doutor João Melo Beirão

## **Agradecimentos**

Ao fim deste percurso, que se revelou desafiante e exigente, é com profundo reconhecimento que escrevo estas palavras de agradecimento. Ao longo desta caminhada, não estive sozinho. Foram várias as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho se tornasse possível.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor João Melo Beirão pela orientação, disponibilidade e constante incentivo ao longo deste percurso. A sua experiência, exigência científica e capacidade de orientação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, à minha irmã e a toda a minha família, deixo um agradecimento muito especial. Obrigado pelo apoio em todos os momentos e por nunca deixarem que fizesse este caminho sozinho, mesmo nos dias mais difíceis. Este trabalho é também vosso. A vossa presença deu-me sempre a força necessária para continuar em frente.

Aos meus amigos, que estiveram sempre por perto, mesmo quando o tempo era pouco, um enorme obrigado. Obrigado pelas palavras de motivação, pela compreensão nos momentos de ausência e pelas pausas tão necessárias que me ajudaram a manter o equilíbrio. A vossa amizade foi essencial para que esta etapa fosse concluída com sucesso.

## Resumo

As distrofias maculares hereditárias, como a doença de Stargardt (STGD1), a Doença de Best e a Retinosquiasis ligada ao X (XLRS), são causas importantes de perda progressiva de visão, caracterizadas por mutações genéticas distintas e mecanismos fisiopatológicos que afetam o epitélio pigmentar da retina (EPR) e os fotorreceptores. Esta tese revê os avanços atuais nas terapias genéticas dirigidas à correção ou mitigação dos defeitos moleculares subjacentes a estas doenças da retina. Dá-se ênfase aos sistemas de entrega viral, como os vetores virais adeno-associados (AAVs), incluindo vetores AAV duplos e de *trans-splicing*, à entrega gênica não viral, à edição genética mediada por CRISPR/Cas9 e à tecnologia de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) para modelação da doença. A discussão integra estudos pré-clínicos que demonstram a correção bem-sucedida das mutações do gene *ABCA4* em modelos de STGD1, do gene *BEST1* na doença de Best e do gene *RS1* na Retinosquiasis ligada ao X. Embora estas abordagens apresentem potencial terapêutico significativo, persistem desafios relacionados com a eficiência da entrega, segurança a longo prazo e tradução clínica. Este trabalho destaca a necessidade de investigação contínua e de protocolos otimizados para viabilizar tratamentos eficazes para estas distrofias maculares.

Palavras-chave: Distrofia Macular, Retina, Doença de Stargardt, Distrofia Macular de Best, Terapia genética, vetor genético

## Abstract

Inherited macular dystrophies such as Stargardt disease (STGD1), Best disease and X-linked retinoschisis (XLRs) are major causes of progressive vision loss characterized by distinct genetic mutations and pathophysiological mechanisms affecting the retinal pigment epithelium and photoreceptors. This thesis reviews the current advances in gene therapies aimed at correcting or mitigating the molecular defects underlying these retinal diseases. Emphasis is placed on viral vectors delivery systems such as adeno-associated viral (AAV) including dual and trans-splicing AAV vectors, non-viral gene delivery, CRISPR/Cas9-mediated gene editing and induced pluripotent stem cell (iPSCs) technology for disease modelling. The discussion integrates preclinical studies demonstrating successful correction of *ABCA4* mutations in STGD1 models, *BEST1* in Best disease and *RS1* in XLRs. Although these approaches show significant therapeutic potential, challenges remain regarding delivery efficiency, long-term safety, and clinical translation. This work highlights the need for continued research and optimized protocols to enable effective treatments for these macular dystrophies.

Keywords: Macular Dystrophy, Retina, Stargardt Disease, Best Macular Dystrophy, Gene therapy, Genetic vector

## **Abreviaturas**

AON- *Anti-sense oligonucleotides*

iPSC- Células estaminais pluripotentes induzidas

HDAC6- Desacetilase de Histonas tipo 6

STGD1- Doença de Stargardt

EPR- Epitélio pigmentar da retina

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

CNV- Neovascularização coroideia

ssODNs- Oligonucleotídeos de cadeia simples de DNA

vMCO-I- Opsina multicaracterística tipo I

XLRS- Retinosquiasis ligada ao X

OCT- Tomografia de Coerência Óptica

AAV- Vírus adeno-associados

EIAV- Vírus da anemia infecciosa equina recombinante

## Índice

|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| Agradecimentos.....                                                    | i   |
| Resumo .....                                                           | ii  |
| Abstract.....                                                          | iii |
| Abreviaturas.....                                                      | iv  |
| Lista de Tabelas.....                                                  | vi  |
| Introdução .....                                                       | 1   |
| Métodos .....                                                          | 2   |
| Doença de Stargardt .....                                              | 3   |
| Doença de Best .....                                                   | 4   |
| Retinosquias ligada ao X.....                                          | 5   |
| Terapia genética em oftalmologia.....                                  | 5   |
| Terapia genética na Doença de Stargardt .....                          | 7   |
| Vetores virais .....                                                   | 7   |
| Vetores não virais.....                                                | 9   |
| <i>Anti-sense oligonucleotides</i> como moduladores de RNA .....       | 9   |
| O C3DNA como plataforma de terapia genética .....                      | 10  |
| Edição genética e iPSCs.....                                           | 11  |
| Terapias genéticas na Doença de Best .....                             | 12  |
| Vetores virais .....                                                   | 12  |
| iPSCs como modelos .....                                               | 12  |
| Técnicas para o tratamento da CNV.....                                 | 13  |
| Terapias genéticas na Retinosquias ligada ao X.....                    | 13  |
| Vetores virais .....                                                   | 13  |
| Organoides como modelos para o desenvolvimento de vetores virais ..... | 15  |
| Discussão .....                                                        | 15  |
| Recomendações para investigações futuras .....                         | 21  |
| Conclusão .....                                                        | 21  |
| Apêndice .....                                                         | 23  |
| Bibliografia.....                                                      | 25  |

## **Lista de Tabelas**

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela I- Critérios de inclusão e exclusão. ....                                                                                  | 23 |
| Tabela II- Comparação das vantagens, limitações e etapas de desenvolvimento dos vetores virais, não virais e edição genética..... | 24 |

## Introdução

As distrofias maculares, tal como a Doença de Stargardt (STGD1), a Doença de Best e a Retinosquiasis ligada ao X (XLRS), constituem um grupo de doenças oculares hereditárias composto por mais de 100 doenças, causadas por mutações em mais de 300 genes.<sup>(1)</sup> Estas são caracterizadas por lesão macular e, consequentemente, perda de visão. Esta lesão ocorre sob a forma de uma atrofia da retina e, tendo em conta que ocorre na área responsável pela visão da alta acuidade devido à presença de um elevado número de cones, a perda de visão é maioritariamente central.<sup>(2)</sup>

Estas patologias manifestam-se mais comumente na infância e têm um elevado impacto na qualidade de vida dos doentes.<sup>(3)</sup> Estudos recentes envolvendo indivíduos com a Doença de Stargardt concluíram que estes apresentam um compromisso substancial da visão, afetando atividades do seu quotidiano tal como a capacidade de praticar exercício físico, de concentração, de leitura e até o reconhecimento de rostos. Para além disso, a perda progressiva da visão central nestas condições pode levar ao aumento do risco de isolamento social e sintomas depressivos. Deste modo as distrofias maculares provocam perdas visuais significativas desde idades precoces, afetando a autonomia e o bem-estar emocional dos pacientes.<sup>(4, 5)</sup> Adicionalmente, um estudo realizado em 2021 que avaliou o impacto económico das doenças retinianas hereditárias concluiu que, nos Estados Unidos da América, os custos totais atribuíveis a estas patologias estariam entre os 13,4 mil milhões e 31,8 mil milhões de dólares, incluindo custos relacionados com a perda de produtividade, custos com cuidadores informais, despesas de saúde e impacto no bem-estar dos doentes.<sup>(6)</sup>

As estratégias terapêuticas das distrofias maculares baseiam-se, atualmente, na sua grande maioria, apenas no controlo sintomático da doença e da sua evolução.<sup>(1, 2, 3)</sup> Assim, o tratamento destas patologias permanece extremamente limitado, não existindo tratamentos capazes de responder adequadamente à gravidade da doença.

Tratando-se estas doenças de patologias hereditárias, os avanços na tecnologia de genética molecular permitiram identificar os genes afetados em cada distrofia macular. Adicionalmente, com o constante contributo da bioengenharia, abriram-se as portas ao desenvolvimento de terapias dirigidas à causa com um intuito curativo.<sup>(7)</sup> As técnicas de terapia genética permitem a alteração e correção de genes mutados através da utilização de vetores para a introdução de material genético nas células afetadas, sendo que os vetores mais utilizados atualmente são os vírus, as nanoestruturas e os plasmídeos.<sup>(8)</sup> Os ensaios clínicos de terapias genéticas atualmente em curso recorrem na sua maioria à utilização de vetores víricos, tal como os vírus adeno-associados (AAVs) e os lentivírus, de nanopartículas, da ferramenta CRISPR/Cas9 e de terapias com recurso a RNA.

Apesar de vários ensaios pré-clínicos e clínicos já terem alcançado alguns resultados promissores, ainda existem alguns entraves ao desenvolvimento destas terapias, tal como limitações na administração dos vetores, respostas imunes adversas, baixa eficácia do tratamento a longo prazo, entre outras.<sup>(7)</sup>

Assim, o objetivo desta tese passa por realizar uma revisão da literatura existente sobre o desenvolvimento e aplicação de terapias genéticas no tratamento de distrofias maculares, motivado pelo aumento significativo do número de artigos, criando a necessidade de resumir a informação num único artigo. Esta tese incidirá com maior interesse na Doença de Stargardt, Doença de Best e Retinosquise ligada ao X, elencando os alvos identificados nestas patologias, as estratégias a ser testadas e os seus resultados até à data. Serão ainda abordadas as perspectivas de futuros ensaios clínicos, mencionando as limitações identificadas e as estratégias para o desenvolvimento de estudos mais úteis e robustos. Ao reunir e analisar criticamente os avanços mais relevantes nesta área, esta revisão pretende não só consolidar o conhecimento existente, como também reforçar o papel da terapia genética como uma via promissora para transformar o prognóstico e a qualidade de vida dos doentes com distrofias maculares.

