



EGAS MONIZ SCHOOL
of HEALTH & SCIENCE

INSTITUTO SUPERIOR UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE - DO DIAGNÓSTICO A
NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS**

Trabalho submetido por
Beatriz do Carmo Lopes da Silva
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2023



EGAS MONIZ SCHOOL
of HEALTH & SCIENCE

INSTITUTO SUPERIOR UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

**DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE - DO DIAGNÓSTICO A
NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS**

Trabalho submetido por
Beatriz do Carmo Lopes da Silva
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Catarina Bernardes

e coorientado por
Professora Doutora Ana Clara Ribeiro

novembro de 2023

Dedicatória

A mim, a ti e a nós.

“Não é para quem quer, é para quem pode”

Agradecimentos

Aos meus pais. À minha mãe por todo o amor, resiliência e apoio. Por tudo. Ao meu pai pela presença, embora os 2173 Km que nos separa, pelas palavras sempre certas no momento certo e por toda a coragem. Por tudo.

Ao meu (pai)drasto por ser incansável, pela generosidade e pelo carinho.

Aos meus avós, ao que ainda está cá e aos que eu dava tudo para que estivessem.

À Marta e à Rita, por tudo o que foram e continuam a ser, desde sempre e para sempre.

Por me mostrarem o que realmente cumplicidade, amizade e intimidade significam.

Ao resto da minha família e amigos por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

A ti, por me teres mostrado companheirismo, perseverança e força, mas acima de tudo por me mostrares o que eu realmente posso ser, sem ti.

Aos meus colegas e amigos de faculdade que direta ou indiretamente me ensinaram algo que vou levar para o resto da minha vida.

À minha orientadora Professora Doutora Catarina Bernardes, por ter aceite orientar esta monografia, por toda a disponibilidade, atenção ao detalhe, ajuda e amabilidade que me mostrou desde o início ao fim. E à minha coorientadora Professora Doutora Ana Clara Ribeiro, por toda a ajuda e por todos os ensinamentos que me transmitiu ao longo de todo o meu percurso académico.

Ao restante corpo docente que compõem o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, que me acompanharam e contribuíram todos os dias, durante 5 anos, para a minha aprendizagem, para que crescesse e evoluísse não só como aluna, mas também como pessoa.

Por fim, quero agradecer a toda a equipa do Hospital de Cascais e agora colegas da Farmácia Marrazes por me terem acolhido e por me mostrarem o que realmente é a profissão farmacêutica.

Aos 5 anos mais exigentes da minha vida, mas os 5 anos de que mais me orgulho na minha vida.

Obrigada.

Resumo

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), uma doença muscular genética hereditária recessiva ligada ao cromossoma X, surge por incapacidade do organismo produzir uma proteína (distrofina) fundamental para o funcionamento do músculo. A ausência desta proteína leva a perda das fibras musculares, com necrose e substituição por fibrose e tecido adiposo. Esta doença é progressiva e a maior perda da força muscular ocorre durante a primeira década de vida e tem por consequência a morte na segunda ou terceira década de vida. Tendo em conta que muitas das novas terapias levaram a um aumento da esperança de vida para estes doentes, esta monografia tem por objetivos rever as características gerais da DMD e abordar as estratégias terapêuticas atualmente utilizadas na prática clínica e particularmente as novas estratégias terapêuticas presentemente em investigação.

Devido à ausência de tratamento curativo para esta doença, o tratamento utilizado atualmente tem por base uma abordagem multidisciplinar com o objetivo de atrasar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida dos doentes. As abordagens terapêuticas que têm sido investigadas nos últimos anos, algumas das quais já em fase de ensaio clínico, incluem terapia farmacológica, terapia celular e terapia génica. Para um possível melhor tratamento para esta patologia, a terapêutica passará pela combinação de várias destas promissoras terapêuticas recentemente estudadas.

Na pesquisa realizada para este trabalho foram incluídos artigos de revisão, publicados entre 2005 e 2023, escritos em inglês, pesquisados na base de dados PUBMED pelos termos “Duchenne Muscular Dystrophy treatment” e “Duchenne Muscular Dystrophy therapy”.

