



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Matilde Domingues Gameiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “The CSF route of delivery to the brain for molecular-based therapies” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Maria do Carmo Moço, Dra. Ana Patrícia Rei e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Matilde Domingues Gameiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “The CSF route of delivery to the brain for molecular-based therapies” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Maria do Carmo Moço, Dra. Ana Patrícia Rei e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

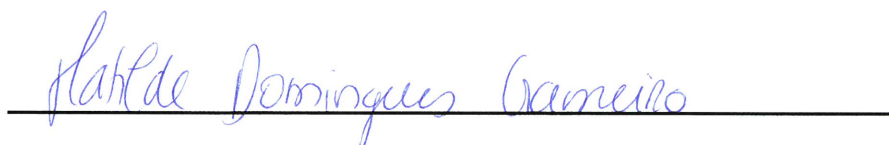
Setembro de 2021

Declaração de Honra

Eu, Matilde Domingues Gameiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015231351, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “The CSF route of delivery to the brain for molecular-based therapies” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de setembro de 2021.



(Matilde Domingues Gameiro)

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Poesia dos Outros Eus. Ricardo Reis (heterónimo de Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio e carinho em todos os momentos. Pelo amor incondicional e por me inspirarem a ser o melhor que sei e consigo ser. Por serem os primeiros a acreditar em mim e por terem tornado possível esta jornada.

À minha irmã, pelo companheirismo, amizade e cumplicidade. Que continuemos sempre a caminhar lado a lado.

Ao Lucas, por ser o meu porto seguro e por me fazer sonhar. Por ser o meu maior exemplo de foco e trabalho, e por me incentivar a dar o melhor de mim em tudo o que faço.

À minha avó Tina, por viver cada uma das minhas vitórias, como se fossem as dela.

A toda a minha família e aos meus amigos, por todo o apoio e por estarem sempre lá.

Ao Clube Náutico Académico e à nataçãõ, desporto que me formou e moldou o meu carácter. Por me ensinarem, desde muito nova, a ser perseverante e resiliente e por nunca me deixarem desistir.

À Patrícia, à Catarina e à Maria João, pelo companheirismo, pelo exemplo de profissionalismo e por tudo o que me ensinaram.

A toda a equipa da Farmácia Moço, pelo conhecimento transmitido.

Ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, pela simpatia, disponibilidade e orientação dedicada ao longo deste desafio.

À minha avó Rosa. “Inspiradora na fortaleza, surpreendente na atualidade e resiliente ao caminhar irreversível da vida”.

Sem vocês esta caminhada não seria possível. Muito Obrigada!

Índice

PARTE I - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA 7

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. ANÁLISE SWOT	10
2.1. PONTOS FORTES	10
2.1.1. Localização e horário da farmácia.....	10
2.1.2. Integração na equipa.....	11
2.1.3. Receção e armazenamento de encomendas	11
2.1.4. Meias de compressão elástica.....	12
2.1.5. Preparação de domicílios	12
2.2. PONTOS FRACOS	13
2.2.1. Associação de nomes comerciais a nomenclatura DCI	13
2.2.2. Regimes de complementaridade.....	13
2.2.3. Aconselhamento de medicamentos e produtos de uso veterinário	14
2.3. OPORTUNIDADES.....	14
2.3.1. Preparação de Medicamentos Manipulados.....	14
2.3.2. Rastreio Cardiovascular	15
2.3.3. Formação continua	15
2.4. AMEAÇAS.....	16
2.4.1. Crescente tendência para recolha de informação e compra de produtos online.....	16
2.4.2. Concorrência de estabelecimentos de venda de MNSRM.....	16
3. CASOS PRÁTICOS.....	17
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
5. ANEXO – RESULTADO DE RASTREIO CARDIOVASCULAR	22

PARTE II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA 23

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	24
1. INTRODUÇÃO	25
2. ANÁLISE SWOT	26
2.1. PONTOS FORTES	27
2.1.1. Processo de seleção.....	27
2.1.2. Integração na equipa e relações interpessoais	27
2.1.3. Utilização de conhecimentos e competências.....	28
2.1.4. Conciliar Investigação com Business Development.....	28
2.1.5. Estímulo autonomia e sentido crítico.....	28
2.1.6. Utilização maioritária da Língua Inglesa aquando execução de tarefas	29
2.1.7. Participação em diversas formações.....	29
2.2. PONTOS FRACOS	29
2.2.1. Duração do estágio.....	29
2.2.2. Falta de competências aprofundadas de Excel.....	30

2.3.	OPORTUNIDADES.....	30
2.3.1.	Primeiro contacto com a Indústria Farmacêutica.....	30
2.3.2.	Oportunidade para trabalhar com novas plataformas e bases de dados.....	31
2.3.2.1.	IMS.....	31
2.3.2.2.	IPD Analytics®.....	31
2.3.2.3.	Cortellis™.....	32
2.3.3.	Desenvolvimento de novas competências no âmbito da propriedade intelectual e mecanismos de proteção na Indústria Farmacêutica.....	32
2.3.4.	Introdução à Gestão de Portfolio de uma Indústria Farmacêutica.....	33
2.3.5.	Participação na segmentação do mercado de produtos estéreis.....	33
2.4.	AMEAÇAS.....	34
2.4.1.	Mercado dos medicamentos genéricos.....	34
2.4.2.	Contexto pandémico devido à Covid-19.....	34
3.	CONCLUSÃO.....	35
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

PARTE III - MONOGRAFIA “THE CSF ROUTE OF DELIVERY TO THE BRAIN FOR MOLECULAR-BASED THERAPIES” 37

	RESUMO.....	38
	ABSTRACT.....	38
	ABBREVIATIONS.....	39
1.	INTRODUCTION.....	40
2.	THE ROLE OF CSF: FUNCTIONS AND PHYSIOLOGY.....	41
3.	THE CSF ROUTE FOR DRUG DELIVERY IN BRAIN DISORDERS.....	45
4.	ROUTES OF ADMINISTRATION INTO THE CSF.....	48
	<i>Intrathecal lumbar injection (IT)</i>	49
	<i>Injection in the lateral ventricles (ICV)</i>	50
	<i>Injection in the cisterna magna (ICM)</i>	51
5.	DRUGS DELIVERED THROUGH THE CSF ROUTE.....	52
6.	DELIVERY OF ANTI-SENSE OLIGONUCLEOTIDES TO THE BRAIN.....	53
7.	DELIVERY OF ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS TO THE BRAIN.....	58
8.	CONCLUSIONS.....	60
9.	REFERENCES.....	62
10.	SUPPORTING INFORMATION.....	72

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Moço



Lista de Siglas e Abreviaturas

DCI – Denominação Comum Internacional

FM – Farmácia Moço

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

SWOT – do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities* e *Threats*

I. Introdução

Os cinco anos que compõe o ciclo de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) culminam obrigatoriamente com um estágio curricular em farmácia comunitária. Considero que este período de estágio é da maior relevância para finalizar com sucesso o percurso académico uma vez que, para além de ser, porventura, a saída profissional mais frequente do MICF, surge como uma oportunidade para consolidar e aplicar todo o conteúdo teórico abordado ao longo do curso, bem como de desenvolver novas competências. Para além disso, a farmácia comunitária, em geral, e o farmacêutico comunitário, em particular, têm, cada vez mais, um papel de grande preponderância na sociedade em que vivemos uma vez que, na generalidade das vezes, o farmacêutico comunitário é o primeiro profissional de saúde a quem a população recorre em caso de necessidade, atuando por isso, desde a prevenção ao aconselhamento sobre os mais diversos problemas de saúde. Deste modo, a farmácia comunitária não se reduz ao local de dispensa de medicamentos, emergindo cada vez mais como um estabelecimento de confiança onde os utentes podem encontrar uma enorme variedade de serviços farmacêuticos, entre os quais saliento a Revisão da Medicação e Aconselhamento Farmacoterapêutico, bem como um vasto leque de produtos que têm em vista a melhoria contínua da sua qualidade de vida.

O meu estágio decorreu na Farmácia Moço, entre abril e julho de 2021, sob orientação da Direção Técnica da farmácia, a Dra. Maria do Carmo Moço.

A Farmácia Moço situa-se no centro de Coimbra e, por isso, tem uma grande diversidade de utentes, que se estende desde os mais jovens aos mais idosos e abarga tanto os utentes regulares, que são fidelizados a esta farmácia, como os pontuais. A farmácia possui dois gabinetes, um deles destinado à realização dos serviços prestados pela farmácia, tais como medição da glicémia ou tensão arterial, e outro destinado a consultas, tais como de nutrição ou fisioterapia, realizadas por intervenientes externos. Para além disso, tem agregada um estabelecimento de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), isto é, uma Parafarmácia, em Almalaguês, e serve ainda um lar de idosos, situado na mesma zona.

O presente relatório destina-se a resumir e analisar o estágio realizado, através da metodologia SWOT (do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*).

2. Análise SWOT

	Pontos Fortes	Pontos Fracos
Fatores Internos	<ul style="list-style-type: none">• Localização e horário da farmácia;• Integração na equipa;• Receção e armazenamento de encomendas;• Meias de compressão elástica;• Preparação de domicílios.	<ul style="list-style-type: none">• Associação de nomes comerciais a nomenclatura DCI;• Regimes de complementariedade;• Aconselhamento de medicamentos e produtos de uso veterinário.
	Oportunidades	Ameaças
Fatores Externos	<ul style="list-style-type: none">• Preparação de medicamentos manipulados;• Rastreio Cardiovascular;• Formação contínua.	<ul style="list-style-type: none">• Crescente tendência para recolha de informação e compra de produtos online;• Concorrência estabelecimentos de venda de MNSRM.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Localização e horário da farmácia

A Farmácia Moço (FM), para além de estar localizada no centro da cidade de Coimbra, é igualmente privilegiada pelo facto de se encontrar bem visível da Avenida Fernando Namora, uma das ruas mais movimentadas da cidade, que serve de acesso aos mais diversos pontos de conveniência. Por esta razão, por ser uma farmácia de fácil acesso, consegue albergar não só clientes habituais, que são fidelizados à FM, como também clientes pontuais. Para além disso, a FM encontra-se aberta das 9h às 21h30, um horário alargado, que a diferencia das restantes farmácias em Coimbra, uma vez que, na sua grande maioria, estas fecham entre as 20h e as 21h. Por este motivo, o horário dos farmacêuticos e técnicos é realizado por turnos, que alternam semanalmente. Durante as primeiras 3 (três) semanas do meu estágio, o meu colega que iniciou o estágio em Janeiro ainda o estava a terminar, pelo que tive oportunidade de experienciar esta realidade de trabalhar por turnos, alternando semanalmente entre o “horário da manhã”, das 9h às 18h ou 19h, e o “horário da noite”, das 12h30 às 21h30 ou 22h. Graças a esta alternância tive ainda oportunidade de observar as rotinas de fecho da farmácia, bem como experienciar a heterogeneidade de utentes que recorrem à farmácia, consoante as horas do dia.

2.1.2. Integração na equipa

A FM, para além de ter a Direção Técnica assegurada pela Dra. Maria do Carmo Moço, alberga ainda mais 4 (quatro) farmacêuticos e 2 (dois) técnicos de farmácia, a quem reconheci, sem exceção, um elevado profissionalismo e competência. Desde o meu primeiro dia de estágio que toda a equipa se disponibilizou a esclarecer eventuais dúvidas que surgissem do decorrer do mesmo, bem como me disponibilizaram uma breve explicação aquando da atribuição de tarefas que nunca antes tinha efetuado. Para além da equipa da farmácia, também o meu colega estagiário, que estava a terminar quando eu iniciei, me orientou na farmácia, naquilo que eram as tarefas diárias do estagiário e, em conjunto com a equipa, me sugeriu formas de melhorar o meu trabalho. Por este motivo, não posso deixar de agradecer a toda a equipa da Farmácia Moço, Dra. Maria do Carmo, Dr. João, Dra. Inês, Dra. Ana, Dra. Jéssica, ao Daniel e à Márcia, bem como ao meu colega Gonçalo, por todo o apoio dado no decorrer do meu estágio. Uma vez que se tratou do meu primeiro contacto com o atendimento ao público, contribuíram para que tivesse uma boa evolução no decorrer do estágio, dado que sempre me transmitiram confiança e segurança no realizar das tarefas.

2.1.3. Receção e armazenamento de encomendas

A primeira tarefa que me foi proposta, sendo posteriormente transversal a todo o meu estágio, foi a receção de encomendas e respetiva arrumação. Considero que a realização desta tarefa logo no início do estágio é da maior pertinência uma vez que, para além de ser essencial que um farmacêutico comunitário a saiba realizar de forma eficiente, me permitiu ter noção da importância que tem o trabalho que se faz no *back office* e da forma como influencia todo o funcionamento da farmácia. Ao rececionar as encomendas diárias, que servem essencialmente para assegurar a reposição de stocks, e unitárias, que usualmente satisfazem pedidos específicos, é de fulcral importância prestar atenção não só aos prazos de validade de cada medicamento, bem como aos respetivos preços, dado que um erro nos mesmos, desencadeará uma cadeia de acontecimentos que não será benéfica para a farmácia, no sentido em que haverá o risco de ter produtos e medicamentos com prazos de validade demasiado curtos ou preços incorretos.

Uma vez rececionada a encomenda, cabia-me também a mim, enquanto estagiária, proceder à arrumação de todos os medicamentos e produtos nos devidos locais. Considero que esta tarefa igualmente importância uma vez que me facilitou a interiorização do local de cada medicamento em específico e da organização da farmácia em geral, o que se revelou fundamental quando passei para o atendimento ao balcão. É de sublinhar que um dos aspetos

que os clientes mais procuram hoje em dia é um atendimento eficaz, que satisfaça as necessidades de forma rápida, pelo que é da maior importância garantir que todos os produtos estão arrumados no local devido, pela metodologia adotada (“*First expire, first out*”), de forma a evitar erros e/ou perdas de tempo desnecessárias.

2.1.4. Meias de compressão elástica

As meias de compressão elásticas são consideradas dispositivos médicos, uma vez que a ação que desempenham é física e não química/bioquímica, como é o caso dos medicamentos. Estas meias exercem uma pressão ao longo da perna, melhorando, desta forma, a circulação sanguínea do utente e, assim, impedem a formação de coágulos (R. Liu *et al.*, 2005; “Sigvaris - Insuficiência Venosa,” 2021). As meias, no que concerne ao seu comprimento, podem ser classificadas em 3 (três) grupos: AD, que vão desde o tornozelo até ao joelho; AG, que vão até à raiz da coxa e as AT que são *collants*. No que diz respeito à pressão exercida pela meia pode ser classificada em 5 (cinco) classes: CL0, que é uma meia que tem compressão muito leve (de 10 a 15 mmHg); CL1, que é uma meia de compressão leve (15 a 21 mmHg); CL2, que é uma meia de compressão moderada (23 a 32 mmHg); CL3, que é uma meia de compressão forte (33 a 46 mmHg); e, por fim, CL4, que são meias de compressão extraforte (igual ou superior a 49 mmHg) (“Sigvaris - Insuficiência Venosa,” 2021).

A escolha do tipo de meia, no que diz respeito à compressão da mesma, deve ser aconselhada pelo médico ou farmacêutico, contudo, no que ao seu comprimento e cor a escolha recai mais sobre a preferência do utente, dado que há sempre associado o gosto pessoal do mesmo e a facilidade que tem em calçar a meia.

Dado que a Farmácia Moço é uma referência neste tipo de produtos, foram diversos os atendimentos que realizei em que o(a) utente me solicitou auxílio para a escolha do tipo de meia mais adequado. A escolha da meia mais indicada envolve diversos procedimentos, dos quais destaco a medição da perna do(a) utente, de forma a assegurar que o tamanho de meia é o mais adequado e que, conseqüentemente, o(a) utente usufrui de todos os benefícios da meia. Considero ainda de elevada importância que se aconselhe o(a) utente relativamente ao procedimento de lavagem da meia, de forma a garantir que esta não perde a compressão inicial e, assim, prolongar o tempo de vida útil das mesmas.

2.1.5. Preparação de domicílios

Considero que um dos pontos fortes mais relevantes do meu estágio foi a preparação de pedidos para entrega ao domicílio. Não muito tempo após iniciar o meu estágio, foi-me

proposto que começasse por ajudar nos domicílios através da separação dos medicamentos que os utentes tinham previamente pedido e, mais tarde, faturá-los no sistema. Não tenho dúvidas que o realizar desta tarefa diariamente contribuiu de forma muito positiva na minha preparação para o atendimento ao público, visto que me permitiu explorar o sistema informático adotado pela farmácia, o Sifarma[®], sem a pressão de ter o utente “à frente”. Para além de permitir explorar o sistema informático, foi ainda importante para contactar e interiorizar algumas das realidades do quotidiano de uma farmácia de oficina, entre as quais destaco o aviamento de receituário, isto é, venda de medicamentos sujeitos a receita médica mediante apresentação da respetiva receita, bem como a realização de vendas suspensas, isto é, venda de medicamentos sujeitos a receita médica sem a apresentação da devida receita. Neste último caso, o utente compromete-se a regularizar a respetiva venda através da apresentação da receita correspondente aos medicamentos dispensados.

Por último, tive ainda oportunidade de perceber qual o procedimento a executar no Sifarma[®] por forma a perceber qual a medicação que é feita habitualmente pelo utente, por norma fidelizado à farmácia, o que considero ser de elevada importância dado que, uma vez mais, é uma das atividades transversais à maioria dos atendimentos realizados na farmácia comunitária.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Associação de nomes comerciais a nomenclatura DCI

Uma das grandes dificuldades que senti no decorrer do meu estágio foi o associar corretamente o nome comercial dos medicamentos à sua nomenclatura DCI, isto é, Denominação Comum Internacional (DCI). Apesar de em algumas Unidades Curriculares do MIFC ser abordada a importância de ir fazendo corretamente esta associação, a nomenclatura DCI foi a que se revelou mais preponderante no decorrer do curso, pelo que reconhecer os medicamentos pelo seu nome comercial foi uma das grandes dificuldades que senti ao iniciar o atendimento ao público. Contudo, com o auxílio da plataforma Sifarma[®] no decorrer do atendimento ou preparação de domicílios e com algum estudo e pesquisa realizados em casa, penso que consegui atenuar esta lacuna. Para além disso, destaco ainda a disponibilidade e auxílio prestado no esclarecimento de dúvidas que surgiram por toda a equipa da FM.

2.2.2. Regimes de complementaridade

Para além da comparticipação que é concedida por parte do Estado na compra de medicamentos sujeitos a receita médica, existem ainda distintos planos de comparticipação

que, na grande maioria dos casos, advêm da profissão desempenhada pelo utente, de um problema de saúde específico do doente, ou ainda de serviço prestado ao país, como é o caso dos militares. A devida identificação do regime de comparticipação, em especial no caso das receitas manuais, revelou-se um desafio no decorrer dos atendimentos que realizei, dado que este tipo de regimes e a correta forma de proceder através do sistema operativo Sifarma® não foi abordada profundamente durante o MICF.