## **Métodos**

Para atingir os objetivos propostos no presente trabalho, foi efetuada uma pesquisa bibliográfica na base de dados *Pubmed*. Nesta pesquisa foram utilizados termos considerados como pertinentes tais como "*Macular dystrophy*", "*macular dystrophies*", "*Stargardt disease*", "*Best disease*", "*Bestrophinopathies*", "*X-linked retinoschisis*", "*Gene therapy*", "*Gene editing*" e "*Genome editing*". Estes termos foram usados isoladamente e em conjunto de forma a obter os resultados mais adequados. Para selecionar o maior número possível de artigos relacionados com o tema principal desta revisão, foi utilizado também a base de dados *Medical Subject Headings* (MeSH) através do construtor de pesquisa avançada da *PubMed* com os seguintes termos MeSH: "*Macular Dystrophy*", "*Retina*", "*Stargardt Disease*", "*Best Macular Dystrophy*", "*Gene therapy*" e "*Genetic vector*".

De seguida, de forma a que um artigo fosse pré-selecionado, este teria de ser escrito em inglês e ter sido publicado desde 2014 (inclusivamente). Adicionalmente, o texto integral do artigo teria de estar disponível para consulta de forma gratuita. Os critérios de inclusão e exclusão aplicados durante esta seleção estão sistematizados na tabela I. De seguida, os artigos encontrados foram analisados através do seu título e resumo, com o intuito de determinar se os mesmos eram pertinentes e correspondiam à temática em questão. Por fim, os artigos selecionados foram

analisados na sua totalidade. Esta pesquisa foi realizada em múltiplas ocasiões de forma a incluir artigos mais recentemente publicados.

Embora esta tese se trate de uma revisão narrativa, procurou-se adotar alguns princípios da diretriz PRISMA, com o objetivo de garantir maior transparência e rigor na seleção, análise e apresentação dos estudos incluídos. A pesquisa bibliográfica resultou inicialmente na identificação de 277 artigos que preenchiam os critérios de inclusão definidos e continham os termos de pesquisa previamente descritos. Após análise crítica, foram selecionadas 48 referências consideradas relevantes para os objetivos deste trabalho.

### **Doença de Stargardt**

A Doença de Stargardt (STGD1) é a distrofia macular juvenil mais comum, afetando um em cada oito mil a dez mil indivíduos.<sup>(9)</sup> Esta é causada por uma mutação no gene *ABCA4*, sendo também conhecida como distrofia macular juvenil. Existe uma grande variabilidade em relação à idade do diagnóstico, sintomatologia, progressão e o grau de afetação do epitélio pigmentar da retina (EPR). Contudo de uma forma geral, esta patologia leva a uma degeneração progressiva deste epitélio, culminando na perda de visão ainda em idades precoces.<sup>(3, 10)</sup>

O gene afetado, o *ABCA4*, é herdado de forma autossômica recessiva e codifica o transportador ABCA4, específico dos fotorreceptores, pertencente à subfamília A das proteínas *ATP-binding cassette*, que estão envolvidas no transporte ativo de diversos substratos através da membrana celular. Este é composto por 50 exões e existem à data mais de 900 variantes identificadas, sendo que algumas variantes genéticas causam apenas uma ligeira inativação do transportador enquanto algumas variantes culminam na inativação total do *ABCA4* e provocam um fenótipo mais severo da STGD1. Estas variantes explicam assim a variabilidade da apresentação desta patologia. Este transportador está localizado na região periférica dos discos dos segmentos externos dos bastonetes e dos cones e está envolvido no ciclo da vitamina A, fazendo o transporte de N-retinilideno-fosfatidiletanolamina (N-RPE). Se este transportador não estiver funcional ocorre a acumulação deste mesmo composto, levando à formação de lipofuscina e A2E. Estas substâncias são tóxicas e danificam as células do epitélio pigmentar da retina e, consequentemente, os fotorreceptores.<sup>(9)</sup>

É ainda importante realçar que as variantes do gene *ELOVL4* e do gene *PROM1* são responsáveis por distrofias maculares cujas manifestações clínicas e imagiológicas em tudo se assemelham à STGD1, sendo denominadas de Doença de Stargardt 3 e 4, respetivamente. Estas distrofias maculares são, contudo, de transmissão autossômica dominante.<sup>(3)</sup>

As opções terapêuticas para a STGD1 são bastante escassas. Os doentes são aconselhados a usar aparelhos de auxílio da visão, diminuir a sua exposição à radiação UV e a não realizar suplementação com vitamina A, uma vez que esta está envolvida na deposição de compostos tóxicos no EPR.<sup>(3, 9)</sup>

### **Doença de Best**

As bestrofinopatias constituem ao grupo de distrofias maculares resultantes da mutação do gene *BEST1*, sendo que este termo engloba 5 doenças degenerativas da retina: Distrofia Macular Viteliforme Juvenil; Distrofia Macular Viteliforme do Adulto; Vitreocoroidopatia Autossómica Dominante; Bestrofinopatia Autossómica Recessiva; e Retinite Pigmentar.<sup>(11)</sup>

A Distrofia Macular Viteliforme Juvenil é a segunda distrofia macular mais prevalente mundialmente afetando um em cada dez mil indivíduos.<sup>(3)</sup> Esta é também a bestrofinopatia mais comum das 5 anteriormente mencionadas, sendo também conhecida como Distrofia Macular Viteliforme de Best ou simplesmente Doença de Best.

O gene *BEST1* codifica a bestrofina-1, uma proteína transmembranar integral que é exclusiva do EPR, estando esta localizada na membrana basolateral das células do mesmo. Esta proteína é vital para o desenvolvimento e manutenção deste epitélio. A bestrofina-1 é um canal de cloro e bicarbonato dependente de cálcio que regula o transporte de iões e inibe ainda canais de cálcio dependentes da voltagem intracelulares. Apesar do mecanismo que culmina no dano da retina não ser conhecido na sua totalidade, de uma forma geral, é possível afirmar que a disfunção da bestrofina-1 leva a uma disfunção do EPR e, consequentemente, a interação entre os fotorreceptores e microvilosidades deste epitélio fica comprometida. Este comprometimento leva a um descolamento seroso da retina. Adicionalmente, ocorre a acumulação de lipofuscina como resultado de um comprometimento da fagocitose.<sup>(11)</sup>

A Distrofia Macular Viteliforme Juvenil tem uma apresentação clínica menos grave em relação à Doença de Stargardt, levando a uma perda de visão menos marcada. Contudo, em estádios mais avançados da doença, pode ocorrer a neovascularização corioideia (CNV), estando esta condição associada a uma perda de visão mais grave e rápida. Assim, as opções terapêuticas desta distrofia macular são, à semelhança do que ocorria na Doença de Stargardt, limitadas, estando as mesmas direcionadas exclusivamente a intervenções em casos em que ocorrem complicações. Neste sentido, as injeções intravítreas de agentes anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) estão indicadas aquando da CNV. Outros possíveis tratamentos para esta complicação são a fotocoagulação a laser e a terapia fotodinâmica.<sup>(10, 11)</sup>

## **Retinosqu岸is ligada ao X**

A Retinosqu岸is ligada ao X (XLR5)  uma forma de distrofia macular que resulta mais comumente de mutações no gene *RS1*. Tal como o nome indica, esta  uma doença hereditária recessiva ligada ao X e por isso afeta quase exclusivamente indivíduos do sexo masculino, sendo que se estima que afete um em cada cinco mil a vinte e cinco mil homens<sup>(12)</sup>, apresentando, por isso, uma prevalência consideravelmente inferior às 2 anteriormente faladas.

O gene *RS1* codifica uma proteína de superfície celular denominada retinosquisina-1. Esta está presente nos fotorrecetores e desempenha um papel fulcral na adesão das células da retina e na manuteno da integridade estrutural da mesma. Os indivíduos afetados por esta distrofia molecular apresentam uma afetao da funo da retinosquisina-1, levando  formao de cavidades entre a Camada Plexiforme Externa (CPE) e a Camada Nuclear Externa (CNE). Estas cavidades parecem ser assim a principal causa pela perda de visão nestes doentes.<sup>(13)</sup> Adicionalmente, a disfuno da proteína codificada pelo gene *RS1* está também envolvida na afetao da sinapse entre os fotorrecetores e as células bipolares, sendo esta outra das causas da perda de visão nestes doentes.<sup>(10)</sup>

Atualmente não existem tratamentos eficazes no controlo da Retinosqu岸is ligada ao X, estando apenas recomendadas medidas de auxílio visual, tal como aparelhos de auxílio da visão.

## **Terapia genética em oftalmologia**

A terapia genética  uma área da medicina cada vez mais relevante e com grandes implicaoes no futuro do tratamento de várias patologias. Deste modo, o número de ensaios clínicos em que são testadas técnicas de terapias genéticas e o investimento no desenvolvimento das mesmas tem vindo a aumentar significativamente, em especial desde que o genoma humano passou a estar integralmente disponível para consulta em bases de dados online.<sup>(14)</sup> Adicionalmente, os recentes progressos nos testes genéticos têm permitido uma melhor identificao de genes causadores de doenças e a caracterizao dessas mesmas doenças e da sua evoluo, facilitando a identificao de correlaoes entre fenótipos clínicos e genótipos específicos e viabilizando métodos de diagnóstico genético mais rápidos.<sup>(14, 15)</sup> Neste mesmo sentido, os resultados promissores de ensaios clínicos recentes com terapias genéticas reforçam o potencial destas abordagens no tratamento de diversas patologias e, em específico, de doenças oftalmológicas.