Summary

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), a recessive hereditary genetic muscle disease linked to the X chromosome, appears due to the body's inability to produce a protein (dystrophin) essential for muscle function which leads to the loss of muscle fibers, with necrosis and adipose tissue replacement. This disease is progressive and the greatest loss of muscle strength occurs during the first decade of life and results in death in the second or third decade of life. Taking into account that many of the new therapies have led to an increase in life expectancy for these patients, this thesis aims to review the general characteristics of DMD and address the therapeutic strategies currently used in clinical practice and particularly new therapeutic strategies currently under investigation.

Due to the lack of curative treatment for this disease, the treatment currently used is based on a multidisciplinary approach with the aim of delaying the progression of the disease and improving patients quality of life. Therapeutic approaches that have been investigated in recent years, some of which are already in the clinical trial phase, include pharmacological therapy, cell therapy and gene therapy. For a possible better treatment for this pathology, therapy will involve the combination of several of these recently studied promising therapies.

The research included in this work is based on articles, published between 2005 and 2023, written in English, searched in the PUBMED database for the terms “Duchenne Muscular Dystrophy treatment” and “Duchenne Muscular Dystrophy therapy”.

Índice

1. Introdução.....	11
2. Distrofia Muscular de Duchenne.....	13
2.1. Etiologia.....	13
2.2. Manifestações Clínicas.....	14
2.3. Distrofina.....	15
3. Diagnóstico da DMD.....	19
4. Estratégias terapêuticas.....	23
4.1. Terapias Farmacológicas.....	23
4.1.1. Corticosteróides.....	23
4.1.2. Fármacos Não Esteróides.....	26
4.2. Terapia Genética.....	26
4.2.1. Substituição do gene da distrofina.....	26
4.2.2. Vetores Virais.....	27
4.2.3. Tratamentos Moleculares.....	28
4.2.3.1. Skipping de exões.....	28
4.2.3.2. Supressão de Mutações <i>nonsense</i>	30
4.2.3.3. Suprarregulação da Utropina.....	32
4.2.3.4. Terapia Celular.....	33
4.3. Outras terapêuticas.....	35
4.4. CRISPR.....	40
4.4.1. <i>Skipping</i> de exões por corte único.....	41
4.4.2. Reenquadramento de exões.....	42
4.4.3. <i>Skipping</i> de exões por corte duplo.....	43
4.4.4. Exon Knockin.....	45
4.4.5. Prime Editing.....	46
4.4.6. Base Editing.....	48
4.4.7. CRISPR/CAS9: Desafios futuros.....	49
5. Conclusão.....	51
Referências Bibliográficas.....	53

Índice de Figuras

- Figura 1** - A distrofina estabelece a ligação entre o citoesqueleto das células musculares e a matriz extracelular, proporcionando a estabilidade e a integridade da fibra muscular.....Página 16
- Figura 2** - Estrutura da proteína Distrofina. Domínios funcionais, da esquerda para a direita: domínio de ligação à actina N-terminal (actin-binding domain), domínio de bastonete central constituído por 24 repetições (rod domain), domínio rico em cisteína (CYS) e domínio C-terminal (CT).....Página 17
- Figura 3** - O gene da distrofina contém 79 exões. Domínio N-terminal (NT): exão 2-8; Domínio bastonete central: exão 9-61; Domínio rico em cistina (CR): exão:64-70 e Domínio C-Terminal (CT): exão: 71-79.....Página 18
- Figura 4** - Corte histológico de fibras musculares (A) de um indivíduo saudável e (B) de um doente com DMD.....Página 20
- Figura 5** - Terapia genética utilizando vírus adeno-associados (VAA) para entrega de micro ou minidistrofina.....Página 28
- Figura 6** - Estratégia de Skipping de exões, representando a “camuflagem” do exão 51 adjacente ao exão 50 que foi deletado, conduzindo à restauração da grelha de leitura e, conseqüentemente, permitindo a tradução de um produto de distrofina ligeiramente menor e parcialmente funcional.Página 29
- Figura 7** - Esquema representativo da supressão de mutações nonsense, recorrendo a pequenas moléculas que diminuem a sensibilidade do ribossoma a codões Stop do mRNA, possibilitando dessa forma a tradução contínua da distrofina nos pacientes com mutações sem sentido. (PTC: codão stop prematuro)Página 31
- Figura 8** - Excisão de um exão através de um único corte, em presença da enzima Cas, seguido da ligação não-homóloga (NHEJ) das correspondentes extremidades.....Página 42
- Figura 9** - Reenquadramento de exões através de um único corte, na presença de Cas, após a ligação não-homóloga (NHEJ) das extremidades resultantes da clivagem.....Página 43
- Figura 10** - Deleção de um exão mutado (51) por corte simultâneo em cada dos seus lados com recurso a dois sgRNA (no esquema representados pela tesoura) na presença de Cas e com posterior ligação não-homóloga (NHEJ) das extremidades resultante do corte duplo.....Página 44