2.2.3. Aconselhamento de medicamentos e produtos de uso veterinário

Uma das grandes dificuldades que senti no realizar do atendimento ao público foi o aconselhamento de medicamento e produtos de uso veterinário. Apesar da Farmácia Moço não se encontrar localizada em meio rural, foi-me frequentemente solicitado por parte dos utentes aconselhamento de medicamentos e produtos de uso veterinário. A meu ver, esta crescente procura, no centro de uma cidade e não em meio rural, deve-se à igualmente crescente preocupação com o bem-estar e saúde dos animais de companhia, sendo estes muitas vezes considerados um membro do agregado familiar. Considero que as dificuldades que me surgiram se deveram ao facto de, ao longo do MICF, apenas termos uma Unidade Curricular focada nos medicamentos e produtos de uso veterinário, Unidade Curricular essa que sinto que carece de uma abordagem mais prática e voltada para o quotidiano de uma Farmácia Comunitária e daquilo que são as necessidades dos utentes, de forma que nós, estagiários e farmacêuticos, possamos prestar o melhor atendimento e aconselhamento possível.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Preparação de Medicamentos Manipulados

Os Medicamentos Manipulados destinam-se a responder a necessidades específicas de utentes, geralmente em casos onde se verifica a existência de lacunas ao nível daquilo que é a oferta por parte dos laboratórios e distribuidores industriais, sendo, por isso, usualmente reservados a grupos singulares de doente como, por exemplo, a população pediátrica. Cabe, portanto, ao farmacêutico garantir que o Medicamento Manipulado é preparado em conformidade com todas as normas de qualidade e segurança impostas pelo Infarmed e pelas Boas Práticas de Preparação de Medicamentos Manipulados, pelo que deverá, sempre que necessário, recorrer ao Formulário Galénico Português onde poderá encontrar um considerável número de monografias, com as respetivas fichas de preparação.

Durante o meu estágio na Farmácia Moço tive oportunidade não só de assistir, como realizar a preparação de alguns Medicamentos Manipulados entre os quais destaco a preparação de pomadas e xaropes.

2.3.2. Rastreio Cardiovascular

Uma das atividades mais desafiantes a que fui proposta no decorrer do meu estágio foi, indubitavelmente, a organização e posterior realização de um Rastreio Cardiovascular na farmácia. O Rastreio Cardiovascular surgiu por iniciativa da Apoteca Natura e, dado que a FM é uma das únicas farmácias da Apoteca Natura em Coimbra, procedemos à realização do mesmo, sendo que me foi proposto ficar eu como responsável pelo projeto. Numa primeira fase de organização, foram informados(as) todos(as) os(as) utentes da farmácia, quer no final de um atendimento, quer via SMS, de que iria ocorrer a realização do rastreio. De seguida, e após o contacto telefónico por parte das pessoas interessadas, procedi à calendarização do mesmo. Chegado o dia e hora agendados para o rastreio, começava por efetuar a medição da pressão arterial do(a) utente. O tensiómetro usado pela farmácia não permite ter informações relativamente à fibrilhação auricular, contudo realiza 3 (três) medições de pressão arterial ao longo de 10 (dez) minutos, efetuando depois a média dos resultados obtidos. A meu ver, este conjunto de medições ao longo de 10 (dez) minutos, ao invés de uma medição única, faz toda a diferença na veracidade dos resultados obtidos dado que permite ao utente acalmar o ritmo cardíaco e assegurar que o mesmo se encontra em repouso aquando da medição. Feita a medição da pressão arterial, procedia à anotação e análise dos valores obtidos e prosseguia para a medição do colesterol total, da glicémia e perímetro abdominal. Por último, encaminhava os utentes do computador de um dos balcões da farmácia que estivesse livre, onde auxiliava no preenchimento de um questionário *online*, disponibilizado na plataforma virtual da Apoteca Natural e, por último, analisava e interpretava os resultados do formulário e do rastreio dando, sempre que necessário, aconselhamento aos utentes sobre de que forma poderiam melhorar os aspetos que apresentavam maiores lacunas. Um exemplo de resultado do rastreio encontra-se em anexo ao presente relatório.

2.3.3. Formação continua

Durante o meu estágio na FM tive oportunidade de participar em diversas formações que me permitiram aprofundar e alargar a minha área de conhecimentos sobre produtos de venda livre ou de dermocosmética. Considero que estas formações têm um enorme impacto na qualidade do atendimento que posteriormente é prestado ao utente, dado que nos permite

conhecer a fundo tanto as mais valias, como os pontos menos fortes de cada produto. Para além disso, permitiu-me ainda tomar conhecimento sobre certas gamas de produtos bem como sobre alternativas terapêuticas para problemas que desconhecia e que recorrentemente são apresentadas aquando do atendimento ao balcão. Deste modo, destaco as formações da Puresentials® e da Curaprox®.

2.4. Ameaças

2.4.1. Crescente tendência para recolha de informação e compra de produtos online

Atualmente, a par do exponencial crescimento e desenvolvimento da tecnologia, a população encontra uma assoberbante quantidade de informação disponível “à distância de um *click*”. Em segundos, o cidadão comum, poderá fazer uma rápida pesquisa num motor de busca à sua escolha e informar-se, não necessariamente da forma mais correta, sobre o seu problema de saúde e possíveis opções terapêuticas para resolver o mesmo. Este acesso a fontes de informação não filtrada, poderá levar a que o(a) utente dispense a ida à farmácia, ou que apenas recorra à mesma para efetuar a compra de um MNSRM, que poderá não ser o mais indicado ou seguro para o seu caso em específico. Para além disso, observa-se um crescimento considerável da possibilidade de compra de suplementos alimentares e/ou produtos de dermocosmética *online*, o que surge como uma inequívoca ameaça, tanto para a farmácia, como para o(a) utente. De facto, a situação pandémica em vivemos devido à COVID-19, veio intensificar a preferência da população pela compra *online*, uma vez que não tem de sair de casa. Esta compra *online*, para além de ser uma ameaça para a farmácia, é também um risco para o(a) utente, dado que muitos dos suplementos alimentares vendidos na internet não têm o mesmo “selo de qualidade e segurança” que apresentam aqueles que estão disponíveis na farmácia, uma vez que não são submetidos às testagens de qualidade e segurança que todos os produtos que se encontram para venda em farmácia são. Posto isto, cabe ao farmacêutico estar atentos e ter um papel ativo no aconselhamento ao utente, de forma a tentar colmatar estes riscos.

2.4.2. Concorrência de estabelecimentos de venda de MNSRM

Esta ameaça vem em linha com o que foi previamente exposto dado que, ao se autorizar a venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) em estabelecimentos que não sejam farmácias, pelo Decreto-Lei n.º 134/2005, está-se diretamente a descredibilizar a profissão farmacêutica e um dos serviços farmacêuticos mais comuns prestados pelo mesmo, o aconselhamento farmacêutico (Decreto-Lei n.º 134/2005, 2005). A

venda de MNSRM sem a supervisão e aconselhamento prestados pelo farmacêutico surge igualmente como um risco para o utente, dado que promove a automedicação desinformada e incorreta o que, por sua vez, poderá acarretar reações adversas não identificadas. Para além disso, a nível económico, estes estabelecimentos surgem como uma ameaça direta para as farmácias dado que, pelo facto de, na grande maioria das vezes, se situarem em superfícies de comércio em massa, praticarem preços que não são exequíveis para a farmácia.

3. Casos Práticos

Caso Prático I – Pediculose

Numa tarde de elevado movimento na FM, dirigiu-se uma senhora à farmácia. Com algum constrangimento, referiu que tinha acabado de receber um telefonema do infantário do filho a alertar para um surto de piolhos que ali havia ocorrido, e fez questão de mencionar que o filho, apesar de ter todos os cuidados de higiene, apresenta cabelo comprido e encaracolado, pelo que questionou se não seria melhor fazer um tratamento para prevenir. Primeiramente, tranquilizei a senhora, tentando transmitir que o aparecimento de piolhos não se trata de uma questão de higiene do couro cabeludo e que é bastante recorrente em crianças. De seguida, procurei perceber se a mesma já teria visualizado lêndeas ou mesmo o parasita vivo na criança. Mencionei também que, de forma a evitar nova infestação, que o tratamento deveria ser feito por toda a família e contactos próximos que o menino tivera, e que, para além disso, seria prudente também mudar toda a roupa de cama, aspirar os assentos do carro e sofá, de forma a garantir que o problema seria eficazmente mitigado.

Seguidamente, após consultar um dos farmacêuticos mais experientes que estava comigo nessa tarde na farmácia, aconselhei Paranix[®], que se trata de um champô de tratamento específico para estas situações, dado que, devido ao facto de apenas ter uma ação mecânica sobre os piolhos, desidratando-os e asfixiando-os, os mesmos não têm capacidade de desenvolver resistência ao produto (“Paranix - Tratamento Piolhos,” 2021).

Posteriormente, passei a explicar como deveria ser aplicado o produto. O primeiro passo consiste em passar o pente que vem com o produto em todo o cabelo, de madeixa a madeixa. Depois, deve aplicar-se uma camada uniforme do produto em todo o couro cabeludo seco, com atenção redobrada à zona atrás das orelhas, massajando da raiz às pontas. Após deixar atuar o champô durante cerca de 10 (dez) minutos, deve passar-se o pente novamente por todo o cabelo, removendo os piolhos e lêndeas, e, finalmente, lavar o couro cabeludo com bastante água.

Caso Prático 2 – Micose

Um senhor dirigiu-se à farmácia e relatou que sentia bastante comichão entre os dedos dos pés, pelo que solicitou uma pomada que aliviasse a situação. Após fazer algumas questões, o senhor referiu ainda que trabalhava diariamente com botas de biqueira de aço, o que não ajudava em nada a situação que trazia no pé, uma vez que criava um ambiente quente e húmido, propício à proliferação “do pé de atleta”. Concordei com a observação feita pelo senhor, dado que é sabido que esse tipo de ambiente fomenta a propagação do fungo e perguntei ainda ao utente se, ao visualizar a zona onde sentia comichão, a notava mais avermelhada, questão à qual recebi resposta afirmativa. De forma a ter a certeza do que se tratava, pedi que o mesmo me acompanhasse ao gabinete da farmácia, onde solicitei que me mostrasse a zona onde sentia maior desconforto. Ao examinar o pé, visualizei que a zona interdigital do mesmo se encontrava de facto avermelhada e, para além disso, apresentava já algumas placas descamativas. Posto isto, após explicar ao utente que se tratava de uma infeção causada por um fungo, aconselhei que o mesmo aplicasse Canesten Unidia® 10mg/g no pé totalmente seco, uma vez por dia, até que os sintomas desaparecessem totalmente. Recomendiei ainda a utilização de um pó absorvente na bota, de forma a contrariar o clima propício à sobrevivência do fungo dentro da mesma e reforcei a importância de secar totalmente a zona interdigital dos dedos todos os dias de forma a garantir a mitigação eficaz do problema descrito.

Caso Prático 3 – Perturbação de sono

Uma senhora chega à farmácia acompanhada pela sua filha adolescente que se queixa que, recentemente, tem tido dificuldades a adormecer. Durante a conversa, percebi que o referido problema não é recorrente e que a jovem se encontra em preparação para os exames nacionais do ensino secundário, pelo que associei o *stress* e ansiedade causado pelos mesmos à dificuldade em adormecer. Posto isto, e após minuciosa análise com vista a excluir outras possíveis causas, aconselhar a que tomasse 1 (um) comprimido de Aquilea Sono® antes de deitar. Este produto é inovador no mercado uma vez que não só facilita e acelera o processo de adormecer, como evita o recorrente despertar durante a noite, muitas vezes frequente nos casos de ansiedade. Este efeito é conseguido com recurso a uma dupla camada que compõe o comprimido. Na primeira, composta essencialmente por melatonina, verifica-se uma libertação rápida do composto, o que contribui para que a utente adormeça com facilidade, e na segunda, composta predominantemente por extratos de plantas como valeriana e passiflora, observa-se uma libertação prolongada dos compostos que promove um sono reparador (“Produtos da Aquilea | Naturitas,” 2021). Por último, encerrei o atendimento

salientando a importância de uma boa higiene do sono, lembrando hábitos fundamentais para um descanso adequado, entre os quais, evitar a ingestão de bebidas alcoólicas ou com cafeína a partir de meio da tarde, bem como a exposição a ecrãs (por exemplo: telemóvel, computador ou televisão) pelo menos 30 (trinta) minutos a 1 (uma) hora antes de ir dormir, não alterar os horários de sono e a importância da prática de exercício físico durante o dia.

Conclusão

A realização de um estágio em Farmácia Comunitária permitiu-me a aplicação direta dos conhecimentos que apreendi ao longo do MICF. No decorrer de todas as tarefas que me foram propostas, desde o *back office* ao atendimento ao público, tive oportunidade de me aperceber do vasto leque de funções desempenhadas por um farmacêutico comunitário e do amplo leque de conhecimentos e vontade de apreender nova informação que é transversal e inerente a este papel. Posto isto, sinto que é essencial colmatar uma ideia que se tem vindo cada vez mais a enraizar na nossa sociedade, de que o farmacêutico comunitário é um mero dispensador de medicamentos. Assistimos, na era em que vivemos, à amplificação constante das funções que poderão ser desempenhadas por um farmacêutico de oficina com, por exemplo, a criação e implementação dos Serviços Farmacêuticos. Assim, cabe aos farmacêuticos a responsabilidade de se dotarem não só de conhecimentos científicos e clínicos mas, e principalmente a meu ver, de espírito crítico e capacidade de trabalhar em equipa e de tomar decisões, de forma a prestar ao utente o melhor serviço possível. Concluindo, não posso deixar de salientar que o surgimento de novas abordagens e terapêuticas, inerente à evolução da prática farmacêutica, acontece a ritmo estonteante nos dias que correm, pelo que considero fulcral que o farmacêutico mantenha um leque de conhecimentos vasto e que procure a constante atualização do mesmo, de modo a conseguir dar resposta às necessidades do utente em particular e da sociedade em geral.

4. Referências Bibliográficas

Decreto-Lei n.º 134/2005. - Retrieved May 13, 2021, from <https://dre.pt/pesquisa/-/search/243692/details/maximized>

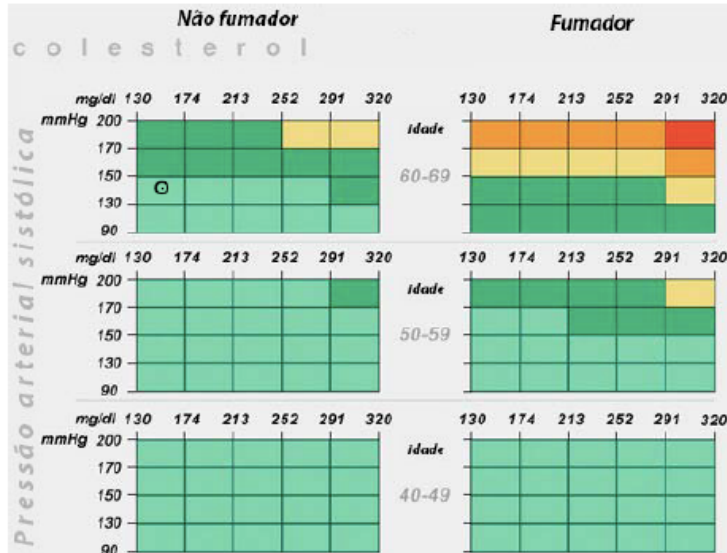
Liu, R., Kwok, Y. L., Li, Y., Lao, T. T. H., Zhang, X., & Dai, X. Q. (2005). Objective Evaluation of Skin Pressure Distribution of Graduated Elastic Compression Stockings. *Dermatologic Surgery*, 31(6), 615–624. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31603>

Paranix - Tratamento Piolhos. (2021). Retrieved May 16, 2021, from <https://www.paranix.eu/pt/tratamento-piolhos>

Produtos da Aquilea | Naturitas. (2021). Retrieved September 6, 2021, from <https://www.naturitas.pt/b/aquilea#>

Sigvaris - Insuficiência Venosa. (2021). Retrieved May 1, 2021, from <https://www.medivaris.pt/wp-content/uploads/2020/04/Sigvaris-Insuficiência-Venosa.pdf>

5. Anexo – Resultado de Rastreamento Cardiovascular



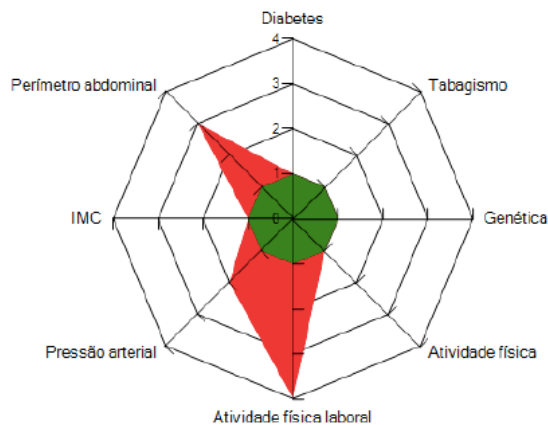
Nível de risco a 10 anos	
risco MCV VI	sobre 30%
risco MCV V	20% - 30%
risco MCV IV	15% - 20%
risco MCV III	10% - 15%
risco MCV II	5% - 10%
risco MCV I	menos 5%

A Avaliação do Risco Cardiovascular é realizada através de Mapas de Risco Cardiovascular elaborados pelo Instituto Superior de Saúde que prevê o uso de um valor de colesterol no plasma venoso nos últimos 6 meses. Se usou o valor obtido de autoanálise de sangue capilar, o resultado permitirá uma avaliação geral do risco cardiovascular e o médico poderá possivelmente decidir repetir o teste de plasma venoso.

O valor de colesterolemia foi detetado no autodiagnóstico na Farmácia

Com base nas respostas dadas, o Mapa de Risco Cardiovascular indica uma probabilidade de um evento cardiovascular, nos 10 anos seguintes, menos de 5%.

Mapa do Bem-Estar Cardiovascular Individual



Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Bluepharma Indústria Farmacêutica, SA

Departamento de Desenvolvimento do Negócio

Setor *Portfolio Management*



Lista de Siglas e Abreviaturas

BLPH – Bluepharma

DDN – Departamento de Desenvolvimento do Negócio

GP – Gestão de Portfólio

IF – Indústria Farmacêutica

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PM – do inglês *Portfolio Management*

SWOT – do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) culmina com a realização de um Estágio Curricular que considero ser de fulcral importância uma vez poderá ser realizado, para além de Farmácia Comunitária, numa outra área de interesse para a estudante, tal como Indústria Farmacêutica (IF) ou Farmácia Hospitalar. Durante todo o percurso académico do MICF, que abrange de forma vasta todas as etapas da cadeia de valor do medicamento, somos confrontados com as diversas saídas profissionais que este curso tem para oferecer e, desde o momento em que me foi apresentada a saída profissional para a IF, que nela reconheci uma oportunidade para conciliar o interesse pela ciência e saúde, com o gosto pelo mundo empresarial. Assim, deste esse primeiro contacto com a IF, fiquei convicta que um estágio nessa área seria crucial para decidir qual o rumo deveria seguir profissionalmente dado que, durante todo o percurso académico as Unidades Curricular de Tecnologia Farmacêutica e Comunicação e Marketing foram as que mais me interessaram. Foi nesse contexto que realizei a minha candidatura a fazer um Estágio Curricular na Bluepharma (BLPH) onde, após entrevista e análise do meu perfil, fiquei colocada no setor de *Portfolio Management* (PM)/ Gestão de Portfolio (GP), que se encontra integrado no Departamento de Desenvolvimento do Negócio (DDN).

A Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. foi fundada em 2001, aquando da aquisição da antiga fábrica da Bayer. Estrategicamente localizada em Coimbra, procurou desde sempre estar na vanguarda tendo, por isso, concentrado os seus principais esforços no fabrico, investigação, desenvolvimento e comercialização de medicamentos, sem nunca descurar dos mais elevados padrões de qualidade, assentes no know-how da sua equipa técnica especializada, com elevada experiência (“Bluepharma - About,” 2021).

Durante os seus 20 anos, esta empresa que, inicialmente começou com pouco mais de 50 colaboradores, apostou na sua constante expansão, tendo agora criado mais de 700 postos de trabalho, bem como diversas empresas *spin-off*, tais como a Luzitin e a TreatU, que têm como foco o desenvolvimento de soluções terapêuticas inovadoras. O DDN surge como uma consequência da aposta da empresa em todas as etapas de desenvolvimento de um produto genérico, nomeadamente no que diz respeito ao seu acesso ao mercado. Assim, as principais atividades do departamento podem dividir-se em dois grandes ramos: O primeiro, tem como principal atividade o licenciamento das tecnologias e produtos desenvolvidos pela BLPH, bem como o estabelecimento de relações simbióticas com empresas e distribuidores nacionais e internacionais e criação de oportunidades de negócio para a empresa (“Bluepharma - BDBusiness,” 2021); O segundo é o da GP, aquele em que tive oportunidade de estagiar, e

que foi recentemente criado. O setor de GP tem como principal missão potenciar o crescimento da empresa através de processos sistemáticos e baseados em dados. Desta forma, todas as novas ideias de produto/tecnológicas são sujeitas ao mesmo processo de análise, do qual resultam um ou mais candidatos a produto. Assim, a principal atividade realizada neste setor consiste no *screening* e avaliação de novos candidatos a medicamentos genéricos ou medicamentos de valor acrescentado, nas mais variadas formas farmacêuticas.

O estágio, inserido no plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, ocorreu de 11 de janeiro a 2 de abril de 2021 e o presente relatório destina-se a resumir e analisar o mesmo, através da metodologia SWOT (do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities* e *Threats*).

2. Análise SWOT

	Pontos Fortes	Pontos Fracos
Fatores Internos	<ul style="list-style-type: none"> • Processo de seleção; • Integração na equipa e relações interpessoais; • Utilização de conhecimentos e competências; • Conciliação de Investigação com <i>Business Development</i>; • Estímulo do sentido crítico e autonomia; • Utilização maioritária da Língua Inglesa aquando execução de tarefas; • Participação em diversas formações. 	<ul style="list-style-type: none"> • Duração do Estágio; • Falta de competências aprofundadas em Excel.
	Oportunidades	Ameaças
Fatores Externos	<ul style="list-style-type: none"> • Primeiro contacto com a Indústria Farmacêutica; • Oportunidade de trabalhar com novas plataformas e bases de dados; • Desenvolvimento de novas competências no âmbito da Propriedade Intelectual e mecanismos de proteção na Indústria Farmacêutica; • Introdução à Gestão do Portfolio de uma Indústria Farmacêutica; • Participação na segmentação do mercado de produtos estéreis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mercado dos medicamentos genéricos; • Contexto pandémico devido à Covid-19.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Processo de seleção

A seleção dos candidatos para a realização do Estágio Curricular na BLPH tem como base a análise do Curriculum Vitae (CV) dos mesmos, seguida de uma entrevista que, apesar de usualmente acontecer presencialmente, este ano realizou-se por via remota, com recurso à plataforma *Microsoft Teams*, devido ao contexto pandémico da COVID-19. Na minha ótica, este formato de seleção de candidatos destaca-se dos demais uma vez que, por não se basear exclusivamente da média curricular dos estudantes, permite avaliar diversas competências, nomeadamente as tão badaladas *soft skills*, que não se encontram somente espelhadas nos resultados académicos. Assim, ao possibilitar um primeiro contacto com cada candidato, torna-se viável a adequação do mesmo para o setor/departamento da empresa que mais se adeque às suas capacidades.

2.1.2. Integração na equipa e relações interpessoais

Desde primeiro dia na BLPH que senti que fui extremamente recebida por toda a equipa, tanto na empresa em geral, como no meu departamento em particular. Considero que a sessão de boas-vindas realizada de forma pessoal, seguida de primeiro contacto com o departamento e com aquele que seria o orientador do estágio, e almoço na cantina da empresa também pessoalmente, apesar da situação pandémica em que nos encontrávamos, foi determinante para que a integração corresse da melhor forma.

Depois deste primeiro contacto, seguimos para “trabalho à distância” no resto do estágio. Contudo, apesar da comunicação ser realizada remotamente, apenas através de um computador, nunca me senti desorientada ou desamparada, tendo tido sempre um contacto próximo com todos os membros da equipa com quem trabalhei diariamente. Posto isto, não posso deixar de agradecer à Ana Patrícia Rei, bem como aos restantes membros da equipa do GP, Catarina Gromicho e Maria João Soares, com quem trabalhei mais proximamente, por todo o conhecimento transmitido e apoio dado durante todo o estágio. Considero que foram determinantes para o sucesso do mesmo. Por fim, e no seguimento do que acabei de referir, não posso deixar de enaltecer o fantástico espírito de equipa e ambiente de trabalho que encontrei e que, decerto, contribuíram igualmente para que este estágio fosse tão gratificante.

2.1.3. Utilização de conhecimentos e competências

No setor do GP lidamos diariamente com bases de dados e plataformas que, até iniciar este estágio, me eram totalmente desconhecidas. Para além das plataformas, também certos termos e conceitos, ligados à área financeira e de gestão, não faziam parte do meu leque de conhecimentos ao início do mesmo. Contudo, fez igualmente parte do meu quotidiano a análise de patentes, conceito esse que já me era familiar. No 4º (quarto) ano do MICF escolhi como Unidade Curricular Opcional “Propriedade Intelectual, Inovação e Empreendedorismo” onde aprendi diversos conceitos gerais sobre proteção intelectual, patentes e *pitch* de ideias de negócio. Todo o conhecimento aprendido durante esse semestre foi de fulcral importância para o desempenho das funções que me foram propostas ao longo do estágio, uma vez que, na sua grande maioria, envolviam análise de patentes, bem como apresentação das tarefas e trabalho que ia sendo realizado. Para além disso, devido ao abrangente leque de tarefas que me foram propostas, tive igualmente oportunidade de pôr em prática o amplo conjunto de noções e de saber, relacionados com o medicamento, que apreendi ao longo do MICF, de entre os quais destaco a identificação de grupos de identidades químicas usadas para tratar certa indicação terapêutica e compreensão de mecanismos de ação de fármacos.

2.1.4. Conciliar Investigação com Business Development

Como já tive oportunidade de expor anteriormente, o departamento do DDN sofreu uma reestruturação pouco antes de ter iniciado o meu estágio. Desta feita, no setor onde estagiei, tive não só a oportunidade de aprofundar e adquirir conhecimentos a nível da fármaco-economia, nomeadamente através da análise de mercado de diversas moléculas e produtos farmacêuticos, bem como a nível de investigação, não só em termos de entidades químicas, fármacos e produtos, bem como no que concerne a certas indicações terapêuticas e tecnologias.

2.1.5. Estímulo autonomia e sentido crítico

Considero que o meu estágio na BLPH, por ser essencialmente prático ao invés de observacional, me deu oportunidade de realizar autonomamente um considerável leque de tarefas. Como tal, creio que o cariz predominantemente prático do estágio contribuiu para que estimulasse a autonomia aquando da realização das tarefas. A par do apoio e disponibilidade para esclarecimento de dúvidas, foi-me sempre concedida liberdade para a execução das tarefas, o que me permitiu explorar soluções para os problemas que fossem surgindo aquando da realização das mesmas. Para além disso, grande parte dos projetos que

me foram propostos envolviam a seleção de informação e posterior compilação pelo que apelou ao meu espírito crítico de forma a proceder corretamente à seleção da informação que considerei relevante para cada tarefa.

2.1.6. Utilização maioritária da Língua Inglesa aquando execução de tarefas

O conhecimento e domínio da língua inglesa é uma mais-valia que, por via da constante globalização atualmente que assistimos, se transformou num requisito indispensável para qualquer profissional. De facto, a utilização desta língua foi transversal ao meu dia-a-dia, aquando da concretização das tarefas que me foram propostas, não só devido ao facto de ser o idioma em que se encontra toda a informação relevante, como também por toda a esquematização e concretização de pesquisas que efetuei ser realizada igualmente em inglês. Assim, considero que os conhecimentos prévios que tinha da língua facilitaram a execução das tarefas, contudo reconheço igualmente que o uso diário da mesma potenciou as minhas capacidades de compreensão oral e escrita da língua inglesa.

2.1.7. Participação em diversas formações

Para além da formação adquirida aquando do início do estágio, onde me foram apresentados todos os conceitos base que seriam transversais às tarefas que me foram propostas ao longo dos meses que passei na BLPH, tive oportunidade de participar em diversas formações internas, ministradas por vários departamentos da empresa, e externas, ministradas por vários organismos de renome internacional, entre os quais destaco a *Food and Drug Administration* (FDA). Considero esta oportunidade de participar em diversas formações, nomeadamente ligadas à Gestão de Projetos, Capacidade de Fabrico de Estéreis ou até Prospeções de Mercado para o Presente Ano dada a COVID-19, como um inequívoco ponto forte do meu estágio, na medida em que permitiu alargar o meu leque de conhecimentos, enriquecendo, assim, tanto pessoal como profissionalmente a minha formação.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Duração do estágio

Apesar de, no 5º ano do MICF, nos ser dada oportunidade de fazer mais que um Estágio Curricular, aquele que tem maior componente temporal é o estágio em Farmácia Comunitária. Não obstante à importância que reconheço a este estágio, uma vez que nos permite ter contacto com aquela que será, porventura, a saída profissional mais comum do MICF, não posso deixar de refletir sobre a igual relevância que tem o facto de se experimentar diversas

áreas, de forma a ter perceção do que realmente se gosta de fazer. Posto isto, apesar de sentir que este estágio foi, sem dúvida, muito enriquecedor para o meu percurso académico, reconheço que peca pela sua relativamente curta duração na medida em que um estágio com maior duração, permitiria, decerto, não só adquirir novas competências, bem como, consolidar as competências já apreendidas.

2.2.2. Falta de competências aprofundadas de Excel

Aquando da entrevista de seleção de candidatos para o presente estágio, quando me foi perguntado relativamente às minhas competências de *Office*, especificamente de *Excel*, respondi que me sentia à vontade para trabalhar com todas as ferramentas uma vez que, durante o MICF, fomos confrontados com diversas situações que foi necessário realizar partes de relatórios e atividades experimentais em *Excel*. Contudo, no desenrolar das atividades que me foram propostas durante o estágio pude constatar que as minhas competências em *Excel* tinham algumas lacunas. Ainda assim, creio que este “Ponto Fraco” rapidamente se transformou numa “Oportunidade” uma vez que me dotou de competências a nível desta ferramenta do *Office* que não tinha anteriormente, bem como surgiu como mais um exemplo das diversas competências que tive oportunidade de adquirir e aprofundar durante os 3 (três) meses em que tive oportunidade de trabalhar com a equipa de PM, no DDN da BLPH. Posto isto, gostaria de realçar uma vez mais a disponibilidade que toda a equipa teve em esclarecer as dúvidas que me foram surgindo no decorrer das tarefas que me foram propostas.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Primeiro contacto com a Indústria Farmacêutica

Como já tive oportunidade de referir anteriormente, desde que me foi apresentada a saída profissional do MICF para a IF que decidi que seria crucial para completar o meu percurso académico um estágio em IF, por ser a área que mais interesse me despertou ao longo de todo o curso. Posto isto, não posso deixar de realçar como ponto forte da minha formação académica o concretizar deste objetivo, bem como de sublinhar o quão gratificante foi, para mim, esta experiência, uma vez que superou as minhas expectativas, quer pessoais quer académicas. Considero que, especialmente no DDN, o trabalho desenvolvido é de real importância e poderá, verdadeiramente, fazer diferença na vida da população e só veio aguçar, ainda mais, o meu gosto pessoal por esta saída profissional.

2.3.2. Oportunidade para trabalhar com novas plataformas e bases de dados

2.3.2.1. IMS

Uma plataforma que me era desconhecida, até começar o presente estágio, e com a qual tive oportunidade de trabalhar quase diariamente foi o IMS. O IMS (do inglês, *Intercontinental Medical Statistics*) é uma plataforma que nos permite obter diversos dados de mercado relativamente a moléculas e produtos. Esta plataforma tem diversos filtros, entre os quais, o de forma farmacêutica, dosagem, fabricante, entre outros, que nos permite adequar da melhor forma a pesquisa, consoante for o objetivo da mesma. Na plataforma temos ainda a oportunidade de escolher que dados pretendemos obter, seja em termos de vendas ou volume de unidades vendidas, no horizonte temporal selecionado.

O uso desta plataforma surgiu logo no início do meu estágio onde, após uma formação inicial, comecei a tirar autonomamente dados relativamente aos produtos solicitados, que serviram de base a muitas decisões fulcrais para apostas estratégicas da BLPH, e estendeu-se até ao último dia de estágio, sendo assim transversal a quase todas as tarefas que me foram propostas

2.3.2.2. IPD Analytics®

Outra plataforma com a qual tive oportunidade de trabalhar regularmente foi o IPD Analytics®. O IPD é uma base de dados internacional que fornece informações relevantes no que diz respeito à proteção da propriedade intelectual de diversos produtos farmacêuticos (“IPD Analytics,” 2021). Através desta plataforma, temos acesso aos mais diversos dados, entre os quais realço, uma breve explicação do produtos farmacêutico em questão e das indicações terapêuticas para as quais está aprovado, identificação e exposição das patentes que o protegem, previsão da data, ou datas, de perda de exclusividade do produtos para os mais diversos territórios (Estados Unidos, Europa, Brasil, entre outros), previsão e identificação de potenciais empresas concorrentes e, por fim, antevisão do possível comportamento do mercado nos anos seguintes, bem como dos fatores que o influenciarão. Deste modo, considero que a oportunidade de trabalhar com esta ferramenta foi uma mais-valia para o meu estágio na medida em que esta providencia alguma clareza naquilo a opacidade característica no ramo das patentes, permitindo que eventuais decisões que precisem de ser tomadas, o sejam com o maior leque de informação disponível e, conseqüentemente, com maior segurança e mais abrangente percepção da conjuntura do mercado global, não só no presente ano, bem como em anos futuros.

2.3.2.3. Cortellis™

Por último, tive também oportunidade de trabalhar com a plataforma Cortellis™. O Cortellis™ é uma plataforma que reúne um vasto leque de informação relacionada com moléculas, princípios ativos, fármacos, interações farmacológicas, ensaios clínicos, entre outros. O uso desta plataforma foi, à semelhança das anteriores, transversal ao meu estágio, dado que consegue, numa só página, agregar uma enorme quantidade de informação fiável e objetiva, que permite a toma de decisões informadas (“Home - Cortellis,” 2021). Desta forma, foi-me possível realizar pesquisas igualmente extensivas, de uma maneira mais eficiente, o que agilizou todo o processo de recolha e seleção de informação.

2.3.3. Desenvolvimento de novas competências no âmbito da propriedade intelectual e mecanismos de proteção na Indústria Farmacêutica

Aquando da integração na equipa da GP na BLPH foram-me sugeridas uma série de formações às quais deveria assistir durante a primeira semana, de forma a ficar mais enquadrada com o trabalho que é diariamente realizado no departamento. Uma das formações que me foi sugerida foi exatamente sobre Propriedade Intelectual e Mecanismos de Proteção na Indústria Farmacêuticas, que considero ter sido fulcral para compreender mais facilmente as tarefas que iria desenrolar nas semanas que se seguiram, uma vez que envolveram transversalmente esse tema. Os mecanismos de proteção da indústria farmacêutica são cruciais para o sucesso de qualquer invenção visto que, por mais inovadora que seja, caso não esteja bem protegida, perde valor. Esta importância vê-se amplificada no caso das indústrias farmacêuticas devido ao elevado investimento, quer em termos de valor, quer em termos de tempo, inerente ao desenvolvimento de qualquer produto farmacêutico.

Deste modo, para além de reforçar e consolidar conhecimentos adquiridos na Unidade Curricular Opcional “Propriedade Intelectual, Inovação e Empreendedorismo”, onde também abordamos os mecanismos de proteção de uma invenção, tive igualmente oportunidade de perceber quais os incentivos dados pelas autoridades, tanto aos medicamentos inovadores como à entrada de genéricos no mercado, bem como de perceber a melhor forma de gerir ciclo de vida de um produto. De realçar, no âmbito dos incentivos a medicamentos inovadores, a exclusividade de mercado e de dados, de forma a prevenir a entrada precoce de competidores e por outro lado, no que diz respeito a incentivos aos medicamentos genéricos, através de exclusividades dadas para novas indicações terapêuticas de medicamentos já existentes no mercado bem como exclusividade para primeira(s) empresa(s) a submeter um medicamento genérico, assim que o inovador perca a exclusividade. Por fim, e no que diz

respeito à gestão do ciclo de vida de um produto, realço ainda as aprendizagens que fiz sobre as estratégias que permitem estender o tempo em que o inovador pode reaver o investimento feito no seu desenvolvimento, tais como extensões à patente, indicações pediátricas, extensões de linha ou acordos com empresas que desenvolvem os medicamentos genéricos, relativamente à entrada dos mesmos no mercado.

2.3.4. Introdução à Gestão de Portfolio de uma Indústria Farmacêutica

O sucesso e longevidade de uma IF depende, tal como qualquer outra empresa, do triunfo das apostas que faz, não só em termos de produtos, como recursos humanos e industriais. Posto isto, durante este estágio, tive oportunidade de me aperceber de todo o racional por detrás da aposta num determinado fármaco, bem como de todas as dinâmicas envolvidas na potenciação do negócio da BLPH. Como sabemos, a BLPH encontra-se em constante crescimento sendo, por isso, de fulcral importância o correto investimento dos seus recursos, de forma a perpetuar o referido ascendente. Durante o presente estágio, como já referi, pude aperceber-me destas dinâmicas que envolvem, não só uma profunda pesquisa sobre o produto, competição do mesmo e fatores que nos possam diferenciar dos restantes, como também um estudo dos recursos necessários para o obter. Este trabalho é da maior importância para a empresa, pelo que envolve diversas equipas, que trabalham simultânea e organizadamente, com o objetivo de obter o melhor portfolio de produtos possível.

2.3.5. Participação na segmentação do mercado de produtos estéreis

Um dos projetos mais gratificantes em que tive oportunidade de participar num estudo inicial de segmentação do mercado de produtos estéreis para apoiar o potencial futuro da BLPH no desenvolvimento deste tipo de produtos. Durante a parte final do meu estágio tive oportunidade de participar em tarefas que envolveram a segmentação de mercado e a pesquisa de informação necessária para a seleção de potenciais candidatos para o referido estudo. Tive ainda oportunidade de assistir a diversas reuniões, onde foram apresentados os resultados de pesquisas exaustivas realizadas pela GP e por outros departamentos envolvidos, como é o caso do Departamento de Investigação. Considero que a oportunidade de participar neste projeto foi de elevada importância para o meu percurso, dado que me permitiu perceber parte do racional estratégico por detrás da construção e lançamento de uma nova unidade. Por fim, considero relevante salientar ainda que a oportunidade de participar num projeto como este foi muito gratificante, enriquecendo o meu estágio, por todos os argumentos previamente expostos.