A terapia genética consiste na introdução, remoção ou modificação do DNA num paciente.<sup>(7)</sup> Existem diferentes estratégias de terapias genéticas tal como a terapia de substituição genética, na qual é inserida uma cópia funcional de um gene para compensar uma versão defeituosa, e a edição genética, onde se corrige uma mutação de um gene com recurso a ferramentas como a CRISPR/Cas9. Assim, estas diferentes técnicas apresentam vantagens e desvantagens, mas, devido ao seu modo de ação, a edição genética é mais vantajosa em doenças autossómicas dominantes, recessivas e ligadas ao x enquanto uso da terapia de substituição genética está mais reservada ao tratamento de doenças autossómicas recessivas.<sup>(15)</sup> A maioria destas técnicas recorrem a vetores de forma a realizar estas alterações no material genético das células do doente. De facto, a eficácia das terapias genéticas depende da entrega eficaz do material genético às células. Os vírus, tal como os adenovírus, os vírus adeno-associados, os lentivírus e retrovírus, são amplamente utilizados nestas técnicas, devido à sua capacidade de invadir as células. Contudo, a possibilidade de existirem respostas imunes exacerbadas e de mutações genéticas motivou a pesquisa e desenvolvimento de vetores não virais, tais como as nanopartículas lipídicas, oferecendo estas uma alternativa segura e eficaz aos vírus como vetores no tratamento de doenças degenerativas.<sup>(16)</sup>

Em relação à área da oftalmologia, estas técnicas apresentam um interesse ainda mais particular, levando a que existam cada vez mais estudos focados em doenças oftalmológicas. Assim, em 2017, 44,3% de todos os ensaios clínicos relacionados com terapias genéticas não oncológicas focavam-se em doenças oftalmológicas.<sup>(15)</sup> Este interesse pode ser explicado por alguns fatores tal como o olho ser um órgão ideal para o uso de terapêuticas genéticas, mas também pelas consequências socioeconómicas das doenças oftalmológicas.<sup>(1)</sup> Por um lado, doenças genéticas oftalmológicas tal como as distrofias maculares, são responsáveis por 50 a 70% dos casos de perda de visão e são mesmo a principal causa de perda de visão em idade juvenil.<sup>(1, 15)</sup> Por outro lado, o olho tem sido visto como o candidato ideal para a aplicação de técnicas de edição genética. Esta característica especial do olho deve-se ao facto de este apresentar reduzidas dimensões, ser facilmente acessível, ser muito compartimentalizado, a capacidade de administrar tratamento altamente localizado, a facilidade de monitorização através de meios de imagem não invasivos tal como o OCT, a eletrorretinografia e a fundoscopia e ao facto de o olho corresponder a um local imunologicamente privilegiado, possibilitando a utilização de vetores víricos com menores riscos.<sup>(1, 15, 17)</sup> Estas condições permitem que as terapias genéticas apresentem uma alta eficácia neste órgão. É ainda importante referir que o vetor mais utilizado na área da oftalmologia são os AAVs, sendo que vários ensaios clínicos recorrem a técnicas com estes mesmos vetores.<sup>(18, 19)</sup> É ainda importante realçar que em 2017 foi aprovado a primeira terapia genética para o tratamento de uma doença hereditária, sendo que este passo contribuiu para o aumento do interesse nesta área e levou à

realização de novos ensaios clínicos.<sup>(14)</sup> Assim, o Voretigene Neparvovec, um fármaco para o tratamento da distrofia retiniana associada a mutações no gene *RPE65*, contribuiu para o otimismo em torno das terapias genéticas.<sup>(7)</sup>

### **Terapia genética na Doença de Stargardt**

A Doença de Stargardt, sendo a distrofia macular juvenil mais prevalente, é também a que apresenta um maior número de ensaios clínicos de terapias genéticas desenhadas para o seu tratamento. Contudo, o gene mais comumente afetado nesta patologia, o *ABCA4*, tem uma dimensão consideravelmente elevada (6.8 kilobases), pelo que os AAVs não podem ser diretamente utilizados de forma isolada, já que estes possuem uma capacidade de carga inferior à necessária para transportar o gene afetado.<sup>(19, 20)</sup> Assim, foi necessário recorrer a estratégias diferentes para o desenvolvimento de terapêuticas genéticas eficazes para o tratamento desta patologia.

#### **Vetores virais**

Em 2011, um ensaio clínico com recurso a terapia de substituição genética foi realizado com a participação de 22 indivíduos diagnosticados com STGD1 (NCT01367444). Neste ensaio foi utilizado como vetor um lentivírus (SAR422459), um vírus da anemia infecciosa equina recombinante (EIAV) que expressa uma versão funcional do gene afetado nesta doença, o *ABCA4* (EIAV-*ABCA4*).<sup>(15, 20, 21)</sup> Neste estudo, apesar de no follow-up de 3 anos ter sido possível observar em alguns dos pacientes uma estabilização e até alguma melhoria da acuidade visual e da estrutura da retina, o facto deste ter poucos participantes e não ter sido sujeito a revisão por pares leva a que não seja possível retirar conclusões definitivas sobre a eficácia apresentada.<sup>(20)</sup> Assim, seria necessário realizar estudos com um maior número de participantes para confirmar a capacidade desta terapia com o EIAV-*ABCA4* de atrasar a progressão da doença ou até mesmo estabilizá-la.<sup>(15, 20)</sup> Adicionalmente, no que concerne à segurança deste tratamento, todos os 22 pacientes apresentaram pelo menos um efeito adverso resultante deste tratamento mas a larga maioria foram considerados como moderados e relacionados com o procedimento cirúrgico para administração do vetor ou então devido à resposta imune associada ao tratamento. Assim, para além de estudos com um maior número de participantes, os autores referiram que estudos futuros deveriam ser mais longos, ter como objetivo explorar a dose ideal de EIAV-*ABCA4* a administrar, a melhor via de administração, investigar a possibilidade de combinar esta terapia com outras existentes, avaliar a resposta em outros subtipos da Doença de Stargardt que afetam genes diferentes e ainda tentar

aplicar este tratamento em doentes numa fase mais precoce da doença já que, neste estudo, os paciente já apresentavam danos na retina irreversíveis.<sup>(15, 22)</sup> Contudo, apesar dos lentivírus terem capacidade para o gene *ABCA4*, o seu tamanho e estrutura limitam a capacidade de transdução na retina e, não existindo dados robustos suficientes sobre a eficácia e segurança da terapia genética com recurso a este tipo de vetores, o interesse na utilização de lentivírus tem diminuído.<sup>(20)</sup>

A diminuição da investigação do uso de lentivírus foi acompanhada por um aumento do interesse no uso de vírus adeno-associados como vetores, já que estes foram utilizados anteriormente com bons resultados no tratamento de outras patologias. No entanto, tal como anteriormente descrito, o tamanho do gene *ABCA4* constitui um problema no que concerne à utilização de AAVs como vetores. Deste modo, de forma a contornar este obstáculo, diferentes estratégias de vetores duplos foram desenvolvidas. Estas estratégias consistem na divisão do gene a transferir, neste caso o *ABCA4*, sendo este dividido entre dois vetores AAV e, posteriormente, ocorre a recombinação intracelular e formação da proteína funcional. Inicialmente, foram estudadas duas abordagens em modelos animais: vetores com regiões sobrepostas e vetores de *trans-splicing*. Contudo, isoladamente, estas técnicas não demonstravam eficácia suficiente para serem utilizadas como vetores. Deste modo, foi desenvolvida a estratégia híbrida que corresponde à utilização de princípios dos vetores com regiões sobrepostas e vetores de *trans-splicing* em simultâneo. Esta técnica permitiu obter uma maior taxa de produção da proteína *ABCA4* completa e um melhor desempenho na redução da lipofuscina. Mais recentemente, foi proposta uma quarta estratégia, sendo esta baseada em inteínas, a qual permite a reconstituição da proteína *ABCA4* diretamente a nível pós-trasducional. Este método demonstrou, em modelos animais *knock-out* para *ABCA4*, a produção da proteína completa funcional, bem como uma redução significativa na acumulação de lipofuscina.<sup>(20, 23)</sup> Embora os dados disponíveis ainda sejam de ensaios pré-clínicos e não seja possível retirar conclusões definitivas, os resultados são consistentes e promissores, possibilitando o início de ensaios clínicos em humanos. Contudo, é necessário demonstrar inequivocamente que estas estratégias são eficazes isoladamente e também quando usadas de forma combinada. Assim, ainda que as estratégias de vetores duplos sejam menos eficazes do que a utilização isolada de AAVs, uma vez que a STGD1 é uma doença que evolui lentamente, é lícito inferir que mesmo uma expressão reduzida do gene *ABCA4* pode ser benéfica no tratamento desta distrofia macular.<sup>(20)</sup>

Um outro ensaio clínico iniciado em 2022 (NCT04919473) tinha como objetivo avaliar a segurança e eficácia inicial de uma terapia genética com recurso a um AAV. No entanto, este vetor não continha o gene *ABCA4* mas sim uma opsina multicaracterística tipo I (vMCO-I), sendo que esta tinha uma dimensão mais reduzida e, por isso, podia ser utilizado um AAV. Esta técnica foi

inicialmente aplicada em 11 indivíduos de forma a avaliar a segurança da mesma. Posteriormente, foi conduzido um outro ensaio clínico (STARLIGHT, NCT05417126) com a participação de 6 indivíduos no qual foi testada a segurança e eficácia da uma injeção de vMCO-010. Os indivíduos participantes no ensaio tinham todos sido diagnosticados com STGD1 devido a mutações nos genes *ABCA4*, *ELOVL4* e *PROM1*. Os resultados preliminares deste ensaio clínico revelados em 2023 demonstraram uma melhoria média de 3 decibéis na sensibilidade do campo visual, avaliada por perimetria, e não se registaram eventos adversos graves associados à terapia genética. <sup>(15, 24, 25)</sup>