Figura 11 - “Exon Knockin” por reparação direta homóloga (HDR) em presença da Cas e de um molde doador (ssODN).....Página 45

Figura 12 - Processo de “Exon Knockin” mediado por integração independente de homologia, no qual uma sequência de DNA exógeno é inserida no local exato do genoma repondo a correspondente sequência em falta (exão 52).....Página 46

Figura 13 - “Prime Editing”Página 47

Figura 14 - “Base editing”. (A) Recurso a ABE para corrigir uma mutação pontual no exão 53 através da transição de A•T para G•C; (B) Utilização de CBE para mutar o local doador de splice do exão 4 trocando C por T, causando o skipping do exão 4 na transcrição.....Página 48

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

ABEs - Editores de base de adenina

AONs - Oligonucleótidos Antissense

CBEs - Editores de base de citosina

CR - C-Terminal

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*

DMD - Distrofia Muscular de Duchenne

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECG - Electrocardiograma

EMA - *European Medicines Agency*

FDA - *Food and Drug Administration*

FISH - *Fluorescence In Situ Hybridization*

HDR - Reparação homóloga direta

IECA - Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

MABs - Mesoangioblastos

MPLA - *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

NF-κB - Fator Nuclear Kappa B

NGS - *New Generation Sequencing*

NT - N-Terminal

pegRNA - *Prime Editing Guide RNA*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PMO - *Phosphorodiamidate morpholino oligomer*

RNA - Ácido Ribonucleico

RNA_m - Ácido Ribonucleico mensageiro

rVAA - Vírus Adeno Associado Recombinante

sgRNA - RNA guia

VAA - Vírus Adeno Associados

VNPP - Ventiladores Não Invasivos de Pressão Positiva

1. Introdução

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma das formas mais graves de distrofias musculares hereditárias.

É a doença neuromuscular mais comum e não apresenta preferência por nenhuma raça ou grupo étnico específico. (Sun, C., et al. 2020)

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossoma X que afeta unicamente o sexo masculino.

Foi descrita pela primeira vez em 1868 pelo neurologista francês Guillaume-Benjamin-Amand Duchenne. (Shieh, P. B.,2018)

A doença é causada por mutações no gene que codifica a proteína distrofina, uma das proteínas essenciais para a estabilidade do músculo esquelético e cardíaco.

Conseqüentemente, a ausência da distrofina leva ao aparecimento de lesões ao nível destes músculos, sendo que os doentes com DMD apresentam as primeiras dificuldades motoras nos três anos iniciais de vida. As conseqüências das mutações no gene da distrofina são progressivas, pelo que à medida que o doente envelhece a sintomatologia agrava-se. A DMD começa por apresentar uma fraqueza muscular geral, progredindo para insuficiência respiratória, deformidades músculo-esqueléticas e cardiomiopatia. Para além destes sintomas é possível verificar comprometimentos ao nível cognitivo, como autismo e problemas de comportamento, levando assim a uma morte prematura quando o indivíduo alcança a terceira década de vida devido a insuficiência cardiorespiratória. (Venugopal & Pavlakis, 2020b)

Embora não exista ainda uma cura absoluta para a DMD, têm sido desenvolvidas nas últimas décadas novas estratégias terapêuticas que podem retardar o início ou progressão da doença.