2.4. Ameaças

2.4.1. Mercado dos medicamentos genéricos

Durante as tarefas que me foram propostas no decorrer do meu estágio, tive oportunidade de me aperceber das dificuldades inerentes ao lançamento de um novo produto no mercado. Através das avaliações nas quais participei pude concluir que, na esmagadora maioria das vezes, os produtos que têm vendas e volumes significantes nos Estados Unidos e nos considerados países do “Top 5” da Europa, o Reino Unido, a Alemanha, França, Itália e Espanha, são sujeitos a alta competição e erosão de preços, pelo que, a escolha criteriosa dos melhores produtos se impõe como fulcral para o crescimento de qualquer empresa.

2.4.2. Contexto pandémico devido à Covid-19

Apesar de considerar que este estágio foi, sem dúvida, uma das aprendizagens mais gratificantes do meu percurso académico, é difícil não me questionar se a experiência não teria sido ainda melhor, caso não existissem todas as limitações inerentes ao contexto pandémico da COVID-19. Como já tive oportunidade de referir anteriormente, apenas tive oportunidade de ir às instalações da BLPH Indústria no primeiro dia do estágio, aquando da sessão de acolhimento e noutras ocasiões, brevemente, para resolver burocracias relacionadas com o estágio. Posto isto, e apesar da equipa na qual fui enquadrada me ter feito sempre um acompanhamento muito próximo, não posso deixar de imaginar que a dinâmica teria sido certamente diferente caso estivéssemos a trabalhar nas instalações da empresa. Contudo, na fase em que vivemos, o mais importante era salvaguardar a saúde de todos, de forma ultrapassar a pandemia, e, como tal, considero que não haveria melhor forma de o fazer senão colocar os departamentos que dispensassem das instalações físicas da empresa em teletrabalho. Tendo isto em conta, não posso deixar de agradecer uma vez mais à equipa da GP por todo o apoio dado durante os meses de estágio e por, apesar de todas as contingências a que a COVID-19 obriga, me ter proporcionado um dia de trabalho “normal”, no qual nos deslocámos todas à empresa e trabalhamos como trabalharíamos caso o país não estivesse a atravessar a presente situação pandémica, sempre cumprindo com todas as recomendações de higiene e distanciamento social dadas pela Direção Geral da Saúde (DGS). Por último, não posso deixar de agradecer à BLPH, por, aquando da comunicação de que iríamos realizar o estágio em casa, nos ter providenciado todos os meios para que o pudéssemos fazer nas melhores condições.

3. Conclusão

Dado o abrangente leque de conhecimentos possuídos por um farmacêutico e as diversas tarefas que o mesmo pode desempenhar ao longo de todo o ciclo de vida do medicamento, a possibilidade de realizar mais que um estágio no último ano do MICF surge como uma inegável mais-valia proporcionada pela FFUC, uma vez que permite que os alunos tenham um primeiro contacto com áreas que lhes despertem mais interesse e onde, porventura, o papel do farmacêutico não seja tão claro ou óbvio. Posto isto, considero que este estágio teve um papel crucial no meu percurso académico dado que me deu oportunidade de conhecer o quotidiano de uma grande indústria farmacêutica, em particular as atividades inerentes à gestão do portfolio da mesma. Durante os 3 (três) meses de duração do mesmo, tive o privilégio de encontrar uma equipa que me incentivou a ter espírito crítico enquanto, simultaneamente, me deu autonomia aquando da realização das tarefas propostas, tarefas essas que, pela abrangência que tiveram, contribuíram aumentar o meu leque de conhecimentos nas mais diversas áreas. De salientar ainda que, por ter sido o meu primeiro contacto com o mercado de trabalho, me conferiu uma preparação adicional que penso que complementou na perfeição o extenso plano de estudos teórico do MICF. Posto isto, considero que esta experiência não só cumpriu, como excedeu todas as minhas expectativas, enriquecendo-me tanto a nível pessoal como profissional, marcando, assim, esta última etapa do meu percurso académico de forma muito positiva.

4. Referências Bibliográficas

Bluepharma - About. (2021). Retrieved April 9, 2021, from <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>

Bluepharma - BDBusiness. (2021). Retrieved April 9, 2021, from <https://www.bluepharma.pt/bdbusiness.php>

Home - Cortellis. (2021). Retrieved August 31, 2021, from <https://clarivate.com/cortellis/>

IPD Analytics. (2021). Retrieved April 9, 2021, from <http://www.ipdanalytics.com>

Parte III

Monografia

“The CSF route of delivery to the brain for molecular-based therapies”

Resumo

Os oligonucleótidos anti-sense e os vetores virais adeno-associados têm sido recentemente considerados promissores para o tratamento de doenças que afetam o sistema nervoso central, doenças essas amplamente conhecidas como das mais desafiantes de tratar. Contudo, estes sistemas terapêuticos, devido à sua elevada dimensão, apresentam uma penetração limitada da Barreira Hematoencefálica, o que dificulta a administração dos mesmos por vias comuns, tais como a via intravenosa. É desse desafio que surge o presente trabalho, que se foca, portanto, na viabilidade da administração destes fármacos diretamente no líquido cefalorraquidiano, dado que, para além da função protetora que desempenha, é também um componente ativo e dinâmico do Sistema Nervoso Central, permitindo o acesso direto destes fármacos, deste modo contornando a barreira hematoencefálica.

Palavras-chave: Líquido Cefalorraquidiano; Sistema Nervoso Central; Barreira Hematoencefálica; Oligonucleótidos Anti-sense; Vírus Adenoassociados; Doenças Neurodegenerativas; Sistema Glinfático de Cérebro.

Abstract

Anti-sense oligonucleotide and adeno-associated viral vectors have been considered promising therapeutical options for the treatment of neurological diseases, broadly known as the most challenging to treat. However, these compounds are large therapeutic systems with limited capacity to transpose the Blood Brain Barrier, which derails the common routes of administration, such as the intravenous route. It is from that hurdle that arouses the subject of the present paper, which focuses on the CSF route of delivery to the brain for molecular-based therapies, once this fluid, in addition to its protective role, is also an active and dynamic component of the Central Nervous System, allowing for these promising drugs to circumvent the Blood Brain Barrier, and consequently, directly access the brain.

Keywords: Cerebrospinal Fluid; Central Nervous System; Blood Brain Barrier; Antisense Oligonucleotides; Adeno-associated viral vector; Neurological diseases; Glymphatic System of the Brain.

Abbreviations

AAV – Adeno-associated virus

AAV-9 – AAV serotype 9

AG – Arachnoid Granulations

AQP4 – Aquaporin-4 channels (AQP4)

ASOs – Antisense-oligonucleotides

AV – Arachnoid Villi

BBB – Brain Blood Barrier

CM – *Cisterna Magna*

CNS – Central Nervous System

CSF – Cerebrospinal Fluid

ICM – Injection in the cisterna magna

ICV – Injection in the lateral ventricles

ISF – Interstitial fluid

IT – Intrathecal administration

NPC1 – Niemann-Pick Disease Type C1

rAAV – Recombinant adeno-associated virus

RNAi – RNA interference

SAS – Sub Arachnoid Space

I. Introduction

Brain disorders emerge among the most difficult conditions to treat, being this difficulty clearly reflected in the small number of promising therapeutic options developed in the last decade. Recently, molecular-based therapies, such as therapies based on anti-sense oligonucleotides (ASOs) or RNA interference (RNAi) molecules emerged as promising drugs for the treatment of these diseases due to their specificity which allows achieving optimal therapeutic concentrations, in some cases with only one administration and few adverse events. However, these therapeutics are characterized as large systems and, because of that, have limited capacity to transverse the brain-blood barrier, which has slowed the progress of the development of these therapeutics (Pardridge, 2020). Thus, this hurdle presents itself as the major obstacle that desperately needs to be overcome once the conventional routes of administration are out of play due to the lack of efficacy associated as well with high peripheral toxicity that results from the larger doses required to achieve not only the targeted locations, in this particular case the brain, but also to accomplish satisfactory results (Chen, Hu, & Ju, 2020; Pardridge, 2020).

It is in this context that arouses the subject of this article, the CSF route, to deliver molecular-based therapies safely and effectively to the brain. With that in mind, it is of utmost importance to understand the role of the Cerebrospinal Fluid (CSF) in brain dynamics, as well as its functions and physiology, mechanisms of drug penetration throughout administration in the CSF, and the characterization of the different sub-routes of drug delivery through this method. Accordingly, in this article we focus on 3 modalities of CSF delivery, namely: the intrathecal administration (IT), the injection in the lateral ventricles (ICV), and the injection in the cisterna magna (ICM), as these are the ones for which there is the largest amount of data for clinical use. Initially, the most obvious route of administration was the intrathecal administration given that it is the one that reunites the largest amount of data and that is already routinely used in the clinical practice. However, recent studies have shown that following intrathecal administration the drug distribution in the brain is limited and, because of that, new approaches have to be considered.

Lastly, it is relevant to do a revision of drugs that are already administrated directly into the CSF, and finally, of molecular-based therapies given the promising results recently obtained for therapy of brain disorders, focusing on the delivery of antisense oligonucleotides and adeno-associated virus to the brain.

2. The role of CSF: functions and physiology

Even though the discovery of the CSF happened in the sixteenth century and the majority of the findings about its functions and physiology go back to the nineteenth century, significant advances have been made recently concerning the CSF functions (Sonig *et al.*, 2020). It is already well known that the CSF is a clear fluid produced mainly by the choroid plexus that flows throughout the four ventricles of the brain, with a turnover of complete replacement approximately 3 times a day and is excreted through the blood or the lymphatic system. The choroid plexus results from expansions of the third and fourth ventricles and consists of folded membranal structures that are significantly vascularized, in this way contributing to increase the surface area for the transference of solutes (Kouzehgarani *et al.*, 2021). The main function of the CSF is to offer the brain a mechanical shield as well as a guarantee that the metabolic waste is cleared (Fame & Lehtinen, 2020; Ng Kee Kwong, Mehta, Nedergaard, & Chandran, 2020). The CSF is strictly regulated in terms of pH, osmolality, and volume because, otherwise, the normal brain development and function would be compromised (Fame & Lehtinen, 2020).

One of the most important recent discoveries links the CSF to the lymphatic system. While most of the organs in our body have, in the interstitial tissue, lymphatic vessels that help to drain surpluses from the blood circulation, that does not happen for the brain and spinal cord parenchyma and, therefore, the CSF must be drained through a different mechanism. There are several theories to explain how the CSF is drained from the brain but, the most recent and exciting finding, suggests that lymphatic vessels discovered in the dura matter could have an important role. Other theories involve the Arachnoid Villi (AV), Arachnoid Granulations (AG), and routes through cranial nerves in the foramina (Proulx, 2021).

The first hypothesis to be described involved routes for the CSF drainage along the cranial nerves. The earliest discoveries go back to the Galen time and relate the CSF outflow with the cribriform plate (Proulx, 2021; Woollam, 1957). This structure is a fragment of the ethmoid bone which divides the nasal roof from the cranial fossa. Despite the knowledge about the existence of an anatomical connection between the nasal sub-mucosal lymphatics and the Sub Arachnoid Space (SAS), the possible pathways for the CSF to be drained throughout this structure are still under investigation (Brady *et al.*, 2020; Proulx, 2021; Q *et al.*, 2019; Sokołowski *et al.*, 2018). The hypothesis that concentrates the most relevant evidence is a perineural path related to the olfactory nerves which is defined as an addition of the meningeal layers in a way that the SAS is uninterrupted with the perineural space alongside

the nerves as they depart through foramina in the cribriform plate. As illustrated in Figure 1, once the CSF gets to the cribriform plate, it goes through to the nasal cavity, and fulfills the lumen of the lymphatic vessels (Brady *et al.*, 2020; Proulx, 2021; Sokołowski *et al.*, 2018).

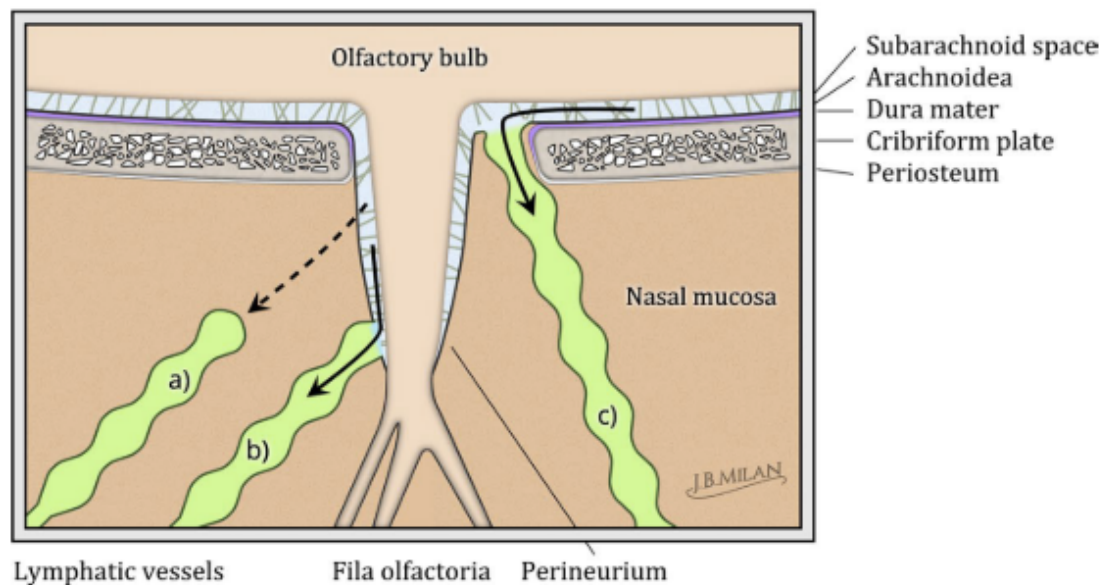


Figure 1 - Anatomical routes of CSF outflow through the cribriform plate. (A) Outflow route along an adjacent subarachnoid-perineural-space. (B) CSF traverses the plate through a perineural space and then has a direct route to lymphatic capillaries that are around the nerve. (C) Lymphatic vessels cross the cribriform plate in order to directly access the CSF on the CNS side. Illustration by Joachim Birch Milan. Reproduced with permission from Proulx, 2021.

Although the CSF outflow pathways besides other cranial nerves haven't yet got consolidated data, strong evidence suggests that jugular foramina may also play a role in the process (Proulx, 2021). Three nerves are present at the jugular foramina (opening): the accessory, the vagus, and the glossopharyngeal nerves which, in turn, are connected with lymphatic vessels in the cervical lymph node, thus providing a possible road for the drainage of the CSF (Proulx, 2021; Yağmurlu *et al.*, 2020).

On the other hand, as schematized in Figure 2, the classic theory is that the CSF is drained through the arachnoid protrusions, that can be divided in: the arachnoid granulations, which can be visualized to the bare eye, and, on the other hand, the arachnoid villi, which are microscopic. At the top of these projections, there is a layer that directly communicates with the venous sinuses of the dura mater, spotting them in a perfect location to outflow the CSF, once accumulated in the SAS, to the venous blood through channel-like mechanisms. Although the relationship between the arachnoid protrusions and the outflow of the CSF from the brain is not fully demonstrated, it is already established that under elevated pressure these structures expand, consequently operating as pressure valves and creating pathways for the CSF to flow. (McKnight, Rouleau, Donahue, & Claassen, 2020; Proulx, 2021).

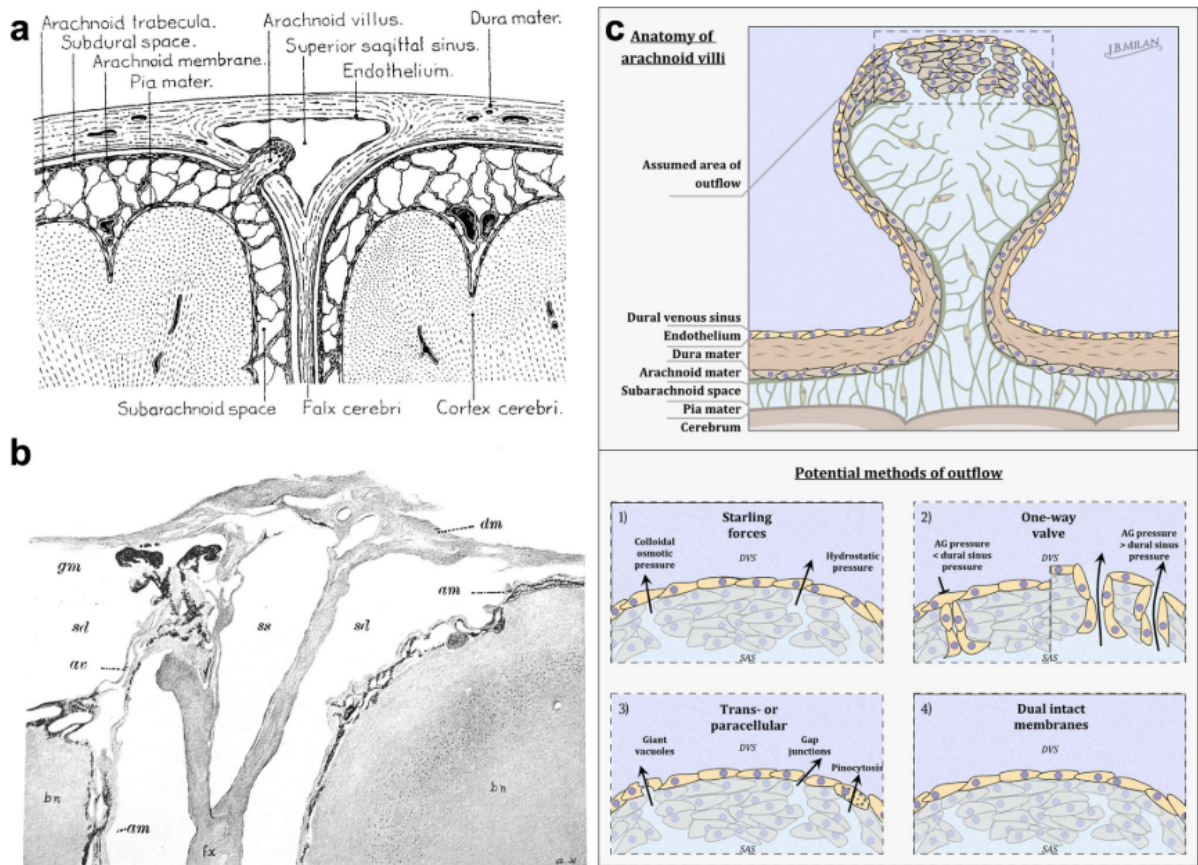


Figure 2 - Possible mechanisms for CSF outflow through arachnoid projections. (1) Represents the hypothesis of Starling forces in which satisfactory hydrostatic and osmotic gradients may exist in the endothelial cell lining, facilitating the CSF outflow through the dural venous sinus. (2) Represents the hypothesis of arachnoid granulations as channels that, when hydrostatic pressure allows, open for CSF and other molecules to flow through. If the pressure in the sinus is above that of the SAS, then the channels close. (3) Represents different models by which the flow may happen through the intact layer of endothelial cell in the projections. (4) Represents a hypothesis of a dual-layer of intact endothelial cells, that wouldn't allow CSF to flow. Yet, these layers may be disrupted if the intracranial pressure is high enough, allowing rapid CSF outflow. Reproduced with permission from Proulx, S. T., 2021.