### **Vetores não virais**

De forma a evitar a resposta imunológica causada pelos vírus utilizados como vetores e ainda de forma a contornar a limitação do tamanho dos genes, as nanopartículas têm sido estudadas como uma alternativa de vetores. Uma vez que estas são estruturas artificiais, as nanopartículas não causam normalmente respostas imunitárias indesejadas, sendo bem toleradas pelo organismo. Estes vetores envolvem o material genético inserido e protegem-no, facilitando a sua entrada nas células por endocitose ou mecanismos mediados por recetores. As primeiras nanopartículas utilizadas para entrega do gene *ABCA4* em modelos animais permitiram a expressão da proteína *ABCA4* durante até 8 meses e a redução da lipofuscina acumulada. Mais recentemente, foi desenvolvido um novo tipo de nanopartículas que se auto-organizam com o DNA plasmídico e promovem a libertação do transgene no citosol celular através de mecanismos de escape endossomal e clivagem redutiva.<sup>(20)</sup> A aplicação destas nanopartículas sob o controlo do promotor da rodopsina bovina (RHO) em animais levou a uma expressão aumentada do gene *ABCA4* e, ainda que não existam registos da expressão da proteína codificada pelo gene afetado, foi observada uma diminuição da lipofuscina acumulada. Deste modo, este vetor parece ser uma opção viável para o tratamento da STGD1, ainda que seja necessário estudar a sua segurança, já que a mesma não foi avaliada neste ensaio clínico.<sup>(20)</sup> Mais recentemente, um novo estudo com recurso a estas nanopartículas associadas a um plasmídeo contendo o gene *ABCA4* sob o controlo do promotor específico para fotorreceptores humanos GRK1, juntamente com um potenciador S/MAR, demonstrou a expressão de *ABCA4* funcional e redução de A2E em 69% em modelos animais e em células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs). Assim este ensaio pré-clínico demonstrou que esta estratégia pode ser eficaz como uma terapia genética não viral para STGD1, justificando o avanço para ensaios clínicos.<sup>(26)</sup>

### **Anti-sense oligonucleotides como moduladores de RNA**

Outra estratégia a ser estudada é a da utilização de oligonucleótido antisense, (*Anti-sense oligonucleotides* ou AONs), que são pequenos fragmentos de nucleótidos artificiais de cadeia simples que atuam como moduladores do RNA. Estes ligam-se a sequências complementares de mRNA ou pré-mRNA e permitem o bloqueio do *splicing* patológico em locais intrónicos profundos e a indução do *skipping* de exões para evitar a produção de proteínas tóxicas.<sup>(20)</sup> Esta técnica já foi utilizada com segurança e eficácia num ensaio clínico para o tratamento da amaurose congénita de Leber, sendo que os participantes apresentaram melhorias na acuidade visual e não foram registados eventos adversos graves. Os resultados deste ensaio clínico indicam que a utilização de AONs na Doença de Stargardt pode ser bem-sucedida, principalmente nos casos em que o gene afetado é o *ABCA4*. De facto, alguns ensaios pré-clínicos demonstraram que mutações intrónicas profundas no gene *ABCA4* respondem positivamente à terapia com AONs. Existe ainda uma nova estratégia com recurso a AONs que envolve a edição de RNA mediada por enzimas endógenas chamadas ADARs (adenosina desaminases que atuam no RNA). No entanto, são necessários mais estudos para confirmar a expressão de ADARs nas células da retina para ser possível compreender se esta técnica tem interesse no tratamento da STGD1.<sup>(20)</sup> Adicionalmente, um artigo de 2024 dá conta que foi desenvolvido um sistema inovador com o objetivo de corrigir mutações no gene *ABCA4* que permite a entrega simultânea de múltiplos AONs usando um único vetor baseado no U7snRNA. Essa estratégia inovadora combinou a modulação do *splicing* com um sistema de múltiplos alvos, de forma a tratar diversos defeitos ao mesmo tempo. Contudo os resultados obtidos não são conclusivos, sendo que o estudo não foi testado em modelos que mimetizem corretamente o ambiente retiniano humano. Assim, embora promissora, esta abordagem requer validação adicional e será necessário realizar diversos estudos de forma a ultrapassar as limitações técnicas descritas.<sup>(27)</sup>

### **O C3DNA como plataforma de terapia genética**

O DNA circular e covalentemente fechado, ou C3DNA, é uma plataforma de terapia genética desenhada para a administração de genes de grandes dimensões, permitindo que este processo seja repetido mais do que uma vez. Esta técnica não recorre ao uso de vírus e por isso elimina o risco de resposta imunológica associada à utilização destes vetores. O método de entrega destes genes é denominado COMET e utiliza elétrodos especializados e campos elétricos para introduzir material genético nas células. A utilização desta estratégia em modelos animais permitiu a expressão sustentada do *ABCA4* durante pelo menos 6 meses, após uma única administração deste

mesmo gene. Tendo em conta estes resultados, já estão planeados ensaios clínicos num futuro próximo.<sup>(25)</sup>

### Edição genética e iPSCs

No início de 2025, um artigo publicado referiu que tinha sido possível a correção de uma mutação no gene *ABCA4* em modelos de células estaminais pluripotentes induzida através da ferramenta de edição CRISPR/Cas9. Posteriormente, as células foram diferenciadas em células retinianas, tal como fotorreceptores, tendo estas recuperado várias funções normais que estavam comprometidas nas células não editadas. Assim, esta estratégia pode abrir um novo caminho no tratamento da STGD1, sendo necessários mais estudos e o desenho de protocolos em modelos animais.<sup>(28)</sup> Num outro estudo que também recorreu a iPSCs, os autores conseguiram corrigir duas variantes patogénicas do gene *ABCA4* associadas à STGD1, através de técnicas de CRISPR/Cas9 mediadas por ssODNs (oligonucleotídeos de cadeia simples de DNA), realçando o potencial desta ferramenta no tratamento da STGD1.<sup>(29)</sup>

Um outro estudo realizado em modelos animais e celulares conseguiu corrigir a mutação p.Gly1961Glu do gene *ABCA4*, através da introdução de uma ferramenta denominada edição de bases (*base-editor*), uma técnica relacionada com a ferramenta CRISPR/Cas9 que permite a alteração pontual de uma base mutada no DNA sem provocar quebras na dupla hélice. De forma a introduzirem esta ferramenta, os investigadores recorreram a um AAV, formando o vetor AAV5-v1-SABE1, que foi posteriormente otimizado, criando o AAV5-v2-SABE1. Esta estratégia foi eficaz na correção da mutação através da correção precisa da base numa elevada percentagem das células-alvo, mas não foi possível avaliar o efeito funcional, uma vez que os modelos utilizados não exibem o fenótipo clínico provocada por esta mutação nos humanos. Contudo, os autores acreditam que a correção da mutação levaria a efeitos benéficos no tratamento da Doença de Stargardt. Assim, apesar de serem necessários mais estudos para avaliar a eficácia e segurança desta abordagem, esta pode ser uma estratégia eficaz no tratamento de vários tipos de distrofias maculares.<sup>(28)</sup> Um outro estudo focou-se em estratégias para aumentar a eficácia desta ferramenta, demonstrando que inibidores da HDAC6 (Desacetilase de Histonas tipo 6), como o Nexturastat A e o Ricolinostat, podem ser benéficos ao potenciar a edição genética. Em modelos celulares humanos com mutações no gene *ABCA4*, o Ricolinostat aumentou a eficiência da edição por *base-editing* em mais de três vezes. Assim, a combinação de editores de base com moduladores epigenéticos pode ser fulcral no desenvolvimento de terapias baseadas em edição genética mais eficazes para o tratamento de distrofias hereditárias da retina.<sup>(30)</sup>

## Terapias genéticas na Doença de Best

À data, não existem ensaios clínicos a decorrer para o tratamento da Doença de Best, ainda que os ensaios pré-clínicos tenham demonstrado resultados promissores. O facto de não existirem atualmente estudos a decorrer pode, em grande parte, ser explicado pelo facto desta distrofia macular ser causada por uma mutação num único *locus*, levando a que o estudo desta patologia seja difícil quando os modelos animais não exibem as características fundamentais desta distrofia macular.<sup>(31)</sup> Contudo, a descoberta de um modelo canino da Doença de Best gerou a possibilidade de iniciar estudos pré-clínicos, uma vez que este apresenta manifestações semelhantes à doença presente nos humanos, incluindo a predileção das lesões sub-retinianas pela região macular.<sup>(31, 32)</sup>

### Vetores virais

Em 2025, foi publicado um ensaio pré-clínico com modelos animais portadores de mutações no gene *BEST1*. Devido à confiança e conhecimento dos AAVs, os investigadores recorreram a este mesmo vetor e desenvolveram o AAV2/2-*VMD2*, sendo que este continha versões funcionantes do gene *BEST1* canino ou humano. Nos olhos aos quais foi administrado este vetor foi possível observar uma regressão das lesões existentes, sendo que esta alteração se manteve estável. Adicionalmente, não foram identificadas elevações, anormalidades na retina ou respostas inflamatórias. Em contraste, nos olhos não tratados, ocorreu a progressão normal das lesões, confirmando a eficácia do tratamento com estes vetores no modelo canino. Para além disso, após a aplicação desta terapia genética comprovou-se a correção dos microdescolamentos entre o EPR e os fotorreceptores e o estabelecimento da expressão da proteína bestrofina-1 no EPR, pelo que esta estratégia terapêutica pode não só interromper, mas também reverter os danos causados pela doença em estádios específicos. Assim, apesar de existirem diferenças entre a Doença de Best em modelos caninos e em humanos, tal como o facto de a doença em cães ser autossómica recessiva, as manifestações desta distrofia macular são semelhantes em ambas as espécies, sendo, por isso, este um modelo altamente relevante para o desenvolvimento de terapias genéticas para a doença em humanos. Deste modo, os investigadores consideram ser possível realizar ensaios clínicos de fase I/II num futuro próximo.<sup>(32, 33)</sup>