2. Distrofia Muscular de Duchenne

Na Distrofia Muscular de Duchenne, os primeiros sintomas de fraqueza muscular começam a manifestar-se aos 2 ou 3 anos de vida. A perda muscular é rápida e progressiva e a maioria dos doentes começa por usar cadeira de rodas no início da adolescência. Fraqueza e deformações musculoesqueléticas como escoliose resultam em alterações da função pulmonar geralmente por volta dos 20 anos de idade. A história da doença também é caracterizada por complicações nutricionais, incluindo ganho ou perda de peso, disfunção na deglutição e resultante disfagia. (Ricci et al., 2022c)

Outras complicações, como problemas a nível endócrino, incluindo atraso no crescimento e puberdade tardia, bem como problemas cognitivos e comportamentais apresentam-se na maioria dos doentes, sendo estes últimos não progressivos.

Como já referido, os doentes com Distrofia Muscular de Duchenne acabam por falecer na terceira década de vida por insuficiência cardíaca e/ou respiratória.

À medida que os tratamentos da DMD evoluíram, a taxa de sobrevivência dos doentes também melhorou. Os objetivos terapêuticos principais para os indivíduos que são afetados pela Distrofia Muscular de Duchenne são melhorar a sua longevidade, manter a mobilidade e a independência e promover a sua qualidade de vida.

O diagnóstico precoce e uma monitorização adequada proporcionam uma maior oportunidade para o benefício máximo, tanto das terapias já em uso como das novas estratégias terapêuticas futuras.

2.1. Etiologia

A DMD é uma doença genética decorrente da mutação do gene da distrofina, localizado no cromossoma X.

As mutações resultam em uma produção limitada da proteína distrofina, o que leva a uma perda da integridade da membrana das miofibras conduzindo à necrose do músculo. A distrofina é expressa no músculo esquelético e estriado cardíaco, bem como no cérebro e na retina; a distribuição da distrofina no cérebro é menor que no músculo, explicando assim algumas das manifestações a nível do sistema nervoso central. (Happi Mbakam et al 2022)

Em cerca de um terço dos casos a mutação que causa a doença aparece espontaneamente, sendo que os restantes casos são herdados de forma recessiva ligada ao cromossoma X. (Zhou G et al, 2006)

Até agora foram identificadas mais de 4700 diferentes mutações. (Zhou G et al, 2006) Em 60 a 70% dos casos as deleções de exões únicos ou múltiplos são responsáveis pela doença. As mutações podem ocorrer em quase toda a extensão do gene, mas foram identificadas duas regiões onde é mais provável acontecerem: do exão 43 ao 52, particularmente entre os exões 44 e 49; e entre os exões 2 e 19. As deleções mais comuns são do exão 45 e do grupo de exões 45 a 47. (Happi Mbakam et al., 2022c)

Foi possível verificar que as frequências de mutações da DMD, em especial as grandes deleções são o tipo de mutação mais comum nos doentes por todo o mundo, com 64% na Oceânia, 66% na Europa, 70% nas Américas, 72% na Ásia e 88% em África. (Sun, C., et al. 2020)

2.2. Manifestações clínicas

A DMD está normalmente presente à nascença, mas o bebé é aparentemente saudável.

A doença torna-se visível normalmente entre os 3 e os 5 anos de idade. Por esta altura começa a haver quedas frequentes e fraqueza nos músculos da anca. Outras apresentações típicas são a marcha predominante com as pontas dos pés e cambaleante, bem como dificuldades em correr e a impossibilidade de saltar corretamente. Os doentes apresentam ainda hiperlordose da coluna lombar. (Venugopal & Pavlakis, 2020c)

Por volta dos 5 a 6 anos, os músculos das pernas apresentam hipertrofia e entre os 8 e os 10 anos de idade, apresentam perda completa da marcha, pelo que a criança já não consegue subir escadas ou levantar-se do chão. O próprio andar pode requerer o uso de canadianas. As contraturas articulares e as demais limitações existentes na flexão da anca, extensão dos joelhos, cotovelos e pulsos são agravadas nesta fase pois os pacientes passam muito tempo sentados.