As previously said, the interest in the pathways of the CSF outflow was recently restored with the rediscovery of the lymphatic vessels in the CNS meninges, already characterized as the most significant probable path for the CSF efflux, in 2015 (Proulx, 2021; Mestre, Mori, & Nedergaard, 2020). The main interrogation regarding this subject is, knowing that the major discoveries about the CSF were made in the nineteenth century, how did this remain in the dark until now? Primarily, it should be considered that significant details about the CSF flow and physiology are yet to be unruffled and second, that there are numerous misconceptions about the CSF flow in the brain that result from the fact that this fluid is extremely affected by distress conditions, such as a stroke or disease. Consequently, once the majority of data is recollected *post-mortem*, these conditions will unavoidably be reflected in the gathered information. In that in mind, it is of the most importance to make observations in live animals, due to the accuracy of the data, rather than *post-mortem* recollections (Mestre, Mori, & Nedergaard, 2020; Natale *et al.*, 2021). Despite the recent intense focus on these vessels, it is important to highlight that several investigators had already identified lymphatic

vessels in the past, but this was repeatedly questioned because of the knowledge that there is an arachnoid barrier between the SAS and the interstitial layer of the dura mater that basically separates the dura mater from the Central Nervous System (CNS). Some studies have also explored the possibility that this layer may have pores in some locations at the base of the skull, that grant access to the SAS and therefore to the lymphatic vessels, also named the glymphatic system of the brain (Mestre *et al.*, 2020; Natale *et al.*, 2021; Proulx, 2021).

After clarifying the reasons that lead to this restored interest in the CSF outflow, it is important to define this system and to explore the rationale behind this route of CSF drainage. The glymphatic system of the brain consists in the influx of periarterial CSF in the same direction as the blood flow, impelled by the pulsatile movements of the arterial wall (H *et al.*, 2018; JJ *et al.*, 2013; Mestre *et al.*, 2020). This system is the key path of CSF drainage, responsible to ensure that the CSF flows in the same orientation as the blood, mixes with the interstitial fluid (ISF), as can be seen in Figure 3, with the assistance of aquaporin-4 channels (AQP4). These pores are abundantly present in the astrocytes and make paths for the CSF to exit the brain through the perivenous space and leave the CNS via meningeal lymphatic vessels and soft tissue that is adjacent to the skull (Agarwal & Carare, 2021; Mestre *et al.*, 2020; Natale *et al.*, 2021). This outflow by the lymphatic vessels is considered to be fast based on the knowledge that substances injected in the CSF concentrate within minutes in the cervical lymph nodes (Agarwal & Carare, 2021; Mestre *et al.*, 2020).

Finally, a quick mention of the CSF outflow from the intrathecal space. Although it is known that it happens through nerve roots and lymphatic vessels, it has a much lower impact on the CSF outflow from the cranial region and, therefore, it will not be explored on this work (Proulx, 2021).

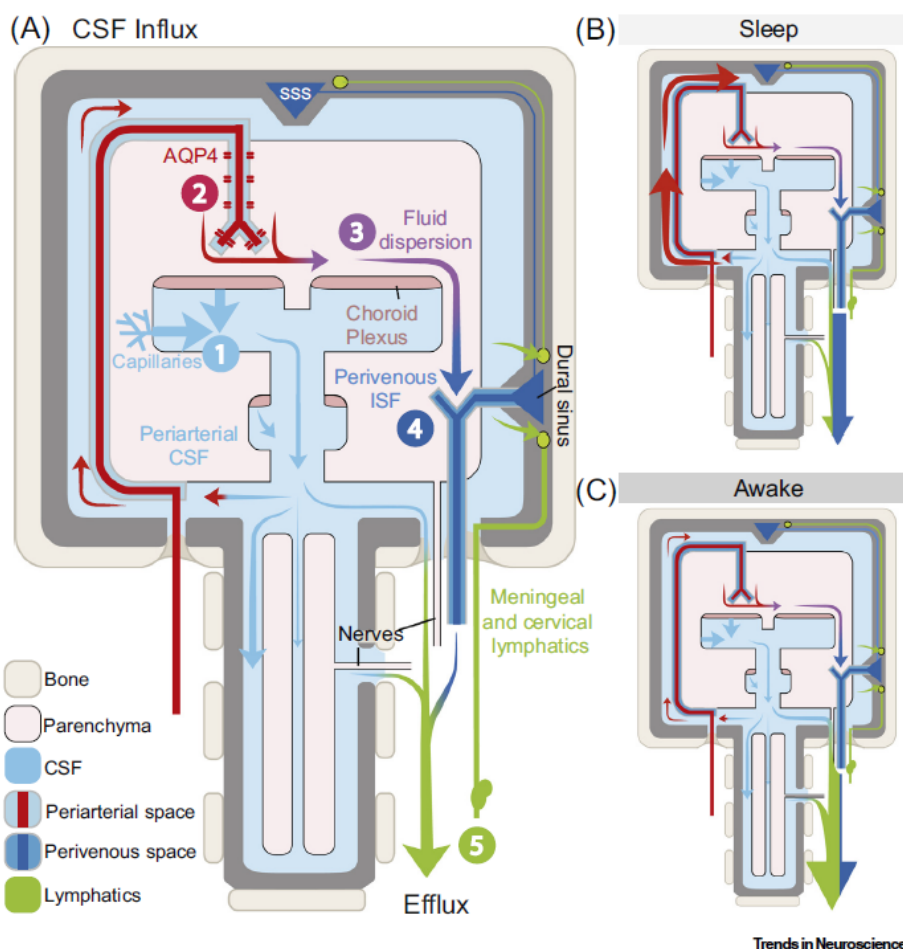


Figure 3 - (A) Model for the CSF influx, which can be divided into five parts: (1) CSF production in the choroid plexus, (2) CSF goes into the brain through perivascular spaces as a result of pulsatile movements of the arterial wall, (3) CSF penetrates the brain parenchyma through aquaporin-4 water channels; (4) CSF gets mixed with the ISF, accumulates in the perivenous space and exits the brain via (5) meningeal and cervical lymphatic vessels and cranial nerves. (B) and (C) represent the major routes of CSF flow during sleep (B) when CSF enters the brain through the glymphatic system, and during the awake time (C), when CSF gets excluded via lymphatic vessels. Images reproduced with permission from Mestre, H., Mori, Y., & Nedergaard, M., 2020.

3. The CSF route for drug delivery in brain disorders

As broadly known, brain disorders are among the hardest to treat due to the challenges associated, on one hand, with the ability to trespass the Blood-Brain Barrier (BBB) and, on the other hand, the implications associated with delivering drugs directly to the brain (Pardridge, 2016, 2020). Since molecular-based therapies involve large molecules or entities such as viral vectors, they have limited ability to overcome the BBB and so require direct administration in the brain. Nevertheless, each CSF drug administration sub-routes, such as the injection in the cisterna magna, has specific issues and the protective function that the CSF has in the brain may arouse some other challenges. Importantly, these therapeutic approaches recently emerged as highly promising due to the fact that in many cases they target the molecular cause of the disease, provide a more lasting therapeutic effect, requiring fewer administrations, with

less frequent or significant adverse effects even though simultaneously magnifying the already described challenges (Pardridge, 2020).

To fully comprehend drug administration in the CSF, it is imperative to demystify two recurrent misapprehensions. Firstly, it is crucial to clarify that drug penetration in the brain through the CSF has no correlation with the drug capacity to cross or transpose the BBB upon intravenous injection, and yet it has no undeviating association with this membrane's permeability. In fact, drug penetration can be described as a measure of the capability that the administered drug has to cross the choroid plexus, which is where the CSF is produced. The other misunderstanding, perhaps the most recurrent one, is that any drug, active, or substance that is directly administered in the CSF has the ability to deeply penetrate into the brain (Pardridge, 2016, 2020). The correct interpretation is that drugs administered through this route are primarily distributed to the bloodstream because the CSF circulates to the ependymal surface of the brain (Pardridge, 2016). Nevertheless, while this is not easily achieved, drugs administered in the CSF can reach the brain parenchyma.

At the moment, three major pathways of drug penetration in the brain through the CSF can be considered: the blood-borne route, the direct diffusion through the ependymal layer, and the convection pathway (Pardridge, 2016; Rizk, Zou, Savic, & Dooley, 2017).

In the blood-borne route, drugs exit to blood and afterwards pass the BBB to rejoin the brain. With the previously described paradox about drug administration in the CSF (it primarily distributes to the blood and doesn't penetrate deeply into the brain) in mind, it can be established that drug administration in the CSF is pharmacologically comparable to a slow IV infusion and so consequences in the peripheral organs may be observed due to this rapid distribution into the bloodstream. However, if the drug has the ability to cross the BBB or if its distribution targets receptors expressed on the CSF surface of the brain, there is still a chance to observe pharmacological effects in the brain (Pardridge, 2016; Rizk *et al.*, 2017).

Another interesting route, and the main mechanism of drug distribution into the brain, is diffusion directly through the ependymal layer of CSF flow pathways. However, this method can only achieve limited concentrations due to the combined factors of rapid turnover of CSF in the brain and slow rate of drug penetration by this method which results in the need to administration large quantities in order to penetrate the brain. This administration has serious consequences such as toxicity associated with high drug concentrations (Pardridge, 2016, 2020; Rizk *et al.*, 2017).

Lastly, the convection pathway must be considered, in which the drug is able to penetrate the brain through the perivascular spaces. This route is based on the premise of a microcirculation that allows fluid to penetrate the brain through bulk flow within the

perivascular spaces of the brain parenchyma. However, this microcirculation can only take a very reduced volume, when compared to the macrocirculation of the CSF, which aroused doubts about its relevance. However, these questions have been answered with the discoveries made about the glymphatic system of the brain (Pardridge, 2016; Rizk *et al.*, 2017).

Recently, nucleic acid-based therapies such as Anti-sense oligonucleotides (ASOs) and Adeno Associated Virus (AAV) based vectors, enabled major successes in the treatment of neurological disorders in non-human models. However, the transposition of the approaches to humans presents itself as a massive challenge due to the anatomical differences in size and complexity between animals and humans (MS *et al.*, 2018; SJ, 2013; Taghian *et al.*, 2020). The IV injection became an option because of the discovery that AAV9 vectors actually have the ability to cross the BBB, nevertheless, it has a major downside the fact of requiring high vector doses which transduce peripheral organs, with potential risk of toxicity and adverse effects (FP, AC, & RJ, 2009; Taghian *et al.*, 2020). Hereupon, direct delivery of molecular-based therapies to the brain, either via injection directly in the cerebral parenchyma or through the CSF, arouses as alternative approaches to overcome such potential risks in the treatment of brain disorders. Furthermore, these techniques may allow for the drugs to bypass the BBB and reach the brain (C *et al.*, 2016, 2018; Taghian *et al.*, 2020). Additionally, the risk of the therapy inactivation by host neutralizing antibodies, common when using the IV administration, is diminished, as well as the risk of toxicity that is usually inherent to the administration of high doses (Taghian *et al.*, 2020). Recent studies have been made to investigate the efficiency of the administration of the AAV9 and AAV10 serotypes in dogs and nonhuman primates and the results have shown that it is possible to efficiently deliver these drugs to neuronal cells (Bey *et al.*, 2020; C *et al.*, 2018; Taghian *et al.*, 2020). Although these results have been encouraging, especially with the premise that these options bring us one step closer to a potential cure to these diseases, they were obtained via injection in the cisterna magna and though this method is commonly used in veterinary, when considering human administration it has risks associated due to the closeness to vital areas of the brain (Bey *et al.*, 2020). On the other hand, ICV is commonly done by neurosurgeons, and it is considered to be relatively safe to perform in humans. However, several evidences have shown that, although the drug is widely distributed in the brain tissue, its capacity to penetrate in the brain parenchyma is similar to a slow IV infusion, which was a disappointing result for this technique (Strazielle & Gherzi-Egea, 2016). Undoubtedly, the most studied, used and, safe route of administration involving the CSF is the intrathecal administration. The review of these three methods of drug delivery to the CSF will be made more extensively in the next section as well as the influence

that the method of drug administration into the CSF has in the drug distribution within the brain parenchyma.

4. Routes of administration into the CSF

The inflow of recent discoveries related to gene therapies has brought to attention new obstacles concerning the safety and efficacy of this kind of treatment. Other issues, related to the insufficient knowledge about the pathophysiology of brain diseases and the challenges presented by the access to the CNS, hinder the discoveries of new therapeutical options for brain disorders, which transforms the recent arouse of molecular and gene-based therapies as a game-changer in this field of action once they target the molecular cause of the disease and can be administered through the CSF. As previously highlighted in this paper, although systemic administration of drugs grants the obtention of a large distribution throughout the human body, and beyond that, it is the state-of-art, most common, safe, and used method of administration for low molecular weight drugs, it has limitations when it comes to molecular-based therapies for brain disorders (Taghian *et al.*, 2020).

Molecular-based therapies, especially the ones focused on this thesis (ASOs and AAV), are usually large molecules that have limited ability to cross the BBB. Administration of these therapies through an IV route could require large doses that may cause a hyperbolic immune response from the host, adverse effects and toxicity (Perez, Shutterly, Chan, Byrne, & Corti, 2020; Taghian *et al.*, 2020). With that in mind, the direct delivery of these drugs to the CNS is a promising alternative once it aims to moderate the host immune response due to the required low doses to achieve clinical and pharmacological efficacy. The most comprehensively studied routes of administration are the intrathecal administration (IT), the injection in the lateral ventricles (ICV), and the injection in the cisterna magna (ICM), whose advantages and disadvantages are bellow summarized in Table I (Perez *et al.*, 2020). For clinical use, the preferred routes of administration are IT and ICV, due to the high risks associated with the ICM (Fowler *et al.*, 2020c).

Table 1 - Summary of the Advantages and the Challenges associated with the most used routes of CSF delivery. Adapted from Perez et al., 2020.

Method	Advantages	Challenges	References
IT	Least invasive method; Commonly used in clinical practice; More extensively studied.	Limited biodistribution which involves extensive clinical development; A painful method so sedation is mostly required; Risk of toxicity in the spinal cord.	Fowler et al., 2020; Perez et al., 2020 Taghian et al., 2020 Piguet et al., 2021
ICV	Neurosurgery protocols already developed; Extensive CNS distribution.	Invasive method (requires surgical access); The needle passes the parenchyma which may cause damage or exacerbated immune response; Limited penetration in the brain parenchyma.	Fowler et al., 2020; Perez et al., 2020
ICM	Access a larger target volume and therefore brain biodistribution and brain parenchyma penetration.	Not routinely used in clinical practice; Chance of injuring the medulla and neck muscles; More studied in the veterinary field.	Fowler et al., 2020; Perez et al., 2020 Marta Ramos, 2019; Xavier et al., 2018

* IT, Intrathecal; ICV, Injection in the lateral ventricles; ICM, Injection in the cisterna magna.

Intrathecal lumbar injection (IT)

Intrathecal drug delivery is the administration of pharmaceutical therapies directly into the CSF that fills the thecal sac (Fowler et al., 2020). Lumbar intrathecal administration, as illustrated in Figure 5 – (B), emerged as an useful administration route because it can be easily accessed and, therefore, requires minimal invasiveness (Taghian et al., 2020). This route of administration is routinely used in clinical practice, has little to no complications associated which makes it a safe way to deliver therapies directly to the CSF (Perez et al., 2020). Additionally, this route requires minimal drug quantities to achieve high drug concentrations in the CNS which, therefore, diminishes drug-related toxicity and off-target effects. Furthermore, in order to enable continuous administration of drugs, a lumbar catheter can be placed in the lumbar cistern through a simple surgical procedure, an approach that is most commonly used in patients who suffer from chronic pain (Fowler et al., 2020; Perez et al., 2020; Taghian et al., 2020). However, the distribution of free administered drugs is yet to be optimized given that hydrophilic particles are quickly cleared through the CSF turnover while the delivery of hydrophobic drugs is limited to the area near the injection site (Fowler et al., 2020). In contrast, a colloidal system, in which biological particles are included, can be effectively delivered to surfaces of the brain and spinal cord (Fowler et al., 2020).

There are two different modalities for intrathecal lumbar administration: the first is the direct unique administration by a catheter or a lumbar tap and, although it is considered to be a non-surgical method, has to be performed in a medical environment and requires local anesthesia of the patient. The major hurdle of this first technique is the possibility of CSF leak when the needle is removed and during the 48h after the incision (Piguet *et al.*, 2021). The second modality appears from the need to circumvent this problem and is based on the connection of a subcutaneous reservoir to an intraspinal catheter and has to be done under general anesthesia. Using this method, the injected volume can be better controlled but, on the other hand, has associated increased risk of bacterial infection and possible drug distribution throughout the intraventricular and subarachnoid spaces need to be clarified (Piguet *et al.*, 2021).

Injection in the lateral ventricles (ICV)

The ICV route of administration, illustrated in Figure 5 – (D), consists of delivering the drug directly to the CSF through the lateral ventricles, which provides a broad distribution through CNS. Despite this technique being considered safe, effective, and well-dominated by neurosurgeons, it also brings about risks and complications such as brain infections or hemorrhages, CSF subcutaneous leaks and increases in intracranial pressure. However, it is also important to highlight that these difficulties are rare and when they occur are associated with chronic delivery of drugs and, therefore, not an issue in the case of molecular-based therapies once the primary goal is the administration of one single dose to be effective, making this route likely to be safe (Perez *et al.*, 2020). ICV can be done via surgical insertion of a ventricular catheter that is linked to an Ommaya reservoir, that allows for ventricular access (Fig. 4). However, for a single injection it is preferred to perform a direct injection once it is the safest and most efficient method (Fowler *et al.*, 2020; Piguet *et al.*, 2021). It is very important to ensure that the catheter has access to the ventricles and not the brain parenchyma since drug administration in this tissue may cause leukoencephalopathy (Fowler *et al.*, 2020).

In order to perform this method in adults, it is only required to administer light sedation as well as local anesthesia. However, when using this method in children, it is recommended to use general anesthesia (Piguet *et al.*, 2021).

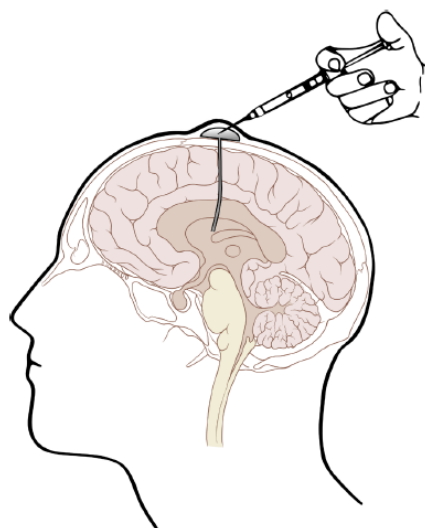


Figure 4 - Representation of the Ommaya reservoir. This reservoir is a subcutaneous dome, that is joined with a silicone rubber tube (similar to a catheter) that is implanted in the lateral ventricle of the brain. The Ommaya reservoir is also a compressible pump, which allows achieving the extensive mixing of the administered drugs as well as grants the withdraw of ventricular CSF samples. This figure is in the public domain by its author Patrick L. Lynch and was reproduced with permission by Arthur J. Atkinson, 2017.