### iPSCs como modelos

Outra alternativa são os estudos *in vitro*. Estes permitem contornar a limitação de a doença nos modelos caninos não representar fidedignamente a Doença de Best. Deste modo, os modelos celulares derivados de doentes permitem a análise funcional direta de variantes patogénicas humanas, com recurso a iPSCs, diferenciadas em células do epitélio pigmentar da retina (iPSC-RPEs), sendo estas obtidas a partir de fibroblastos.<sup>(34)</sup> Adicionalmente, estudos anteriores com recurso a modelos com EPR de doentes demonstraram boa resposta à terapia de substituição genética com recurso a baculovirus, AAVs e lentivírus como vetores, nos casos em que não existe ganho de função com o gene, sendo que estes correspondem à maioria dos casos.<sup>(35)</sup> Contudo, as variantes que consistem num mecanismo de ganho de função não podem ser tratadas através desta técnica, uma vez que demonstram um efeito dominante negativo (*dominant negative*). Nestes casos em específico, de forma a desenvolver um tratamento eficaz ter-se-ia de ou silenciar o alelo mutado do gene ou então silenciar de forma não seletiva ambos os alelos endógenos e administrar o vetor com a versão funcionante do *BEST1*. Neste sentido, foi estudada uma estratégia com recurso à ferramenta CRISPR/Cas9 em conjunto com a administração do gene funcionante, tendo esta apresentado bons resultados, sendo, por isso, uma possibilidade de tratamento destes casos.<sup>(33)</sup>

#### **Técnicas para o tratamento da CNV**

É ainda importante realçar que existem estudo *in vivo*, em modelos animais, e *in vitro* que tiveram como objetivo testar o potencial da aplicação da tecnologia de CRISPR/Cas9 para a ablação específica do gene *VEGFA* nas células do EPR no tratamento da neovascularização coroideia, sendo esta uma complicação dos estadios avançados da Doença de Best. Estes ensaios demonstraram resultados promissores com regressão da CNV, evidenciando o potencial das estratégias de edição genética para controlar complicações neovasculares secundárias, que podem complementar terapias genéticas direcionadas às mutações do gene *BEST1*.<sup>(36)</sup> Outra estratégia desenvolvida para o tratamento desta complicação envolveu o uso de AAVs como vetores para a supressão da neoangiogénese, proporcionando um efeito terapêutico mais eficaz e duradouro em comparação com a administração repetida de injeções de agentes anti-VEGF.<sup>(37)</sup>

#### **Terapias genéticas na Retinosquiasis ligada ao X**

##### **Vetores virais**

Atualmente, existem diversas terapias genéticas a ser estudadas para o tratamento da Retinosquiasis ligada ao X. O gene afetado, o *RS1*, é de pequenas dimensões, sendo, por isso, possível utilizar os AAVs como vetor. Os modelos animais e celulares mostraram que o uso de injeções à base de AAVs com versões funcionantes do gene *RS1* eram seguras e apresentavam resultados promissores.<sup>(38-40)</sup> Posteriormente, foram montados dois ensaios clínicos com recurso a dois vetores, o AAV8-*RS1* e o AAV2tYF-CB-h*RS1*. Estes ensaios foram, de forma geral, bem tolerados, mas, em doses mais elevadas, a administração deste vetor provocou reações inflamatórias mais marcadas, ainda que fosse possível controlar esta inflamação com recurso a terapia imunossupressora tópica e oral.<sup>(9, 38, 41, 42)</sup> Contudo, não se observaram melhorias na acuidade visual dos participantes, sendo que este dado pode ser explicado pelo facto de estes vetores terem sido administrados através de injeções intravítreas. Uma outra hipótese que pode explicar esta menor eficácia pode ser a existência de um estado pro-inflamatório associado à doença, levando a que, após a administração das injeções intravítreas, ocorra uma resposta imune marcada. Deste modo, tendo em conta as limitações deste tipo de injeções, recentemente tem ocorrido o desenvolvimento de terapias genéticas com recurso a abordagens sub-retinianas, existindo atualmente um ensaio pré-clínico que utiliza um capsídeo AAV44.9 que demonstrou uma maior eficácia com doses inferiores de vetor, sendo que, se for bem-sucedido em ensaios clínicos humanos, poderá ser utilizado no tratamento da XLRS mas também de outras distrofias maculares.<sup>(38)</sup>

Um outro estudo realizado em 2023 realçou que o facto de esta distrofia macular apresentar uma evolução lenta pode levar a que não seja possível observar melhorias na acuidade visual num curto espaço de tempo tal como aconteceu nos estudos anteriormente descritos. Assim, os autores sugerem que os estudos tenham uma duração mais prolongada e que os participantes escolhidos sejam mais jovens, com genótipos nulos, ou seja, sem que haja ganho de função, tenham uma estrutura retiniana externa preservada e acuidade visual normal ou quase normal no início do ensaio clínico.<sup>(43, 44)</sup>

Outro vetor testado foi o AAV2/4-*RS1* com um promotor citomegalovírus, tendo este sido testado em modelos animais com injeções intravítreas e sub-retinianas. De forma semelhante ao anteriormente descrito, o vetor utilizado demonstrou segurança e resultados positivos, com expressão da *RS1* detetada na retina interna nos olhos tratados por via intravítrea e na retina externa nos tratados por via sub-retiniana, bem como melhoria da acuidade visual. Adicionalmente, verificou-se que a via de injeção sub-retiniana é mais eficaz quando comparada com a intravítrea, mas apresenta mais riscos associados, como a possibilidade de descolamento de retina.<sup>(41)</sup>

Mais recentemente, foi desenvolvido o vetor AAV.IVT18, que demonstrou maior segurança e eficácia comparativamente aos anteriores, sugerindo ser uma prometedora ferramenta

terapêutica para a XLRS. Contudo, são necessários ensaios clínicos para confirmar a sua eficácia em humanos.<sup>(40)</sup>

### **Organoides como modelos para o desenvolvimento de vetores virais**

Numa perspetiva de criar modelos mais semelhantes ao humano, foram desenvolvidos organoides de retina através de células estaminais pluripotentes induzidas de doentes com uma mutação comum no gene *RS1* (E72K), sendo que estes organoides mimetizam a estrutura e funcionamento da retina humana. Posteriormente, administrou-se o vetor AAV2.7m8-*RS1* e verificou-se a expressão da proteína RS1. Adicionalmente, verificou-se que nestes modelos, a administração precoce do vetor conduzia a resultados mais favoráveis. Este estudo levanta, contudo, algumas limitações tal como o facto de estes modelos não apresentarem, por exemplo, uma monocamada de EPR, tal como ocorre no olho humano. Assim, o desenvolvimento de modelos mais avançados é necessário para melhor avaliar esta estratégia terapêutica, ainda que estes dados sejam promissores para estudos futuros.<sup>(45)</sup> Outros modelos foram também criados a partir de células mononucleares do sangue periférico de um paciente com XLRS, criando a linha de iPSCs denominada ZOCi004-A, mantendo esta a mutação no gene *RS1*, permitindo que esta linha seja usada como modelo em estudos futuros.<sup>(46)</sup>

### **Discussão**

As distrofias maculares tal como a Doença de Stargardt, a Doença de Best e a Retinosquiasis ligada ao X representam um grupo complexo e heterogéneo de doenças retinianas que comprometem gravemente a qualidade de vida dos doentes ao provocarem a perda progressiva de visão central numa idade precoce.<sup>(1, 2)</sup> Adicionalmente, as estratégias terapêuticas até à presente data mostraram-se manifestamente escassas e ineficazes no controlo da progressão das distrofias maculares, focando-se quase exclusivamente no controlo da sintomatologia provocada.<sup>(3, 7)</sup> Deste modo, os avanços nas técnicas de edição genética, que possibilitaram um rápido desenvolvimento de terapias genéticas, parecem ser a chave para o desenvolvimento de tratamentos que permitam o controlo eficaz destas patologias. Estas terapias genéticas emergem, assim, como uma abordagem terapêutica revolucionária que prometem corrigir diretamente o defeito molecular subjacente à doença. Neste sentido, as distrofias maculares são cada vez mais alvo de investigação e ensaios pré-clínicos e clínicos, dada a sua prevalência e a diminuição da qualidade de vida dos doentes, bem

como a possibilidade de aplicação destas terapias devido às características da doença e às condições especiais do olho enquanto alvo de terapias genéticas.

Começando com a Doença de Stargardt, tal como mencionado anteriormente, esta é a forma mais comum de distrofia macular juvenil, sendo causada predominantemente por mutações bialélicas no gene *ABCA4*. A deficiência funcional deste gene leva à acumulação de subprodutos tóxicos, causando danos progressivos no EPR, levando à perda de acuidade visual.<sup>(9)</sup>

O principal problema associado ao desenvolvimento de terapias genéticas para o tratamento da STGD1 prendem-se com o tamanho do gene *ABCA4*. De facto, este ultrapassa a capacidade máxima dos AAVs. Estes são considerados como os vetores mais seguros e eficazes, sendo aqueles sobre os quais incidem o maior número de investigações. Assim, foi necessário contornar esta limitação, tendo sido aplicadas diferentes estratégias.<sup>(18, 19, 47)</sup>

Por um lado, em 2011 foi experimentado como vetor um lentivírus, uma vez que este tinha capacidade suficiente para acomodar a informação genética a ser transmitida. Deste modo, foi utilizado mais especificamente um EIAV. O vírus em questão, o EIAV-*ABCA4*, até produziu alguma melhoria na acuidade visual e da estrutura da retina mas todos os pacientes registaram efeitos adversos. Assim, devido às características intrínsecas dos lentivírus aliado ao facto de não existirem dados suficientes para comprovar a eficácia e segurança dos mesmos, o uso de lentivírus como vetores foi parcialmente abandonado, já que os diferentes estudos se focaram noutros vetores.<sup>(15, 20)</sup> Contudo, seria relevante aproveitar os dados recolhidos até à data e, no futuro, com os constantes avanços nas técnicas genéticas, aproveitar as informações obtidas e talvez visitar os lentivírus como armas terapêuticas.