Pelos 12 anos de idade, a maior parte dos pacientes depende de uma cadeira de rodas, o que acaba por agravar as contraturas. Pode-se desenvolver uma escoliose progressiva que em último caso compromete mesmo a função respiratória, que já se encontra diminuída pela fraqueza muscular. A criança tem dores nas costas e nos membros. A escoliose é o

problema ortopédico mais comum encontrado na DMD, especialmente quando a criança perde a capacidade de andar. Quando já não andam, as crianças afetadas por DMD têm mais propensão a terem refluxo gastroesofágico e esofagite, apresentando também obstipação devido a sedentarismo. (Venugopal & Pavlakis, 2020c)

Os sintomas urinários são comuns tanto nas crianças como nos adultos com DMD. Os mais frequentes são a urgência e a incontinência diurna e/ou noturna.

Outro problema importante é a osteoporose, presente na maioria das crianças com esta doença.

A partir dos 16-18 anos, os doentes apresentam predisposição para infeções respiratórias graves, tornam-se progressivamente mais dependentes e acabam por ficar acamados.

A causa mais comum de morte é a infeção respiratória, da qual resulta uma falência respiratória que pode facilmente ocorrer juntamente com hipoventilação e hipóxia. (Venugopal & Pavlakis, 2020c)

2.3. Distrofina

A DMD resulta de mutações no gene da distrofina, proteína que é importante na integridade muscular.

A distrofina existe no músculo esquelético, liso, cardíaco e também no cérebro. Esta proteína tem a função de estabelecer a ligação entre o citoesqueleto das células musculares e a matriz extracelular (figura 1), desempenhando um papel importante na manutenção da integridade e prevenção da rotura da membrana das fibras musculares por forma a suportar o stress mecânico durante a contração muscular.

A ausência de distrofina resulta na fragilidade da membrana plasmática das células do tecido muscular estriado que leva à introdução de cálcio na célula levando assim a uma lesão focal da fibra muscular.

Assim, a distrofina é uma proteína essencial do citoesqueleto no músculo que se localiza na superfície interna da membrana da célula muscular.

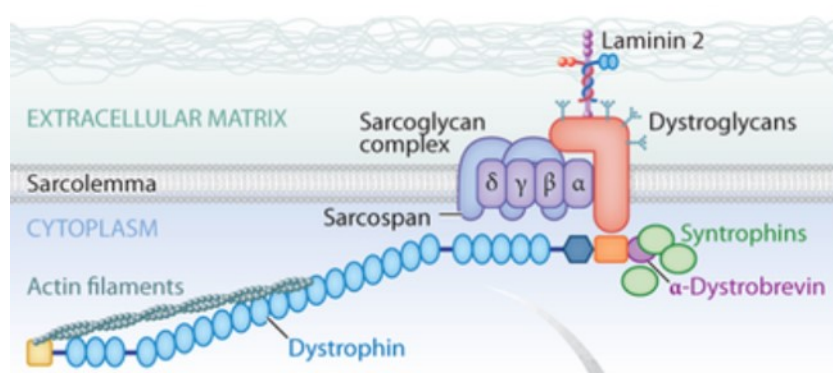


Figura 1 - A distrofina estabelece a ligação entre o citoesqueleto das células musculares e a matriz extracelular, proporcionando a estabilidade e a integridade da fibra muscular. (Adaptado de Min et al., 2019)