Injection in the cisterna magna (ICM)

The ICM route of administration consists of delivering the drug to the CSF via the cisterna magna (CM), which is situated underneath the fourth ventricle, amongst the cerebellum and medulla, as schematized bellow in Figure 5 – (C). This route results in a more direct contact of the administered substance with the cerebellum, brainstem, and spinal cord when compared to the ICV and IT route. However, it is also associated with a greater possibility of medullar damage or other of the previously mentioned complications and, because of that, is not commonly used in the medical routine. In order to be safely inserted in clinical trials and consequently used in practice, further technical improvements is needed (Perez *et al.*, 2020). In most cases, it is also possible to execute the injection in the craniovertebral junction, and although it can be done with the patient awake, general anesthesia is suggested, particularly in children. Another important note is that this method has a very diminished risk of CSF leakage and, because of that, the use of a reservoir is not needed (Piguet *et al.*, 2021). A new ICM method is being developed for drug delivery in rodents that is based on the insertion of a small cannula in the CM, specifically to the subarachnoid space, and aims to provide direct and controlled access to the CSF with low invasiveness (Marta Ramos, 2019; Xavier *et al.*, 2018).

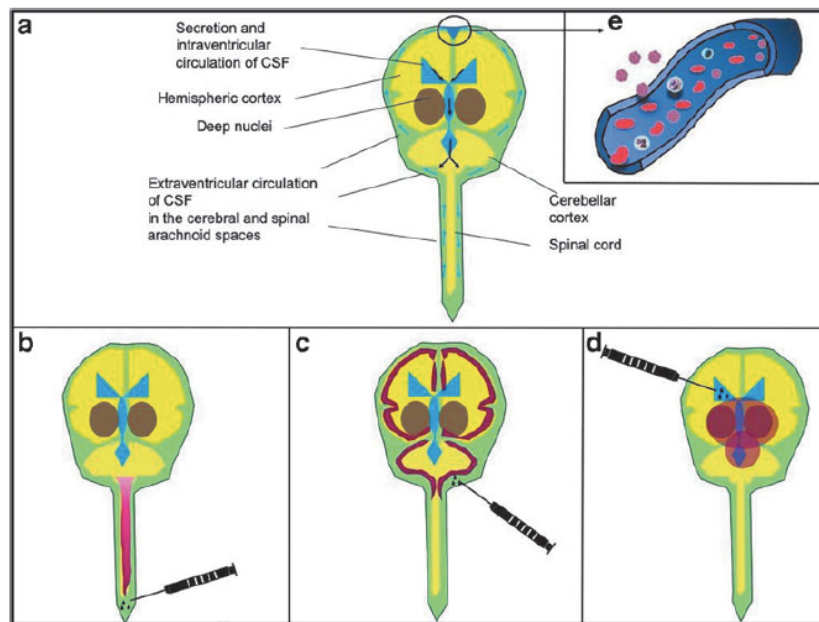


Figure 5 - (A) General flow of the CSF in the brain. Firstly it is secreted by the chroid plexus and then begins to circulate from the ventricles to the foramen of Magendie and Lushka and finally to the extraventricular subarachnoid spaces (black). Then the CSf goes around the brain and the spinal cord (blue). (B) Representation of the lumbar intrathecal injection. (C) Representation of the injection in the cisterna magna. (D) Representation of the injection in the lateral ventricles. (E) Representation of the vectors that will first reach the bloodstream and then join the cerebral circulation to the peripheral organs. Reproduced with permission from Piguet et al, 2021.

5. Drugs delivered through the CSF route

Delivering drugs through the CSF route, especially and most commonly by intrathecal administration, allows to circumvent numerous challenges that the oral and the IV route present, such as the first-pass metabolism and the crossing of the BBB, allowing the administration of lower doses that results in fewer adverse effects (Deer, Pope, Hanes, & li, 2018). To this date, there are only three Food and Drug Administration (FDA) approved drugs for intrathecal administration. These are morphine, baclofen, and ziconotide (Ver Donck et al., 2014) and the most common therapeutic indication for drugs administered through this route are pain management, which is the case of morphine and ziconotide, or spasticity, which is the case of baclofen (H. Liu, Tariq, Liu, Yan, & Kaye, 2017). Morphine is the drug that has the longest history of IT administration and because of that, along with its effectiveness, is considered the standard for IT route of administration (Deer et al., 2018). Despite all the benefits, due to the fact that morphine is an opioid receptor agonist, has associated dependence as the major side effect as well as others associated with opioid receptors such as tolerance, respiratory depression, and involuntary overdose (Deer et al., 2018; Shao et al., 2021). Although these adverse effects are diminished when the therapy is administered via IT injection in comparison with oral administration of opioids they still happen. For that reason, ziconotide appears to be a possible alternative once it does not interact with opioid receptors (Shao et al., 2021). Its mechanism of action involves reversibly binding to voltage-sensitive calcium channels, antagonizing the production of the nociceptive neurotransmitter that is

released in the spinal cord (Deer *et al.*, 2018). Although this alternative mechanism appears to be beneficial, one must consider that this drug is also associated with significant side effects, such as dizziness, nausea, and nystagmus (Shao *et al.*, 2021). With that in mind, ziconotide is considered to be a preferable option, except in cases of patients with psychosis or patients taking other CNS drug therapies, since it requires close monitor due to the risk of CNS side effects (Deer *et al.*, 2018; Shao *et al.*, 2021).

On the other hand, baclofen acts as an inhibitor of the GABA_B receptors and can be administered either orally or intrathecally, via a drug pump that needs to be placed in the patients' abdomen (Nardone *et al.*, 2020). Although intrathecal baclofen administration through this device (drug pump) is considered to be safe, it has brought about some side effects that are associated with overdoses such as dizziness, weariness, and respiratory depression and because of that its use is only recommended in cases of intolerance or inefficacy of the oral baclofen therapy (Nardone *et al.*, 2020; Štětkářová, Krámská, & Keller, 2021).

Other drugs that can be administered intrathecally are antibacterial and antifungal therapies for CNS infections, but they are only used in the cases that the systemic therapy failed or when it is not available/feasible (Nau, Blei, & Eiffert, 2020). These infections are commonly nosocomial, which means that they were contracted within the hospital environment and generally occur after a brain surgery, spinal anesthesia, or a lumbar puncture and are life-threatening illnesses (Ayhan, Hastanesi, Kalem, & Kayaaslan, 2021). The antibiotics and antifungals can either be administered via an intrathecal lumbar puncture or via the ICV injection. When performing the administration of the drug through the ICV route it is ensure a broad and more homogenous distribution throughout the CSF area making it the preferred route for the administration of antibiotics, in detriment of the intrathecal administration (Atkinson, 2017). An even more homogeneous distribution is obtained with the utilization of the previously mentioned Ommaya reservoir (Atkinson, 2017; Piguet *et al.*, 2021).

6. Delivery of anti-sense oligonucleotides to the brain

ASOs are single-strained polymers of nucleic acid that have the ability to control gene expression by an extensive diversity of ways, in which may be included RNAi, splicing modulation, and gene editing (Roberts, Langer, & Wood, 2020; Schoch & Miller, 2017; Crooke, Liang, Baker, & Crooke, 2021). The word “antisense” goes back to 1978 and its use intended to include oligonucleotides of any chemistry or structure in this class, as long as they were designed to bind to the RNA via Watson-Crick hybridization (Chernikov, Vlassov, & Chernolovskaya, 2019; Schoch & Miller, 2017; Zamecnik & Stephenson, 1978). ASOs are a

powerful tool for personalized medicine since they can specifically target gene sequences, allowing treatment of rare diseases while managing adverse effects (Roberts *et al.*, 2020). Additionally, ASOs are also a very versatile class of new therapeutic options due to, on the one hand, the possible local or systemic actions, depending on the chosen route of administration (Crooke *et al.*, 2021) and, on the other hand to the different mechanisms of action that can be induced. Once they are inside the targeted cells, ASOs have the ability to connect to the aimed RNA via Watson-Crick base pairing by which, depending on the desired action, have the ability to either destroy the referred RNA strain via RNase recruitment or to modify the referred RNA strain, modifying splicing, in order to promote inclusion or exclusion of a specific exon in this way correcting the disease mechanism (Schoch & Miller, 2017; Crooke, Liang, Baker, & Crooke, 2021).

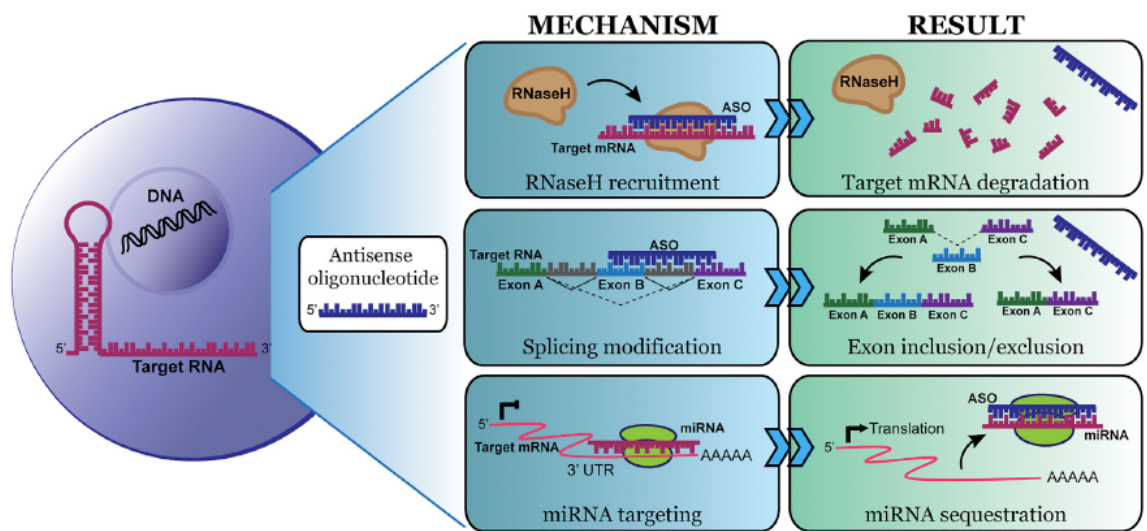


Figure 6 - Once the drug is administered it has the ability to bind to the RNA of interest via base complementarity. After the linkage is formed, the ASO executes its functions through different mechanisms of action, which englobe mRNA degradation, splicing modification and miRNA targeting. Image reproduced with permission from Schoch & Miller, 2017.

As illustrated in Figure 6, the previously referred possible mechanisms of action by which ASOs can act after entering the targeted cell are: degradation, modification, or inhibition. The first mechanism schematized, the RNase-mediated degradation, is especially useful in neurodegenerative disorders once the accumulation of a specific protein is usually the fundamental cause of those condition (Schoch & Miller, 2017; Silva *et al.*, 2020). Through this mechanism the targeted mRNA is destroyed in the nucleus via the ASO-targeted mRNA linkage that occurs by ASOs ability to mimic the DNA-RNA connection that happens in the DNA replication wherein RNase splits the RNA primer from recently synthesized DNA. In brief, this therapeutic approach allows for the ASOs to diminish the production of the protein that causes the neurological disease once the RNase, when activated, specifically cleaves the targeted RNA (Schoch & Miller, 2017).

Other possible mechanism of action by which ASOs can act is the RNA modification. Through this mechanism, instead of beginning to directly translate the targeted mRNA, ASOs modify the 5'-cap or the polyadenylation locations by establishment of linkages to these sites and then proceeding to the modification of the mRNA, which prevents its translation and, thereby, diminishes the targeted mRNA (Bennett & Swayze, 2010; Schoch & Miller, 2017). Additionally, using this method one can also modify alternative splicing configurations of mRNA by promoting ASOs linkage to exons or intron junctions that are involved in the caption of splicing factors. This is especially beneficial in diseases that are caused by a concrete splicing abnormality in order to reestablish a protein function or to eliminate altered excerpts of the DNA (Havens & Hastings, 2016; Schoch & Miller, 2017).

Finally, ASOs can bind to small RNA regulators, designated microRNAs, that regulate gene expression, in order to block their actions (Davis, Lollo, Freier, & Esau, 2006; Davis *et al.*, 2009; Schoch & Miller, 2017). This strategy has been considered to be especially relevant when dysregulation of these microRNA is present, which is the case in numerous diseases, such as cancer and neurodegenerative diseases, have inherent dysregulation of miRNAs (Janssen *et al.*, 2013; Schoch & Miller, 2017).

Although this class of drugs has been used by scientists as a research tool for several years, only recently emerged as a promising option to treat brain diseases because of the already mentioned capacity to selectively silence gene expression by degrading targeted RNA or, in contrast, optimize gene expression by RNA splicing (Bennett, Kordasiewicz, & Cleveland, 2021). The delivery of ASOs to the brain tissue has been challenging due to their large size and negative charge, which makes the passage through the BBB difficult and, consequently, the reaching of the CNS almost impossible when administered intravenously, even when administering large doses, much higher than what is feasible due to major side effects and toxicity. In light of those facts, emerged the necessity to directly inject ASOs in the CSF, in order to avoid all the above mentioned downfalls of IV administration (Roberts *et al.*, 2020).

At the present day, the ASOs that are most commonly used to treat brain diseases are the ones with 18-20 bases in length and 6-8 kDa and do not permeate the BBB, making IV administration impossible. The obvious alternative to this problem is the direct administration in the CSF, for example via intrathecal administration. In fact, as summarized in Table 3, there is one drug, Nusinersen (Spinraza) commercialized by Biogen, already approved for the treatment of brain diseases using this route of administration (IT injection) and several more are also in Phase III of clinical trials (Bennett *et al.*, 2021; Magen & Hornstein, 2014). Once administered, ASOs benefit from the intrinsic dynamic of the CSF and its endless movement

and uninterrupted exchange with the interstitial fluid. This constant circulation of fluids in the brain parenchyma presents itself as a crucial factor in the wide-ranging circulation and distribution of ASOs in the brain after administration in the CSF using intraventricular or intrathecal injections (Bennett *et al.*, 2021; Magen & Hornstein, 2014; Schoch & Miller, 2017). Although the conciliation of immunohistochemistry and live imaging experiments has allowed to gain understanding over the distribution of ASOs in the brain, it is still not clear whether this process happens by passive diffusion or convective forces. With that being said, it is already established that convective forces increase the delivery of intrathecally-administrated radiotracers and ASOs in the nervous system of non-human primates (Bennett *et al.*, 2021). In terms of CSF route of administration, until now the preferred one for delivering ASOs has been the Intrathecal administration (IT) once it is well tolerated and commonly used in clinical practice (Magen & Hornstein, 2014; Schoch & Miller, 2017). However, intraventricular injection of ASOs is still a possible option for those who suffer from specific conditions that make the intrathecal administration difficult, such as advanced scoliosis (Schoch & Miller, 2017). Other options under investigation involve the injection in the cisterna magna.

Table 2 - Approved RNA targeted drugs. Adapted with permission from Crooke et al., 2021.

Approved RNA targeted drugs						
Drugs	Indication	Route of Administration	Mechanism	Chemistry	Year of approval	
Fomivirsen	Cytomegalovirus retinitis	Intravitreal injection (Perry & Balfour, 2012)	RNase HI	PS, DNA	1998	
Mipomersen	Familial hypercholesterolemia	Subcutaneous injection (Hair, Cameron, & McKeage, 2013)		PS, MOE	2013	
Nusinersen	Spinal muscular atrophy	IT (Cordts et al., 2020)	Splicing (intron7)	PS, MOE	2016	
Eteplirsen	Duchenne muscular dystrophy	IV (Lim, Maruyama, & Yokota, 2017)	Splicing (exon 51)	PMO	2016	
Inotersen	Hereditary transthyretin-mediated amyloidosis	Subcutaneous injection (Keam, 2018)	RNase HI	PS, MOE	2018	
Volanesorsen	Familial chylomicronemia syndrome	IV and Subcutaneous injection (Watts et al., 2020)	RNase HI	PS, MOE	2019	
Patisiran	Hereditary transthyretin-mediated amyloidosis	IV (Hoy, 2018)	Ago2	PO-siRNA	2018	
Golodirsen	Duchenne muscular dystrophy	IV (Hu & Li, 2020)	Splicing (exon 53)	PMO	2019	
Givosiran	Acute hepatic porphyria	Subcutaneous injection (Li et al., 2021)	Ago2	Ome/F – siRNA, GalNAc	2019	
Viltolarsen	Duchenne muscular dystrophy	IV (Dhillon, 2020)	Splicing (exon 53)	PMO	2020	

7. Delivery of adeno-associated viral vectors to the brain

Gene therapy can be used for the treatment of several brain diseases and has been increasingly gaining interest once it can be personalized to specific mechanisms of action of the disease by modulating gene expression. For this purpose adeno-associated viruses emerged as one of the vectors of choice for the CNS delivery of gene therapies (Piguet *et al.*, 2021). Adeno-associated Viruses (AAV) are non-enveloped small virus, with a single-stranded DNA genome, belonging to the *Parvoviridae* family. The wild-type virus has not been associated with any disease.

Recently, the overwhelming influx of new discoveries involving gene therapies has brought to attention new hurdles concerning the efficacy and safety of these treatments. At the same time, CNS disorders are well known for presenting numerous obstacles to the discovery of new therapeutical options due to the incomplete knowledge of the disease pathophysiology and limited access to the brain tissue (Perez *et al.*, 2020). Gene therapy, which is revolutionizing the treatment of disorders that affect the CNS by offering an effective therapy with only one administration, has three important requisites: the necessity of the anomaly to be clearly identified at a molecular level, the clear recognition of the therapeutic gene, and the vector and route of administration of this correcting gene in order for it to reach the targeted cells (Daya & Berns, 2008; Hocquemiller, Giersch, Audrain, Parker, & Cartier, 2016). The variety of the serotypes of adeno-associated viral vectors available (AAV-1 to AAV-12), as well as the lack of pathogenicity associated with the persistence of this virus, have enhanced its potential as a carrier for gene therapies. Nevertheless, despite the characteristics previously addressed, there are numerous considerations that have to be made about any viral vector, such as its capacity to enter the targeted cell, carry the genetic material to the cell nucleus, as well as the overall lack of toxicity. It is important to highlight that AAV vectors have been well accomplished in checking all these “boxes” (Daya & Berns, 2008). Additionally, recent studies have shown that AAV serotype 9 (AAV-9) has the ability to transverse the BBB upon intravenous injection and, because of that, this specific serotype has been under investigation for the treatment of neurological diseases (Bailey, Rozenberg, & Gray, 2020b; Murlidharan, Samulski, & Asokan, 2014). However, even though intravenous administration of this serotype may be achievable, it requires larger doses when compared to the ones required for administration directly in the CSF, and the AAV contact with neutralizing antibodies before reaching the CNS cannot be avoided, which is more likely to decrease the efficacy of these therapeutics. Therefore alternative routes of administration are under investigation (Bailey *et al.*, 2020; S. J. Gray *et al.*, 2011) .