Por outro lado, foram testadas diferentes estratégias de vetores duplos, recorrendo à divisão do gene *ABCA4* e entrega do mesmo por mais do que um vetor AAV e a sua posterior reconstituição *in vivo* por recombinação homóloga, *trans-splicing* ou estratégias híbridas. Esta última conduziu a bons resultados em modelos animais. Uma quarta estratégia para restaurar o gene *ABCA4* com recurso a inteínas demonstrou também ela ser eficaz em modelos animais. Contudo, ainda existem algumas barreiras à utilização destas abordagens tal como dificuldades da co-transdução e na estabilidade da proteína reconstituída. Ainda assim, esta parece ser uma via promissora, tendo até em conta a experiência existente com os AAVs.<sup>(20, 23)</sup>

Uma terceira via com recurso à ferramenta de edição genética CRISPR/Cas9 parece ser bastante interessante, existindo já diversos estudos que demonstraram bons resultados na correção de mutações no gene *ABCA4* em modelos de células iPSCs. Adicionalmente, a utilização da ferramenta de edição de bases, que está relacionada com a ferramenta CRISPR/Cas9, associada à utilização de um AAVs como vetor (AAV5-v2-SABE1) demonstrou bons resultados em modelos

celulares. Também a associação destas técnicas com a utilização de inibidores da HDAC6, demonstrou benefícios no aumento da eficácia da edição genética. Deste modo, a partir destas ferramentas pode ser possível desenvolver terapêuticas eficazes, sendo que a utilização simultânea de diferentes técnicas pode ser altamente benéfica no aumento da eficácia do tratamento.<sup>(28, 30)</sup>

O uso de compostos não virais tal como nanopartículas, os oligonucleótido antisense e a plataforma C3DNA demonstraram todos eficácia na expressão do *ABCA4* e estudos futuros podem ajudar a melhor compreender a segurança e eficácia destes. Assim, estão já planeados ensaios clínicos que visam obter um maior e melhor conhecimento sobre estas abordagens, revelando a confiança existente nestas armas terapêuticas. Contudo, não existem atualmente ensaios clínicos com recurso a estes vetores pelo que a possibilidade da sua utilização em contextos reais é, ainda, desconhecida.<sup>(20, 25-27)</sup>

Deste modo, é factual que os estudos pré-clínicos demonstraram a possibilidade de reduzir a acumulação de lipofuscina e preservar a integridade retiniana através destas estratégias. Um dos maiores desafios no desenvolvimento de terapias genéticas para o tratamento da STGD1 será mesmo garantir a entrega eficaz do material genético e obter respostas sustentadas ao longo do tempo. Para além disso, as evidências em ensaios clínicos ainda são muito limitadas, reforçando a necessidade do desenvolvimento de protocolos clínicos e vetores adaptados de forma a obter terapias genéticas seguras e eficazes.

Relativamente à Doença de Best, esta caracteriza-se de uma forma geral pela acumulação de lipofuscina na mácula como resultado de uma mutação no gene que codifica a bestrofina-1, o *BEST1*. Ao contrário do que acontece como *ABCA4*, este gene é de reduzidas dimensões, permitindo assim a utilização dos AAVs.<sup>(11)</sup>

Com recurso ao *AAV2/2-VMD2* em modelos caninos, o qual contém uma versão funcionante do gene *BEST1*, foi possível observar a regressão de lesões causadas por esta distrofia macular nos olhos tratados com este vetor. Nos olhos onde o *AAV2/2-VMD2* não foi administrado ocorreu a progressão natural da doença. Desta forma, esta terapia genética apresentou bons resultados neste modelo, tendo ainda apresentado um bom perfil de segurança. Os autores reportaram ainda que foi observada a reversão de danos causados pela doença em algumas fases desta. No entanto, é importante realçar que a doença no modelo canino não é exatamente igual à doença no humano, sendo necessários mais estudos para avaliar a eficácia desta terapia. Ainda assim, os dados obtidos permitem inferir que esta estratégia deverá ser benéfica no tratamento da Doença de Best em humanos, estando já previstos ensaios clínicos com recurso a esta técnica.<sup>(32, 33)</sup>

Os estudos *in vitro* com célula iPSCs também demonstraram resultados promissores no tratamento de mutações que não conduziam a um ganho de função. Nestes recorreu-se a diversos

vetores e foi possível testar este tipo de terapêuticas em modelos mais próximos do humano. Já em modelos em que a mutação confere um ganho de função, a estratégia testada passou pela tentativa de, através da ferramenta de edição genética CRISPR/Cas9, silenciar o alelo mutado do gene ou então silenciar de forma não seletiva ambos os alelos endógenos e simultaneamente proceder à administração do vetor com a versão funcionante do *BEST1*. Esta estratégia apresentou também bons resultados, sendo que o desenho de um ensaio clínico pode ajudar a comprovar a viabilidade desta estratégia.<sup>(33-35)</sup>

Ainda assim, não existem atualmente ensaios clínicos de terapias genéticas para o tratamento da Doença de Best, pelo que será necessário ainda algum tempo e numerosos estudos até existirem avanços significativos no desenvolvimento de terapias genéticas focadas no tratamento desta distrofia macular.

Por fim, a Retinosquiasis ligada ao X caracteriza-se por mutações no gene *RS1*. Esta mutação afeta a retinosquiasina, levando à separação das camadas internas da retina com formação de cavidades císticas. À semelhança do que acontece na doença de Best, o gene afetado é de pequenas dimensões, levando a que a utilização de AAVs seja bastante comum na tentativa de desenvolver terapias genéticas eficazes.<sup>(10, 13)</sup>

Alavancados pelos resultados positivos de ensaios pré-clínicos, foram montados ensaios clínicos com recurso a dois vetores, o AAV8-*RS1* e o AAV2tYF-CB-h*RS1*. Em doses mais baixas, a administração destes vetores demonstrou ser bastante segura. No entanto, não se verificaram melhorias na acuidade visual dos participantes. Este facto pode ser explicado pela via de injeção intravítrea e pelo estado pró-inflamatório da retina. Mais recentemente, um estudo permitiu também compreender que possivelmente esta aparente ausência de resposta pode ser justificada pela evolução lenta da patologia em estudo, pelo que o desenvolvimento de ensaios clínicos mais longos poderá levar à demonstração de uma melhoria da acuidade visual. Ainda assim, é também importante o diagnóstico precoce da XLRs já que uma estrutura retiniana externa danificada pode comprometer o sucesso deste tratamento. Adicionalmente, a alteração da via de administração para sub-retiniana pode constituir uma vantagem considerável no aumento da eficácia desta estratégia terapêutica, tal como foi demonstrado em estudos pré-clínicos com recurso ao capsídeo AAV44.9.<sup>(38, 41, 42)</sup>

Um outro vetor testado, o AAV2/4-*RS1* com um promotor citomegalovírus, também conduziu à expressão da *RS1*, sendo que as injeções por via sub-retiniana aparentam ser mais eficazes, mas com mais riscos associados comparativamente à via intravítrea<sup>(41)</sup>.

Contudo, o vetor AAV.IVT18 estudado mais recentemente parece ser o mais vantajoso uma vez que apresenta maior segurança e eficácia do que qualquer outro vetor testado na Retinosquias ligada ao X.<sup>(40)</sup>

Todos estes estudos preparam o terreno para ensaios clínicos futuros mais eficazes, que poderão tornar a terapia genética da XLRs numa opção clínica válida.

Na tabela II encontram-se resumidas as principais vantagens, limitações e o estado de desenvolvimento dos vetores virais, não virais e edição genética.

O desenvolvimento das terapias genéticas para cada uma das distrofias maculares mencionadas está interligado, refletindo avanços e desafios partilhados entre as várias patologias. De facto, uma vez que existe partilha de mecanismos e vetores entre as diferentes abordagens, o conhecimento obtido a partir de um estudo específico de uma destas patologias pode ser igualmente relevante para a descoberta de novas estratégias focadas noutras distrofias maculares ou até de outras doenças hereditárias. Para além disso, a maioria dos desafios encontrados pelos autores dos artigos de todas as distrofias maculares são idênticos. Entre estes desafios destacam-se:

- A dificuldade na entrega e penetração do vetor como consequência da barreira anatómica da retina. Neste sentido, compreende-se que a via intravítrea apresente uma taxa de eficácia menor, uma vez que o material administrado nesta técnica tem mais dificuldade em alcançar camadas profundas como o EPR, os fotorreceptores e células bipolares. As injeções sub-retinianas por sua vez são mais eficazes nesta tarefa mas a sua aplicação acarreta uma prática mais invasiva e associada à ocorrência de mais efeitos adversos;
- A expressão sustentada no tempo parece ainda ser uma limitação significativa destas abordagens;
- A dosagem necessária para provocar efeitos terapêuticos é ainda desconhecida, podendo levar à ocorrência de toxicidade;
- A resposta imune compromete a eficácia e a segurança dos vetores virais;
- A dificuldade na avaliação da eficácia no âmbito clínico das terapias genéticas bem como de biomarcadores, existindo diversos estudos que se focam na definição destes parâmetros;
- A heterogeneidade de mutações implica o recurso a estratégias personalizadas.

Deste modo, os resultados referentes às três distrofias maculares discutidos nesta tese evidenciam avanços significativos no desenvolvimento de terapias genéticas para o tratamento destas doenças, com principal destaque para o uso de vetores virais tal como os AAVs, que já atingiram estádios avançados de desenvolvimento clínico. A eficácia demonstrada na entrega do gene através destes vetores e a capacidade de manutenção da expressão do mesmo sugere que

estas estratégias podem ter um impacto clínico potencialmente transformador no âmbito das distrofias maculares, oferecendo esperança para o tratamento de doenças anteriormente incuráveis. Contudo, as limitações identificadas inerentes aos vetores virais, tal como o risco de imunogenicidade e a capacidade limitada destes vetores, representam desafios que ainda precisam de ser ultrapassados de forma a garantir a segurança e eficácia a longo prazo. Assim, é relevante reforçar a importância de continuar a pesquisa de alternativas tal como os vetores não virais e de tecnologias de edição genética, como o CRISPR/Cas9, que, apesar de ainda estarem numa fase pré-clínica ou inicial em ensaios clínicos, apresentam um elevado potencial para tratamentos mais personalizados e duradouros.