A proteína distrofina é constituída por 3685 aminoácidos e tem um peso molecular de 427 kD. (Zhou G et al, 2006) Esta proteína é composta por quatro domínios funcionais distintos (figura 2) distintos que seguem uma ordem específica: o primeiro segmento trata-se do domínio N-terminal de ligação à actina, ou seja, responsável por ligar a distrofina através da rede de actina ao aparelho contrátil nas células do músculo esquelético; o segundo domínio é composto por uma região central com 24 repetições sucessivas semelhantes à espectrina (SLRs) que interage com os microtúbulos, com fosfolípidios da membrana e com uma variedade de outras proteínas; o terceiro segmento, é um domínio rico em cisteína que é necessário para a manutenção da distrofina e por fim o último e quarto segmento trata-se de um domínio carboxi-terminal que fornece os locais de ligação entre proteínas que constituem um complexo proteico ligado à membrana. (Happi Mbakam et al 2022)

Esses quatro domínios, essenciais para o funcionamento adequado da distrofina, interagem com outros componentes do citoesqueleto celular para formar o chamado complexo de distrofina, que é importante para a estabilidade da membrana muscular.

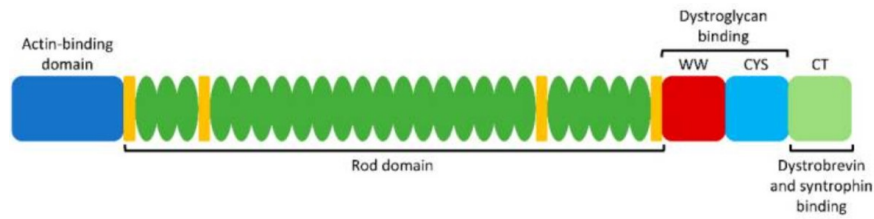


Figura 2 - Estrutura da proteína Distrofina. Domínios funcionais, da esquerda para a direita: domínio de ligação à actina N-terminal (actin-binding domain), domínio de bastonete central constituído por 24 repetições (rod domain), domínio rico em cisteína (CYS) e domínio C-terminal (CT). (Adaptado de Erkut, E., & Yokota, T. 2022)

A distrofina é codificada pelo gene da distrofina (gene DMD), localizado no braço curto do cromossoma X, mais precisamente no locus Xp21, sendo o maior gene identificado no genoma humano (representa 0,1% do mesmo). Apresenta 2,4 milhões de pares de bases no DNA e 79 exões na sua constituição (figura 3). (Zhou G et al, 2006). Pelo facto do gene DMD apresentar uma grande dimensão, a sua taxa de mutação é elevada.

Certas regiões do gene da distrofina, conhecidas como “pontos críticos”, têm maior probabilidade de sofrer mutações na DMD. Nestes pontos críticos estão incluídos os exões 45 a 55, que correspondem à região central do gene e os exões 2 a 10 que codificam o domínio N-terminal de ligação à actina da proteína distrofina. Assim, existe um maior interesse na pesquisa de estratégias terapêuticas que corrijam as mutações nestes “pontos críticos” onde acontecem um maior número de mutações de forma a prevenir a progressão da doença. (Happi Mbakam et al 2022)

Destas mutações, as mais prevalentes são grandes deleções que abrangem mais de um exão e representam 70% dos casos de DMD. Outras mutações, como duplicações, inserções e mutações sem sentido (*nonsense*) são responsáveis, respetivamente, por cerca de 10% a 15%, 3% e 10% das ocorrências de DMD.

Exatamente 80% das grandes deleções na DMD ocorrem nos pontos críticos entre os exões 2 a 20 e os exões de 43 a 55, enquanto que metade das duplicações ocorrem entre os exões 2 a 20. (Happi Mbakam et al., 2022)

Sendo que existem cinco exões mais afetados. Foi registado que no exão 51, ocorrem 14% de deleções, no exão 45 ocorrem 9%, no exão 43, 7,5% e no exão 44, 7,1% das deleções. (Happi Mbakam et al., 2022d)

A alta taxa de mutação em conjunto com a variedade de mutações que pode ocorrer leva a desafios significativos para o desenvolvimento de novas terapêuticas de correção genética aplicáveis a doentes com diferentes mutações no gene de distrofina.