As previously discussed, these viruses represent an optimal vector to deliver gene-based therapies because of their capacity to infect non-dividing cells, considerable transduction effectiveness as well as the ability to achieve a long lasting therapeutic response after administering a single dose with a very low immune reaction from the host (Bailey *et al.*, 2020b; Lentz, Gray, & Samulski, 2012). However, as the vector used in these therapies is a virus, there is always a concern with which serotypes have the capacity to maintain the efficacy in the delivery and expression while reducing to the minimum possible levels the pathogenicity inherent to any external organism that enters the human body. This concern is grounded in early work results that showed that AAV-based therapies may provoke an exaggerated immune response in the host, which can result in low transgene expression and persistence. Additionally, despite the well-established knowledge of the general immune response, the immunogenicity of the AAV-based therapies that are targeted to the brain is still under investigation (Daya & Berns, 2008; Perez *et al.*, 2020). One possible approach to diminish this immune response is the direct administration of the AAV-based therapies in the CNS. This requires lower doses to achieve optimal transgene expression (Perez *et al.*, 2020). The first strategy that was used to deliver AAV to the CNS relied on intraparenchymal injections, which are immunologically safe and very effective in diseases that only affect restricted areas of the brain. But because of its limited distribution and invasiveness, are less adequate for disorders where the disease spreads through different brain regions (Daya & Berns, 2008; Hocquemiller *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2020; Pietersz *et al.*, 2020). Other strategies involve direct delivery of the AAVs to the CSF are primarily based on the routes of the administration previously addressed in this paper, the ICV, ICM, or IT route. However, these routes promote increased contact with the blood flow and, consequently, a more intense metabolization by the peripheral organs, such as the liver. Because of that, the referred routes require larger doses when compared to the ones used for intraparenchymal injection (Daya & Berns, 2008; Hocquemiller *et al.*, 2016; Pietersz *et al.*, 2020). Several studies have shown that the distribution of the AAV throughout the brain is directly dependent on the route of administration used and therefore, according to the disease for which the therapy is intended to treat, the “pros and cons” of each route of administration should be considered. For instance, on the one hand, the IT route of administration via lumbar puncture is routinely used in clinical practice and for that reason is considered to be a relatively non-invasive and safe procedure that accomplishes effective gene transfer to the motor and sensory neurons of the dorsal root ganglia, spinal cord and CNS (Daya & Berns, 2008; Hocquemiller *et al.*, 2016; Pietersz *et al.*, 2020; Bailey *et al.*, 2020; Karumuthil-Meethil *et al.*, 2016). The ICV route is appropriate to a large distribution throughout the CNS but it is associated with less drug

infiltration into deeper brain tissue (Daya & Berns, 2008; Hocquemiller *et al.*, 2016; Pietersz *et al.*, 2020; Karumuthil-Melethil *et al.*, 2016). On the other hand, even though the ICM route is routinely used in veterinary, its use in medical practice is still under investigation due to the risks of this route of administration (Bailey *et al.*, 2020b). Nevertheless, several studies performed in mice have shown that the vector distribution is directly dependent on the volume of the CSF that is reached in the administration. Because of that, ICM appears to achieve more promising results in terms of treatment efficacy for gene transfer in the brain, than the other routes (Bailey *et al.*, 2020b; Christian Hinderer *et al.*, 2014). Conversely, when referring to the drug capacity to infiltrate deeper brain regions, results appear to be similar for both ICM and IT administrations (Bailey *et al.*, 2020b).

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) have shown extraordinary efficacy and safety in non-human models and have turned into the most used vector for gene therapies for the treatment of CNS disorders (Daya & Berns, 2008). Further studies are needed to establish the best route of delivery for this vector.

8. Conclusions

The discovery of the CSF microcirculation, commonly labelled as the CSF glymphatic system, has broadened the strategies of drug delivery to the brain, especially the ones focused in reaching the deeper brain tissue (Kouzehgarani *et al.*, 2021). Additionally, this discovery enhanced the investigations of therapies based on ASOs, siRNAs or AAVs to carry nucleic acids and treat brain diseases. These gene and molecular-based therapies have been revolutionizing the treatment of such disorders, in the case of AAVs offering effective therapeutic options, that require only one administration, in this way allowing not only to treat the referred condition, but to do it with few side effects, and less administrations, when compared to the conventional therapies. Moreover, the possibility to directly administer drugs into the CSF mitigates some hurdles previously associated with these therapies: large systems that do not have the ability to cross the BBB can now circumvent this barrier and, at the same time, avoid the first-pass metabolism. This allows the administration of much lower doses, when compared to the ones needed when the IV route is considered, which diminishes toxicity and adverse effects.

In this work, the three main routes of CSF administration were reviewed: the IT, ICM and ICM injections. The one that is already extensively implemented in the clinical routine is the IT route. Through this method, one can easily access the CSF with minimal invasiveness and, because it is already routinely used in clinical practice to administer conventional drugs, strategies to avoid complications are already in place. Furthermore, it requires minimal drug

volume to obtain relevant drug concentration in the CNS, diminishing side effects and toxicity and has also the possibility to preform continuous drug inflow via the insertion of a lumbar catheter.

Another promising route is the ICV, which although considered safe and effective, has more concerns associated than the IT injection, due to the more probable risk of brain infection, hemorrhage, CSF leakage or altered brain pressure, even though these complications are considered to be rare. Also, contrarily to what it is observed in the IT route, on which deeper brain structures can be reached, through this route a broader distribution of the drug throughout the brain areas is observed.

However, the route that appears to be the most promising one in terms of efficacy is the ICM route of administration. This path aims to achieve an even more direct contact of the drug with the brainstem and spinal cord. Even though it is associated with a higher risk of the previous mentioned complications and also medullar damage due to its closeness to vital areas of the brain, new and safer approaches have been studied in order to make this administration possible for clinical use, as resumed in Table 3 (Supporting Information). In fact, a new technique that relies on the use of a intravascular microcatheter that cruises from the lumbar area to the cisterna magna has already achieved great results in two human patients (Taghian *et al.*, 2020). Using this method, no adverse results were found during infusion or after the treatment, which makes this technique a safe, reliable and minimally invasive alternative to direct injection into the CM, allowing to achieve extensive distribution of administered drugs within the CNS (Taghian *et al.*, 2020).

Finally, it is important to highlight that though the recent influx of information regarding the CSF outflow opened an opportunity for a possible CSF administration of these promising therapies that are revolutionizing the current medicine, more consistent studies and work regarding this subject have yet to be done in order to diminish the mentioned downfalls and concerns associated with these therapies. Although there are already approved drugs for brain diseases and this route of administration, a more solidified work, based on clinical evidence, would help to dissipate the still existing doubts.

9. References

- Agarwal, N., & Carare, R. O. (2021, January 13). Cerebral Vessels: An Overview of Anatomy, Physiology, and Role in the Drainage of Fluids and Solutes. *Frontiers in Neurology*, Vol. 11, p. 611485. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.611485>
- Atkinson, A. J. (2017). Intracerebroventricular drug administration. *Translational and Clinical Pharmacology*, 25(3), 117–124. <https://doi.org/10.12793/tcp.2017.25.3.117>
- Ayers, J., Fromholt, S., Sinyavskaya, O., Siemienski, Z., Rosario, A., Li, A., ... Levites, Y. (2015). Widespread and efficient transduction of spinal cord and brain following neonatal AAV injection and potential disease modifying effect in ALS mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(1), 53–62. <https://doi.org/10.1038/MT.2014.180>
- Ayhan, M., Hastanesi, A. S., Kalem, A. K., & Kayaaslan, B. (2021). Intrathecal and intraventricular administration of antibiotics in gram-negative nosocomial meningitis in a research hospital in Turkey Chronic hepatitis C View project Comparison of Antibiotic Regimens in Intra-abdominal Infections View project. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.29844-20.2>
- Bailey, R. M., Rozenberg, A., & Gray, S. J. (2020a). Comparison of high-dose intracisterna magna and lumbar puncture intrathecal delivery of AAV9 in mice to treat neuropathies. *Brain Research*, 1739. <https://doi.org/10.1016/j.BRAINRES.2020.146832>
- Bailey, R. M., Rozenberg, A., & Gray, S. J. (2020b, July 15). Comparison of high-dose intracisterna magna and lumbar puncture intrathecal delivery of AAV9 in mice to treat neuropathies. *Brain Research*, Vol. 1739, p. 146832. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146832>
- Bennett, C. F., Kordasiewicz, H. B., & Cleveland, D. W. (2021). Antisense Drugs Make Sense for Neurological Diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61(1), 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023738>
- Bennett, C. F., & Swayze, E. E. (2010, February 10). RNA targeting therapeutics: Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 50, pp. 259–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654>
- Bey, K., Deniaud, J., Dubreil, L., Joussemet, B., Cristini, J., Ciron, C., ... Colle, M. A. (2020). Intra-CSF AAV9 and AAVrh10 Administration in Nonhuman Primates: Promising Routes and Vectors for Which Neurological Diseases? *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 17(June), 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.04.001>

- Bockstael, O., Tenenbaum, L., Dalkara, D., Melas, C., De Witte, O., Levivier, M., & Chtarto, A. (2014). Intracisternal delivery of NFκB-inducible scAAV2/9 reveals locoregional neuroinflammation induced by systemic kainic acid treatment. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2014.00092>
- Bradbury, A., Bagel, J., Nguyen, D., Lykken, E., Pesayco Salvador, J., Jiang, X., ... CH, V. (2020). Krabbe disease successfully treated via monotherapy of intrathecal gene therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(9), 4906–4920. <https://doi.org/10.1172/JCI133953>
- Brady, M., Rahman, A., Combs, A., Venkatraman, C., Kasper, R. T., McQuaid, C., ... Deane, R. (2020). Cerebrospinal fluid drainage kinetics across the cribriform plate are reduced with aging. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00233-0>
- Bucher, T., Colle, M., Wakeling, E., Dubreil, L., Fyfe, J., Briot-Nivard, D., ... Joussemet, B. (2013). scAAV9 intracisternal delivery results in efficient gene transfer to the central nervous system of a feline model of motor neuron disease. *Human Gene Therapy*, 24(7), 670–682. <https://doi.org/10.1089/HUM.2012.218>
- C, H., N, K., JP, L., P, B., H, Y., M, N., ... JM, W. (2016). Delivery of an Adeno-Associated Virus Vector into Cerebrospinal Fluid Attenuates Central Nervous System Disease in Mucopolysaccharidosis Type II Mice. *Human Gene Therapy*, 27(11), 906–915. <https://doi.org/10.1089/HUM.2016.101>
- C, H., P, B., N, K., CH, V., JP, L., E, B., ... JM, W. (2018). Evaluation of Intrathecal Routes of Administration for Adeno-Associated Viral Vectors in Large Animals. *Human Gene Therapy*, 29(1), 15–24. <https://doi.org/10.1089/HUM.2017.026>
- Chen, W., Hu, Y., & Ju, D. (2020). Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(8), 1347–1359. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.015>
- Chernikov, I. V., Vlassov, V. V., & Chernolovskaya, E. L. (2019). Current development of siRNA bioconjugates: From research to the clinic. *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00444>
- Cordts, I., Lingor, P., Friedrich, B., Pernpeintner, V., Zimmer, C., Deschauer, M., & Maegerlein, C. (2020). Intrathecal nusinersen administration in adult spinal muscular atrophy patients with complex spinal anatomy: <https://doi.org/10.1177/1756286419887616>
- Crooke, S. T., Liang, X. H., Baker, B. F., & Crooke, R. M. (2021, January 1). Antisense

- technology: A review. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 296, p. 100416. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100416>
- Davis, S., Lollo, B., Freier, S., & Esau, C. (2006). Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 34(8), 2294–2304. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl183>
- Davis, S., Propp, S., Freier, S. M., Jones, L. E., Serra, M. J., Kinberger, G., ... Esau, C. (2009). Potent inhibition of microRNA in vivo without degradation. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 70–77. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn904>
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 583–593. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>
- Deer, T. R., Pope, J. E., Hanes, M. C., & Li, G. C. M. (2018). *Intrathecal Therapy for Chronic Pain: A Review of Morphine and Ziconotide as Firstline Options*. 0(August), 1–15. <https://doi.org/10.1093/pm/pny132>
- Dhillon, S. (2020). Viltolarsen: First Approval. *Drugs* 2020 80:10, 80(10), 1027–1031. <https://doi.org/10.1007/S40265-020-01339-3>
- Diptaman, C., DJ, M., JL, M., FP, M., D, B., A, M., & JH, K. (2021). Enhanced CNS transduction from AAV.PHP.eB infusion into the cisterna magna of older adult rats compared to AAV9. *Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/S41434-021-00244-Y>
- Fame, R. M., & Lehtinen, M. K. (2020). Emergence and Developmental Roles of the Cerebrospinal Fluid System. *Developmental Cell*, 52(3), 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.027>
- Fowler, M. J., Cotter, J. D., Knight, B. E., Sevick-Muraca, E. M., Sandberg, D. I., & Sirianni, R. W. (2020). Intrathecal drug delivery in the era of nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 165–166, 77–95. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.02.006>
- FP, M., AC, R., & RJ, M. (2009). AAV9: a potential blood-brain barrier buster. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(3), 403–405. <https://doi.org/10.1038/MT.2009.15>
- Fu, H., Kang, L., Jennings, J., Moy, S., Perez, A., Dirosario, J., ... Muenzer, J. (2007). Significantly increased lifespan and improved behavioral performances by rAAV gene delivery in adult mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Gene Therapy*, 14(14), 1065–1077. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302961>
- Gray, S. J., Foti, S. B., Schwartz, J. W., Bachaboina, L., Taylor-Blake, B., Coleman, J., ... Samulski,

- R. J. (2011). Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Human Gene Therapy*, 22(9), 1143–1153. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.245>
- Gray, S., Nagabhushan Kalburgi, S., McCown, T., & Jude Samulski, R. (2013). Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Therapy*, 20(4), 450–459. <https://doi.org/10.1038/GT.2012.101>
- Gurda, B., De Lataillade, B., Bell, P., Zhu, Y., Yu, H., Wang, P., ... Steet, R. (2016). Evaluation of AAV-mediated Gene Therapy for Central Nervous System Disease in Canine Mucopolysaccharidosis VII | Elsevier Enhanced Reader. Retrieved August 27, 2021, from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1525001616303276?token=57615B9A234527AB688C4D8ABB81336020837630409A743A60F6CB00ACE6972321D814C0F5C7598A4B623CDE5F0E9BB3&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210827155649>
- H, M., J, T., T, D., W, S., W, P., AM, S., ... DH, K. (2018). Flow of cerebrospinal fluid is driven by arterial pulsations and is reduced in hypertension. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-07318-3>
- Hair, P., Cameron, F., & McKeage, K. (2013). Mipomersen Sodium: First Global Approval. *Drugs* 2013 73:5, 73(5), 487–493. <https://doi.org/10.1007/S40265-013-0042-2>
- Havens, M. A., & Hastings, M. L. (2016, August 19). Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Research*, Vol. 44, pp. 6549–6563. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw533>
- Hinderer, C, Bell, P., Katz, N., Vite, C., Louboutin, J., Bote, E., ... JM, W. (2018). Evaluation of Intrathecal Routes of Administration for Adeno-Associated Viral Vectors in Large Animals. *Human Gene Therapy*, 29(1), 15–24. <https://doi.org/10.1089/HUM.2017.026>
- Hinderer, Christian, Bell, P., Vite, C. H., Louboutin, J. P., Grant, R., Bote, E., ... Wilson, J. M. (2014). Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 1, 14051. <https://doi.org/10.1038/mtm.2014.51>
- Hinderer, Christian, Katz, N., Dyer, C., Goode, T., Johansson, J., Bell, P., ... Wilson, J. M. (2020). Translational Feasibility of Lumbar Puncture for Intrathecal AAV Administration. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 17, 969–974. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2020.04.012>

- Hocquemiller, M., Giersch, L., Audrain, M., Parker, S., & Cartier, N. (2016). Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Human Gene Therapy*, 27(7), 478–496. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.087>
- Hordeaux, J., Buza, E., Jeffrey, B., Song, C., Jahan, T., Yuan, Y., ... Wilson, J. (2020). MicroRNA-mediated inhibition of transgene expression reduces dorsal root ganglion toxicity by AAV vectors in primates. *Science Translational Medicine*, 12(569). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABA9188>
- Hordeaux, J., Hinderer, C., Goode, T., Katz, N., Buza, E., Bell, P., ... Wilson, J. (2018). Toxicology Study of Intra-Cisterna Magna Adeno-Associated Virus 9 Expressing Human Alpha-L-Iduronidase in Rhesus Macaques. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 10, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.OMTM.2018.06.003>
- Hoy, S. M. (2018). Patisiran: First Global Approval. *Drugs* 2018 78:15, 78(15), 1625–1631. <https://doi.org/10.1007/S40265-018-0983-6>
- Hu, C., & Li, X. (2020). Gene therapeutic strategies and relevant clinical trials in neuromuscular disorder in China. *Gene Therapy* 2020 27:7, 27(7), 321–328. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0158-4>
- Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., ... Hodges, M. R. (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *New England Journal of Medicine*, 368(18), 1685–1694. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
- JJ, I., M, W., DM, Z., A, V., BA, P., Y, L., ... M, N. (2013). Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(46), 18190–18199. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1592-13.2013>
- Karumuthil-Melethil, S., Marshall, M. S., Heindel, C., Jakubauskas, B., Bongarzone, E. R., & Gray, S. J. (2016). Intrathecal administration of AAV/GALC vectors in 10–11-day-old twitcher mice improves survival and is enhanced by bone marrow transplant. *Journal of Neuroscience Research*, 94(11), 1138–1151. <https://doi.org/10.1002/jnr.23882>
- Keam, S. J. (2018). Inotersen: First Global Approval. *Drugs* 2018 78:13, 78(13), 1371–1376. <https://doi.org/10.1007/S40265-018-0968-5>
- Kouzehgarani, G. N., Feldsien, T., Engelhard, H. H., Mirakhur, K. K., Phipps, C., Nimmrich, V., ... Lefebvre, D. R. (2021). Harnessing cerebrospinal fluid circulation for drug delivery to brain tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.002>

- Lentz, T. B., Gray, S. J., & Samulski, R. J. (2012, November 1). Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiology of Disease*, Vol. 48, pp. 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.014>
- Li, J., Liu, J., Zhang, X., Clausen, V., Tran, C., Arciprete, M., ... Chong, S. (2021). Nonclinical Pharmacokinetics and ADME of Givosiran, the First Approved GalNAc-conjugated RNAi Therapeutic. *Drug Metabolism and Disposition*, DMD-AR-2021-000381. <https://doi.org/10.1124/DMD.121.000381>
- Lim, K. R. Q., Maruyama, R., & Yokota, T. (2017). Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 533. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97635>
- Liu, H., Tariq, R., Liu, G. L., Yan, H., & Kaye, A. D. (2017). Inadvertent intrathecal injections and best practice management. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 61(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/aas.12821>
- Magen, I., & Hornstein, E. (2014). Oligonucleotide-based therapy for neurodegenerative diseases. *Brain Research*, 1584, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.04.005>
- Markmann, S., J, J. C.-R., JB, R., BP, D., SM, K., RG, C., & D, S. (2018). Attenuation of the Niemann-Pick type C2 disease phenotype by intracisternal administration of an AAVrh.10 vector expressing Npc2. *Experimental Neurology*, 306, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.EXPNEUROL.2018.04.001>
- Marta Ramos, et al. (2019). *Cisterna Magna Injection in Rats to Study Glymphatic Function. Chapter 7*, 105–119.
- Matsuzaki, Y., Konno, A., Mukai, R., Honda, F., Hirato, M., Yoshimoto, Y., & Hirai, H. (2017). Transduction Profile of the Marmoset Central Nervous System Using Adeno-Associated Virus Serotype 9 Vectors. *Molecular Neurobiology*, 54(3), 1745–1758. <https://doi.org/10.1007/S12035-016-9777-6>
- McKnight, C. D., Rouleau, R. M., Donahue, M. J., & Claassen, D. O. (2020). The Regulation of Cerebral Spinal Fluid Flow and Its Relevance to the Glymphatic System. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 20(12). <https://doi.org/10.1007/s11910-020-01077-9>
- Mestre, H., Mori, Y., & Nedergaard, M. (2020). The Brain's Glymphatic System: Current Controversies. *Trends in Neurosciences*, 43(7), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.04.003>
- MS, M., Y, I., B, J., M, S., V, E., JN, M., ... ER, B. (2018). Long-Term Improvement of Neurological