No entanto, embora promissoras, a maioria dos estudos anteriormente mencionados requerem a execução de mais estudos para validar a segurança, eficácia e viabilidade clínica das terapias genéticas, especialmente no contexto das distrofias maculares, caracterizadas por uma elevada heterogeneidade genética e fenotípica. Assim, observa-se que é necessária uma abordagem multidisciplinar para permita a implementação clínica das terapias genéticas, de forma a que os avanços observados até aqui se traduzam efetivamente em benefícios clínicos para os doentes.

A área das terapias genéticas está em rápida evolução, permitindo o desenvolvimento de estratégias capazes de contornar os constantes desafios encontrados. Por um lado, espera-se que decorram diversos ensaios clínicos que se irão traduzir em novos conhecimentos, possibilitando o aperfeiçoamento das técnicas a ser testadas e, possivelmente, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Por outro lado, a constante pesquisa de novas armas terapêuticas tal como vetores com maior capacidade, mais eficazes e com melhores perfis de segurança pode permitir o desenvolvimento de novas terapias genéticas. Também os constantes avanços na ferramenta CRISPR/Cas9 podem constituir no futuro um tratamento permanente. Adicionalmente, existem modelos pré-clínicos cada vez mais avançados tal como os organoides retinianos derivados de células iPSCs, os quais permitem estudar as estratégias terapêuticas de forma mais rápida e precisa. O recurso a terapias combinadas também irá contribuir para um melhor tratamento. Por fim, a inteligência artificial também promete vir revolucionar o desenvolvimento de terapias genéticas, existindo neste momento artigos cujo foco se prende com a utilização desta ferramenta de forma a avaliar a eficácia do tratamento.<sup>(48)</sup>

Apesar do esforço para realizar uma revisão abrangente e atualizada, este trabalho apresenta algumas limitações metodológicas que devem ser reconhecidas. Em primeiro lugar, pode ter ocorrido viés de publicação, uma vez que estudos que apresentem resultados negativos ou inconclusivos tendem a ser menos frequentemente publicados, influenciando, assim, a perceção da

eficácia das terapias genéticas. Para além disso, esta revisão incluiu apenas artigos redigidos em inglês, o que pode ter levado à exclusão de dados relevantes publicados noutras línguas. Adicionalmente, dado o ritmo acelerado de desenvolvimento nesta área, é possível que estudos muito recentes, particularmente pré-publicações ou artigos aceites mas ainda não indexados nas bases de dados consultadas, não tenham sido incluídos, o que poderá afetar a atualidade de algumas das conclusões apresentadas. Por fim, uma vez que muitos estudos estão em fase inicial, não é possível inferir acerca dos efeitos e eficácia das terapias genéticas a longo prazo. Assim, estas limitações devem ser tidas em conta na interpretação dos dados obtidos nesta tese.

### **Recomendações para investigações futuras**

Ao longo desta tese, foram realçados alguns fatores que constituíram entraves na obtenção de alguns dados referentes às terapias genéticas atualmente em desenvolvimento. Neste sentido, seria relevante em estudos futuros realizar protocolos mais prolongados para monitorizar os efeitos adversos, a durabilidade da resposta terapêutica e a qualidade de vida dos pacientes tratados com terapias genéticas. Além disso, será essencial desenvolver técnicas e metodologias capazes de melhor avaliar a eficácia de cada terapêutica, permitindo a comparação direta entre as diferentes técnicas, e identificar biomarcadores específicos que permitam um diagnóstico precoce dos doentes e o acompanhamento da resposta terapêutica. Importa ainda salientar que os ensaios clínicos realizados até à data têm incluído amostras reduzidas e com características muito específicas, o que limita a generalização dos resultados, pelo que seria benéfico a inclusão em estudo de pacientes em diferentes estadios da doença. Por fim, destaca-se a atual escassez de iniciativas direcionadas ao desenvolvimento de terapias eficazes para o tratamento de outras formas de distrofias maculares, sendo, por isso, prioritário alargar o foco da investigação a essas patologias.

### **Conclusão**

Em conclusão, as distrofias maculares hereditárias permanecem um desafio em oftalmologia, devido à sua natureza degenerativa, à diversidade genética, ao impacto severo na visão dos doentes e à falta de terapêuticas eficazes. No entanto, as abordagens de terapias genéticas emergentes analisadas nesta tese desde a substituição de genes mutados por vetores virais até à correção direta do genoma via CRISPR/Cas9 inauguram uma nova era de esperança para os doentes afetados por estas patologias e abrem novas perspetivas para o tratamento destas patologias. Os

primeiros dados, incluindo a aprovação pioneira de uma terapia genética para uma doença ocular e os vários ensaios clínicos em curso, demonstram um potencial de restaurar ou preservar a função visual e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dos pacientes, ainda que subsistam desafios relativos à segurança e eficácia a longo prazo, eficiência de entrega e custo. Assim, conclui-se que estas armas terapêuticas, apesar de ainda se encontrarem numa fase embrionária, tem bases sólidas para, num futuro próximo, evoluir de um conceito promissor para uma realidade clínica, alterando de forma real o paradigma de tratamento destas doenças. Assim, a contínua investigação nesta área é fundamental para transformar avanços científicos em terapias eficazes que possam fazer a diferença na vida dos indivíduos afetadas por estas doenças.

## Apêndice

Tabela I- Critérios de inclusão e exclusão.

| Critérios de inclusão                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Critérios de exclusão                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Artigos publicados a partir de 2014</li><li>• Artigos redigidos em inglês</li><li>• Texto integral disponível gratuitamente</li><li>• Estudos centrados em distrofias maculares hereditárias</li><li>• Publicações relacionadas com terapias genéticas ou edição génica</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Artigos publicados antes de 2014</li><li>• Artigos noutras línguas</li><li>• Acesso restrito ao texto integral</li><li>• Artigos não diretamente relacionados com o tema central</li><li>• Estudos que abordam apenas terapêuticas sintomáticas</li></ul> |

Tabela II- Comparação das vantagens, limitações e etapas de desenvolvimento dos vetores virais, não virais e edição genética.

| Abordagem                 | Vantagens                                                                                                                                                                  | Limitações                                                                                                                                                                                          | Etapa de desenvolvimento                                                                          |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Vetores virais</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevada eficiência na entrega do gene</li> <li>• Expressão prolongada do gene</li> <li>• Elevado conhecimento e estudo</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidade limitada de carga genética (ex. AAV)</li> <li>• Potencial imunogenicidade</li> <li>• Risco de integração no genoma</li> </ul>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Clínico – diversos ensaios clínicos em curso</li> </ul>  |
| <b>Vetores não virais</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor imunogenicidade</li> <li>• Fácil utilização</li> <li>• Maior capacidade de carga</li> </ul>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eficiência de entrega geralmente inferior</li> <li>• Expressão temporária do gene</li> <li>• Necessidade de otimização da técnica para a retina</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-clínico / início de ensaios clínicos</li> </ul>      |
| <b>Edição genética</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidade de correção do gene causador da doença</li> <li>• Potencial para cura definitiva</li> </ul>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Risco de efeitos <i>off-target</i></li> <li>• Desafios na entrega eficaz ao tecido retiniano</li> <li>• Questões éticas</li> </ul>                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-clínico; alguns ensaios clínicos iniciais</li> </ul> |

## Bibliografia

1. Hu ML, Edwards TL, O'Hare F, Hickey DG, Wang JH, Liu Z, et al. Gene therapy for inherited retinal diseases: progress and possibilities. *Clin Exp Optom*. 2021;104(4):444-54. <https://doi.org/10.1080/08164622.2021.1880863>
2. Moore NA, Morral N, Ciulla TA, Bracha P. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve degenerations. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(1):37-49. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1389886>
3. Rahman N, Georgiou M, Khan KN, Michaelides M. Macular dystrophies: clinical and imaging features, molecular genetics and therapeutic options. *Br J Ophthalmol*. 2020;104(4):451-60. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-315086>
4. Gomes MLS, Mansur-Pantuzzo ER, Lagos AAR, Corrêa H, Duarte D, Frasson M. Evaluating vision-specific quality of life and functional vision in a Brazilian population with Stargardt disease. *Eur J Ophthalmol*. 2023;33(2):723-7. <https://doi.org/10.1177/11206721221121023>
5. Roborel de Climens A, Béatrice T, Carla DB, Ronald B and Brun-Strang C. Living with Stargardt disease: insights from patients and their parents. *Ophthalmic Genet*. 2021;42(2):150-60. <https://doi.org/10.1080/13816810.2020.1855663>
6. Gong J, Cheung S, Fasso-Opie A, Galvin O, Moniz LS, Earle D, et al. The Impact of Inherited Retinal Diseases in the United States of America (US) and Canada from a Cost-of-Illness Perspective. *Clin Ophthalmol*. 2021;15:2855-66.
7. Jain R, Daigavane S. Advances and Challenges in Gene Therapy for Inherited Retinal Dystrophies: A Comprehensive Review. *Cureus*. 2024;16(9):e69895. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S313719>
8. Moraru AD, Costin D, Iorga RE, Munteanu M, Moraru RL, Branisteanu DC. Current trends in gene therapy for retinal diseases (Review). *Exp Ther Med*. 2022;23(1):26. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10948>
9. Ambrosio L, Perepelkina T, Elhusseiny AM, Fulton AB, Gonzalez Monroy JE. Advancing Insights into Pediatric Macular Diseases: A Comprehensive Review. *J Clin Med*. 2025;14(2):614. <https://doi.org/10.3390/jcm14020614>
10. Altschwager P, Ambrosio L, Swanson EA, Moskowitz A, Fulton AB. Juvenile Macular Degenerations. *Semin Pediatr Neurol*. 2017;24(2):104-9. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2017.05.005>
11. Johnson AA, Guziwicz KE, Lee CJ, Kalathur RC, Pulido JS, Marmorstein LY, et al. Bestrophin 1 and retinal disease. *Prog Retin Eye Res*. 2017;58:45-69. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.01.006>
12. Tsang SH, Sharma T. X-linked Juvenile Retinoschisis. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1085:43-8. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95046-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95046-4_10)
13. Hohman TC. Hereditary Retinal Dystrophy. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;242:337-67. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_91](https://doi.org/10.1007/164_2016_91)
14. Szabó V, Varsányi B, Barboni M, Takács Á, Knézy K, Molnár MJ, et al. Insights into eye genetics and recent advances in ocular gene therapy. *Mol Cell Probes*. 2025;79:102008. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2025.102008>
15. Maurya R, Vikal A, Narang RK, Patel P, Kurmi BD. Recent advancements and applications of ophthalmic gene therapy strategies: A breakthrough in ocular therapeutics. *Exp Eye Res*. 2024;245:109983. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109983>
16. Wang Y, Rajala A, Cao B, Ranjo-Bishop M, Agbaga MP, Mao C, et al. Cell-Specific Promoters Enable Lipid-Based Nanoparticles to Deliver Genes to Specific Cells of the Retina In Vivo. *Theranostics*. 2016;6(10):1514-27. <https://doi.org/10.7150/thno.15230>
17. Ghoraba HH, Akhavanrezayat A, Karaca I, Yavari N, Lajevardi S, Hwang J, et al. Ocular Gene Therapy: A Literature Review with Special Focus on Immune and Inflammatory Responses. *Clin Ophthalmol*. 2022;16:1753-71. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S364200>