- Signs and Metabolic Dysfunction in a Mouse Model of Krabbe's Disease after Global Gene Therapy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(3), 874–889. <https://doi.org/10.1016/j.YMTHE.2018.01.009>
- Murlidharan, G., Samulski, R. J., & Asokan, A. (2014, September 19). Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, Vol. 7, p. 76. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00076>
- Nakamura, S., Osaka, H., Muramatsu, S., Takino, N., Ito, M., Jimbo, E., ... Yamagata, T. (2021). Intra-cisterna magna delivery of an AAV vector with the GLUT1 promoter in a pig recapitulates the physiological expression of SLC2A1. *Gene Therapy*, 28(6), 329–338. <https://doi.org/10.1038/S41434-020-00203-Z>
- Nardone, R., Sebastianelli, L., Brigo, F., Golaszewski, S., Trinka, E., Pucks-Faes, E., ... Versace, V. (2020). Effects of intrathecal baclofen therapy in subjects with disorders of consciousness: a reappraisal. *Journal of Neural Transmission*, 127(9), 1209–1215. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02233-8>
- Natale, G., Limanaqi, F., Busceti, C. L., Mastroiacovo, F., Nicoletti, F., Puglisi-Allegra, S., & Fornai, F. (2021). Glymphatic System as a Gateway to Connect Neurodegeneration From Periphery to CNS. *Frontiers in Neuroscience*, 0, 92. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.639140>
- Nau, R., Blei, C., & Eiffert, H. (2020). *Intrathecal Antibacterial and Antifungal Therapies*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00190-19>
- Ng Kee Kwong, K. C., Mehta, A. R., Nedergaard, M., & Chandran, S. (2020). Defining novel functions for cerebrospinal fluid in ALS pathophysiology. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01018-0>
- Ohno, K., Samaranch, L., Hadaczek, P., Bringas, J., Allen, P. C., Sudhakar, V., ... Bankiewicz, K. S. (2018). Kinetics and MR-Based Monitoring of AAV9 Vector Delivery into Cerebrospinal Fluid of Nonhuman Primates. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 13, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.OMTM.2018.12.001>
- Pardridge, W. M. (2016). CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(7), 963–975. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1171315>
- Pardridge, W. M. (2020). Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(January), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00373>

- Perez, B. A., Shutterly, A., Chan, Y. K., Byrne, B. J., & Corti, M. (2020). Management of neuroinflammatory responses to AAV-mediated gene therapies for neurodegenerative diseases. *Brain Sciences*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/brainsci10020119>
- Perry, C. M., & Balfour, J. A. B. (2012). Fomivirsen. *Drugs* *1999* *57*:3, *57*(3), 375–380. <https://doi.org/10.2165/00003495-199957030-00010>
- Pietersz, K. L., Martier, R. M., Baatje, M. S., Liefhebber, J. M., Brouwers, C. C., Pouw, S. M., ... Blits, B. (2020). Transduction patterns in the CNS following various routes of AAV-5-mediated gene delivery. *Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0178-0>
- Piguet, F., de Saint Denis, T., Audouard, E., Beccaria, K., André, A., Wurtz, G., ... Cartier, N. (2021). The Challenge of Gene Therapy for Neurological Diseases: Strategies and Tools to Achieve Efficient Delivery to the Central Nervous System. *Human Gene Therapy*, *00*(00). <https://doi.org/10.1089/hum.2020.105>
- Proulx, S. T. (2021). Cerebrospinal fluid outflow : a review of the historical and contemporary evidence for arachnoid villi , perineural routes , and dural lymphatics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03706-5>
- Q, M., M, R., Y, D., A, M., C, R., A, B., ... ST, P. (2019). Rapid lymphatic efflux limits cerebrospinal fluid flow to the brain. *Acta Neuropathologica*, *137*(1), 151–165. <https://doi.org/10.1007/S00401-018-1916-X>
- Rizk, M. L., Zou, L., Savic, R. M., & Dooley, K. E. (2017). Importance of Drug Pharmacokinetics at the Site of Action. *Clinical and Translational Science*, *10*(3), 133–142. <https://doi.org/10.1111/cts.12448>
- Roberts, T. C., Langer, R., & Wood, M. J. A. (2020). Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *19*(10), 673–694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
- Samaranch, L., Salegio, E. A., San Sebastian, W., Kells, A. P., Bringas, J. R., Forsayeth, J., & Bankiewicz, K. S. (2013). Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Human Gene Therapy*, *24*(5), 526–532. <https://doi.org/10.1089/HUM.2013.005>
- Samaranch, L., Salegio, E. A., San Sebastian, W., Kells, A. P., Foust, K. D., Bringas, J. R., ... Bankiewicz, K. S. (2012). Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Human Gene Therapy*, *23*(4), 382–389. <https://doi.org/10.1089/HUM.2011.200>

- Schoch, K. M., & Miller, T. M. (2017). Antisense Oligonucleotides: Translation from Mouse Models to Human Neurodegenerative Diseases. *Neuron*, 94(6), 1056–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.010>
- Shao, M. M., Khazen, O., Hellman, A., Czerwinski, M., Dentinger, R., DiMarzio, M., ... Pilitsis, J. G. (2021). Effect of First-Line Ziconotide Intrathecal Drug Therapy for Neuropathic Pain on Disability, Emotional Well-Being, and Pain Catastrophizing. *World Neurosurgery*, 145, e340–e347. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.10.079>
- Silva, A. C., Lobo, D. D., Martins, I. M., Lopes, S. M., Henriques, C., Duarte, S. P., ... De Almeida, L. P. (2020, February 1). Antisense oligonucleotide therapeutics in neurodegenerative diseases: The case of polyglutamine disorders. *Brain*, Vol. 143, pp. 407–429. <https://doi.org/10.1093/brain/awz328>
- Sinnett, S., Hector, R., Gadalla, K., Heindel, C., Chen, D., Zaric, V., ... Gray, S. (2017). Improved MECP2 Gene Therapy Extends the Survival of MeCP2-Null Mice without Apparent Toxicity after Intracisternal Delivery. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 5, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.OMTM.2017.04.006>
- SJ, G. (2013). Gene therapy and neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*, 68, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.NEUROPHARM.2012.06.024>
- Sokołowski, W., Barszcz, K., Kupczyńska, M., Czubaj, N., Skibniewski, M., & Purzyc, H. (2018). Lymphatic drainage of cerebrospinal fluid in mammals – are arachnoid granulations the main route of cerebrospinal fluid outflow? *Biologia (Poland)*, 73(6), 563–568. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0074-x>
- Sonig, A., Jumah, F., Raju, B., Patel, N. V., Gupta, G., & Nanda, A. (2020). The Historical Evolution of Intracranial Pressure Monitoring. *World Neurosurgery*, 138, 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.03.028>
- Štětkářová, I., Krámská, L., & Keller, J. (2021). Improvement of Memory Functions in Chronic Spinal Cord Injury After Long-Term Intrathecal Baclofen Delivery for Spasticity Relief. *Neuromodulation*, 2020. <https://doi.org/10.1111/ner.13340>
- Strazielle, N., & Ghersi-Egea, J.-F. (2016). Potential Pathways for CNS Drug Delivery Across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 22(35), 5463–5476. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160726112115>
- Taghian, T., Marosfoi, M. G., Puri, A. S., Cataltepe, O. I., King, R. M., Diffie, E. B., ... Gray-Edwards, H. L. (2020). A Safe and Reliable Technique for CNS Delivery of AAV Vectors

- in the Cisterna Magna. *Molecular Therapy*, 28(2), 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.11.012>
- Ver Donck, A., Vranken, J. H., Puylaert, M., Hayek, S., Mekhail, N., & Van Zundert, J. (2014). Intrathecal Drug Administration in Chronic Pain Syndromes. *Pain Practice*, 14(5), 461–476. <https://doi.org/10.1111/papr.12111>
- Watts, L. M., Karwatowska-Prokopczuk, E., Hurh, E., Alexander, V. J., Balogh, K., O’Dea, L., ... Tsimikas, S. (2020). Treatment with Volanesorsen, a 2’-O-Methoxyethyl-Modified Antisense Oligonucleotide Targeting APOC3 mRNA, Does Not Affect the QTc Interval in Healthy Volunteers. *Https://Home.Liebertpub.Com/Nat*, 30(4), 198–206. <https://doi.org/10.1089/NAT.2019.0837>
- Woollam, D. H. M. (1957). THE HISTORICAL SIGNIFICANCE OF THE CEREBROSPINAL FLUID. *Medical History*, 1(2), 91–114. <https://doi.org/10.1017/S0025727300021025>
- Xavier, A. L. R., Hauglund, N. L., Von Holstein-Rathlou, S., Li, Q., Sanggaard, S., Lou, N., ... Nedergaard, M. (2018). Cannula implantation into the cisterna magna of rodents. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(135), 1–6. <https://doi.org/10.3791/57378>
- Yağmurlu, K., Sokolowski, J. D., Çırak, M., Urgun, K., Soldozy, S., Mut, M., ... Kalani, M. Y. S. (2020). Anatomical features of the deep cervical lymphatic system and intrajugular lymphatic vessels in humans. *Brain Sciences*, 10(12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/brainsci10120953>
- Yoshie, K., H, O., T, K., E, J., K, M., S, N., ... T, Y. (2021). Gene Therapy in a Mouse Model of Niemann-Pick Disease Type CI. *Human Gene Therapy*, 32(11–12), 589–598. <https://doi.org/10.1089/HUM.2020.175>
- Zamecnik, P. C., & Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(1), 280–284. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.280>

10. Supporting Information

Table 3 - Summary of study results involving ICM administration of AAV vectors

Year	Study	Subjects	Sex	Age	Results	References
2021	Transduction efficiency of equal doses of AAV.PHP.eB-CAG-GFP and AAV9-CAG-GFP after ICM	Sprague-Dawley rats	F	6-9 months old	The data demonstrated the advantage of IC administration, an ideal method to deliver gene therapies to the CNS in preclinical investigations of rats and could have key translational effects for the clinical CNS targeting.	(Diptaman et al., 2021)
2021	Gene Therapy in Mouse Model of Niemann-Pick Disease Type C1 (NPC1)	Mice	-	4 to 5 days after birth	Combining both ICV and ICM accomplished broader vector delivery into the CNS, which lead to better outcomes compared to previous reports, with injection into the lateral ventricles or veins alone. Results suggest the viability of gene therapy for patients with NPC1.	(Yoshie et al., 2021)
2021	Expression of transgenes after ICM of AAV-GFP and AAV-GLUT1	Pigs	-	-	Both AAV-GFP and AAV-GLUT1 injection, resulted in GFP expression in broad areas of the brain and peripheral organs (AAV-GFP). Results showed ICM of AAV-GLUT1 as a feasible method for gene therapy of GLUT1DS.	(Nakamura et al., 2021)
2020	Characterization of DRG toxicity induced by AAV vectors	Mice Nonhuman primates	-	-	Injection of unmodified AAV vectors caused heavy transduction of target tissues and toxicity in DRG neurons. Steroid administration was ineffective in alleviating this pathology. However, including miR183 targets in the vectors reduced transgene expression and toxicity of DRG neurons without affecting transduction elsewhere in the primate's brain.	(Hordeaux et al., 2020)
2020	Treatment of Krabbe disease with IT gene therapy	Dogs	-	-	Results confirm that high-dose and early administration are crucial for AAV-9 to offer the greatest benefit. This finding in a large-animal model of Krabbe disease justifies translation to the clinical practice.	(Bradbury et al., 2020)
2020	Volume of injection interference on spinal cord transduction AAV delivery via lumbar puncture	Nonhuman primates	-	Juvenile and adults	Lumbar puncture (IT) did not achieve relevant transduction of the spinal cord. However, the ICM route showed distributed reproducibly in the spinal cord of juvenile and adult animals. These results propose that the ICM route may be a more viable alternative.	(Christian Hinderer et al., 2020)

2020	Comparison AAV-9 vectors expressing GFP injected into the cisterna magna or lumbar SAS	Mice	F	6 to 8 weeks old	(Bailey, Rozenberg, & Gray, 2020)
2020	ICM via a novel catheter-mediated delivery technique (intravascular microcatheter)	Sheep	F/M	-	(Taghian <i>et al.</i> , 2020)
		Human (first-in-human use of this technique)	-	30- and 7-month-old	
2018	Utility of MRI to monitor IT infusions in nonhuman primates	Rhesus and Cynomolgus macaques	-	Adult	(Ohno <i>et al.</i> , 2018)
2018	Safety of suboccipital AAV-9 gene transfer of human α -L-iduronidase into nonhuman primates	Rhesus macaques	F/M	Adult	(Hordeaux <i>et al.</i> , 2018)
2018	Treatment of Niemann-Pick type C2 disease phenotype by intracisternal administration of an AAVrh.10 vector	Mice	F/M	-	(Markmann <i>et al.</i> , 2018)
2018	Evaluation of IT routes of administration for AAV Vectors in large animals	Dogs	-	2-months and 1-year old	(C Hinderer <i>et al.</i> , 2018)
		Cynomolgus monkeys	-	9 to 12 years-old	

IT gene delivery of AAV-9 in mice achieved stable transduction of neurons and glia, broad distribution, as well as higher vector amounts in the lower spinal cord and peripheral organs. ICM showed higher vector expression in select brain and PNS regions.

No adverse results were spotted during infusion or after the treatment. This technique is a safe and minimally invasive alternative to direct injection into the CM, achieving wide distribution of AAV gene transfer to the CNS.

Delivery route impacted the distribution pattern and the kinetics of AAV vector clearance. Real-time MRI showed ICM as an effective route of injection, reaching broad distribution to the brain and spinal cord. ICV resulted in strong cortical coverage but little spinal distribution.

It was demonstrated the safety of the suboccipital administration technique, as well as a positive benefit-risk report, for disorders such as MPSI. Close monitoring for sensory neuron toxicity in human studies is essential as well as the evaluation of sensory symptoms.

The IC vector delivery abolished the genetic defect in the liver and spleen, therefore demonstrating the benefit of IC administration with the potential for a life-long treatment of CNS and systemic manifestations of NPC2 disease.

Dog study: ICV and IC routes resulted in similar transduction into the brain and spinal cord. Animals in the ICV developed encephalitis associated with a T-cell response to the transgene product.

Nonhuman primate: Transduction efficiency was not improved by placing animals in the Trendelenburg position after injection, which illustrates the limitations of commonly used methods for CSF access in the context of AAV delivery.

2017	Improved MECP2 gene therapy interference in toxicity after IC delivery	Mice	-	-	Limitations of the original vector were identified, and it was demonstrated that an improved vector design extends MECP2 survival, without apparent toxicity.	(Sinnott <i>et al.</i> , 2017)
2017	Transduction report of the marmoset CNS resorting to AAV-9 vectors	Common Marmoset	F/M	0.8 to 2.2 years-old	Transduction patterns in the marmoset CNS depended on the administration routes. Different disease animal models and to deliver therapeutic genes for the treatment of diseases affecting distinct brain areas could be created.	(Matsuzaki <i>et al.</i> , 2017)
2016	Evaluation of AAV-mediated gene therapy for CNS disease in Mucopolysaccharidosis VII	Dogs	F/M	-	Concluded that IT injection of AAV9 or AAVrh10 vectors is more effective than IV administration in the large animal model of MPS VII.	(Gurda <i>et al.</i> , 2016)
2015	Transduction of spinal cord and brain after neonatal AAV injection and potential disease modifying effect	Mice Neonatal pups	-	-	ICM: widespread expression of the vector in the brain and spinal cord; IM: strong muscle expression. Studied showed that expression of IL-10 in the spinal axis of mice improved the immune milieu and prolonged survival. These data establish an effective model for transgene delivery of therapeutic biologics to the spinal cord of mice.	(Ayers <i>et al.</i> , 2015)
2014	IC delivery of NF- κ B-inducible scAAV2/9 reveals locoregional neuroinflammation induced by systemic kainic acid treatment	Wistar rats	F	Adults	The recollected data support the use of disease-inducible vectors administered in the CM to characterize the brain pathology in systemic drug-induced or transgenic disease models. Further developments are needed to improve viral particles diffusion into the brain.	(Bockstael <i>et al.</i> , 2014)
2013	CNS gene transfer efficiency results after scAAV9 IC injection	Cats	-	Young adult	IC administration is an efficient AAV delivery route that allows to obtain high transduction of the spinal cord, with minimal off-target gene expression. However, the high VEGF levels in the spinal cord had no useful effect on the disease progression.	(Bucher <i>et al.</i> , 2013)
2013	Cortical and spinal cord transduction after AAV-7 and AAV-9 injection into the CSF	Nonhuman primates	F/M	4 to 24 years-old	Results show that IT delivery of both AAV-7 and AAV-9 products a robust and widespread cellular transduction in the CNS and other peripheral neural structures.	(Samaranch <i>et al.</i> , 2013)

2013	CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by IT AAV administration	Rodent Nonhuman primates	-	-	Intra-CSF delivery (via CM or lumbar cistern) successfully translates from rodents to NHPs, which reassures the use of this method in humans to treat motor neuron and lysosomal storage diseases.	(S. Gray, Nagabhushan Kalburgi, McCown, & Jude Samulski, 2013)
2012	AAV-9 transduction in the CNS	Nonhuman primates	F/M	-	The effectiveness of vascular delivery and CSF delivery of AAV-9 in transducing CNS tissue in nonhuman primates was compared. Both routes created similar distribution patterns, though CSF delivery resulted in a more robust transduction. The CSF route resulted in a greater magnitude of CNS transduction however the delivery of AAV-9 into the CSF did not shield against AAV antibodies.	(Samaranch et al., 2012)
2007	Improved lifetime and better behavioral performances by rAAV gene delivery	Mice	-	Young adult	Results showed a significantly prolonged lifespan of MPS IIIB mice and a major increase of behavioral performances. Also demonstrated the great potential of merging IV and intracisternal administration for refining rAAV CNS gene delivery and creating rAAV gene therapy to treat MPS IIIB in patients.	(Fu et al., 2007)

*F, Female; M, Male; IC, Intracisternal; CM, Cisterna Magna; ICM, injection in the cisterna magna; IV, intravenous; CNS, Central nervous system; CSF, Cerebrospinal fluid; NPC1, Niemann-Pick Disease Type C1; GLUT1DS, Glucose transporter 1 deficiency syndrome; DRG, Dorsal root ganglion; PNS, Peripheral nervous system; MPS I, Mucopolysaccharidosis type I; NPC2, Niemann-Pick Disease Type C2; MPS VII, Mucopolysaccharidosis VII; NHPs, Nonhuman primates; MPS IIIB, Mucopolysaccharidosis IIIB.