18. Cremers FPM, Lee W, Collin RWJ, Allikmets R. Clinical spectrum, genetic complexity and therapeutic approaches for retinal disease caused by ABCA4 mutations. *Prog Retin Eye Res.* 2020;79:100861. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100861>
19. Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, Michaelides M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol.* 2017;101(1):25-30. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-308823>
20. Piottter E, McClements ME, MacLaren RE. Therapy Approaches for Stargardt Disease. *Biomolecules.* 2021;11(8): 1179. <https://doi.org/10.3390/biom11081179>
21. Khan I, Ramzan F, Tayyab H, Damji KF. Rekindling Vision: Innovative Strategies for Treating Retinal Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2025;26(9):4078. <https://doi.org/10.3390/ijms26094078>
22. Parker MA, Erker LR, Audo I, Choi D, Mohand-Said S, Sestakauskas K, et al. Three-Year Safety Results of SAR422459 (EIAV-ABCA4) Gene Therapy in Patients With ABCA4-Associated Stargardt Disease: An Open-Label Dose-Escalation Phase I/IIa Clinical Trial, Cohorts 1-5. *Am J Ophthalmol.* 2022;240:285-301. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2022.02.013>
23. Ferla R, Pugni E, Lupo M, Tiberi P, Fioretto F, Perota A, et al. Retinal gene therapy for Stargardt disease with dual AAV intein vectors is both safe and effective in large animal models. *Sci Adv.* 2025;11(13):eadt9354. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adt9354>
24. A Phase 2a, Open Label Multicenter Clinical Trial to Evaluate the Safety and Effects of a Single Intravitreal Injection of vMCO-010 Optogenetic Therapy in Subjects With Stargardt Disease [Internet]. 2022. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05417126>.
25. Wang L, Shah SM, Mangwani-Mordani S, Gregori NZ. Updates on Emerging Interventions for Autosomal Recessive ABCA4-Associated Stargardt Disease. *J Clin Med.* 2023;12(19):6229. <https://doi.org/10.3390/jcm12196229>
26. Sun D, Sun W, Gao SQ, Lehrer J, Naderi A, Wei C, et al. Effective gene therapy of Stargardt disease with PEG-ECO/pGRK1-ABCA4-S/MAR nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2022;29:823-35. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.08.026>
27. Suárez-Herrera N, Riswick IB, Vázquez-Domínguez I, Duijkers L, Karjosukarso DW, Piccolo D, et al. Proof-of-concept for multiple AON delivery by a single U7snRNA vector to restore splicing defects in ABCA4. *Mol Ther.* 2024;32(3):837-51. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.01.019>
28. Siles L, Pomares E. Rescue of the disease-associated phenotype in CRISPR-corrected hiPSCs as a therapeutic approach for inherited retinal dystrophies. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2025;36(1):102482. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102482>
29. Siles L, Ruiz-Nogales S, Navinés-Ferrer A, Méndez-Vendrell P, Pomares E. Efficient correction of ABCA4 variants by CRISPR-Cas9 in hiPSCs derived from Stargardt disease patients. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2023;32:64-79. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.02.032>
30. Zhao T, Li Q, Zhou C, Lv X, Liu H, Tu T, et al. Small-molecule compounds boost genome-editing efficiency of cytosine base editor. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(15):8974-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab645>
31. Guziewicz KE, Sinha D, Gómez NM, Zorych K, Dutrow EV, Dhingra A, et al. Bestrophinopathy: An RPE-photoreceptor interface disease. *Prog Retin Eye Res.* 2017;58:70-88. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.01.005>
32. Aguirre GD, Beltran WA. Canine Best disease as a translational model. *Eye (Lond).* 2025;39(3):412-7. <https://doi.org/10.1038/s41433-024-03578-0>
33. Amato A, Wongchaisuwat N, Lamborn A, Schmidt R, Everett L, Yang P, et al. Gene therapy in bestrophinopathies: Insights from preclinical studies in preparation for clinical trials. *Saudi J Ophthalmol.* 2023;37(4):287-95. [https://doi.org/10.4103/sjopt.sjopt\\_175\\_23](https://doi.org/10.4103/sjopt.sjopt_175_23)
34. Wiley LA, Burnight ER, Mullins RF, Stone EM, Tucker BA. Stem cells as tools for studying the genetics of inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;5(5):a017160. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017160>

35. Ji C, Li Y, Kittredge A, Hopiavuori A, Ward N, Yao P, et al. Investigation and Restoration of BEST1 Activity in Patient-derived RPEs with Dominant Mutations. *Sci Rep.* 2019;9(1):19026. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54892-7>
36. Park J, Cui G, Lee H, Jeong H, Kwak JJ, Lee J, et al. CRISPR/Cas9 mediated specific ablation of vegfa in retinal pigment epithelium efficiently regresses choroidal neovascularization. *Sci Rep.* 2023;13(1):3715. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29014-z>
37. Askou AL, Alsing S, Benckendorff JNE, Holmgaard A, Mikkelsen JG, Aagaard L, et al. Suppression of Choroidal Neovascularization by AAV-Based Dual-Acting Antiangiogenic Gene Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;16:38-50. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.012>
38. Ku CA, Wei LW, Sieving PA. X-Linked Retinoschisis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2023;13(9): a041288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041288>
39. van der Veen I, Heredero Berzal A, Koster C, Ten Asbroek A, Bergen AA, Boon CJF. The Road towards Gene Therapy for X-Linked Juvenile Retinoschisis: A Systematic Review of Preclinical Gene Therapy in Cell-Based and Rodent Models of XLRS. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):1267. <https://doi.org/10.3390/ijms25021267>
40. Wei X, Ma S, Zhou Y, Cui H, Zhang S, Wang D, et al. A Novel AAV Capsid-Mediated RS1 Gene Therapy Restored Retinal Function to Wild-Type Levels in Rs1R213W Mouse Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2025;66(4):37. <https://doi.org/10.1167/iovs.66.4.37>
41. Scruggs BA, Bhattarai S, Helms M, Cherascu I, Salesevic A, Stalter E, et al. AAV2/4-RS1 gene therapy in the retinoschisin knockout mouse model of X-linked retinoschisis. *PLoS One.* 2022;17(12):e0276298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276298>
42. Pennesi ME, Yang P, Birch DG, Weng CY, Moore AT, Iannaccone A, et al. Intravitreal Delivery of rAAV2tYF-CB-hRS1 Vector for Gene Augmentation Therapy in Patients with X-Linked Retinoschisis: 1-Year Clinical Results. *Ophthalmol Retina.* 2022;6(12):1130-44. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2022.06.013>
43. Fenner BJ, Russell JF, Drack AV, Dumitrescu AV, Sohn EH, Russell SR, et al. Long-term functional and structural outcomes in X-linked retinoschisis: implications for clinical trials. *Front Med (Lausanne).* 2023;10:1204095. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1204095>
44. Nuzbrokh Y, Ragi SD, Tsang SH. Gene therapy for inherited retinal diseases. *Ann Transl Med.* 2021;9(15):1278. <https://doi.org/10.21037/atm-20-4726>
45. Duan C, Ding C, Sun X, Mao S, Liang Y, Liu X, et al. Retinal organoids with X-linked retinoschisis RS1 (E72K) mutation exhibit a photoreceptor developmental delay and are rescued by gene augmentation therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15(1):152. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03767-4>
46. Zhang L, Liu X, Huang M, Xu P, Lai Y, Liu Y, et al. Generation of a X-linked juvenile retinoschisis patient-derived induced pluripotent stem cell line ZOCi004-A. *Stem Cell Res.* 2022;65:102937. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2022.102937>
47. Piotter E, McClements ME, MacLaren RE. The Scope of Pathogenic ABCA4 Mutations Targetable by CRISPR DNA Base Editing Systems-A Systematic Review. *Front Genet.* 2021;12:814131. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.814131>
48. Tan TE, Dai P, Hensman J, Kiraly P, Fenner BJ, Liu Y, et al. Artificial intelligence-quantified schisis volume as a structural endpoint for gene therapy clinical trials in X-linked retinoschisis. *Acta Ophthalmol.* 10.1111/aos.17485. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/aos.17485>

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR**