Figura 3 - O gene da distrofina contém 79 exões. Domínio N-terminal (NT): exão 2-8; Domínio bastonete central: exão 9-61; Domínio rico em cistina (CR): exão:64-70 e Domínio C-Terminal (CT): exão: 71-79. (Adaptado de Sun, C. 2020)

3. Diagnóstico da DMD

Na DMD é fundamental ser feita uma caracterização rigorosa das mutações do gene da distrofina, bem como recorrer a ferramentas precisas de diagnóstico por forma a possibilitar um adequado aconselhamento genético e estratégias terapêuticas personalizadas.

Deve-se suspeitar de Distrofia Muscular de Duchenne em crianças do sexo masculino, incapazes de andar aos 16-18 meses, com sintomas de fraqueza, exame físico característico e possível história familiar da doença.

Os testes laboratoriais envolvem medições de creatinina quinase e eletrocardiograma com descobertas suspeitas de cardiomiopatia. Assim, através de um eletrocardiograma é possível detetar possíveis alterações características, como por exemplo arritmias, sendo as arritmias supraventriculares as mais comuns; por outro lado, recorrendo a ecocardiograma é possível verificar a evidência de cardiomiopatia dilatada, a qual está presente em quase todos os pacientes no final da adolescência ou na faixa etária dos 20 anos.

Quanto aos testes de medições séricas de creatinina quinase estão elevadas antes do desenvolvimento de sintomas e sinais clínicos podendo estar elevadas em recém-nascidos. Os níveis atingem o pico aos dois anos de idade e podem estar 10 a 20 vezes acima do limite superior considerado normal. À medida que a idade e a doença avançam, os níveis séricos de creatinina quinase diminuem e a fibrose e a gordura substituem progressivamente os músculos. (Bez, A. et al, 2023) Isto é observado em cerca de 80% dos casos de DMD, sendo que os níveis mais elevados são observados entre as idades de 8 e 12 anos. (Venugopal & Pavlakis, 2020d)

Aos doentes com suspeita de DMD, é também possível fazer uma biópsia muscular que demonstrará proliferação de tecido conjuntivo, degeneração das miofibras, necrose de fibra muscular com infiltrado de células e substituição de músculo por tecido adiposo e gordura.

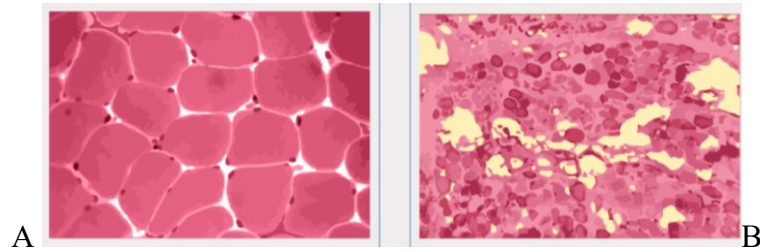


Figura 4 - Corte histológico de fibras musculares (A) de um indivíduo saudável e (B) de um doente com DMD. (Adaptado www.movimentoduchenne.com)

A amostra da biópsia pode ser posteriormente submetida a análise por Western Blot que revelará anormalidades na quantidade e peso molecular da distrofina. (Sun et al., 2020c)

Os músculos em análise por norma são os quadríceps e o gastrocnémio.

Pacientes com DMD demonstram ausência completa ou quase completa da proteína distrofina. Esta ausência de distrofina pode ser usada para prever a gravidade da doença.

Na Distrofia Muscular de Duchenne, os pacientes apresentam menos de 5% da quantidade normal de distrofina. (Venugopal & Pavlakis, 2020e)

A nível molecular, o teste mais simples para fazer o diagnóstico de DMD é o estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA) das células sanguíneas que demonstre qualquer deleção no gene da distrofina. No entanto, em 30% dos pacientes em que aconteça uma deleção não ser detetada é necessário o recurso a uma biópsia muscular para estabelecer a ausência de distrofina. (Sun et al., 2020d)

As reações em cadeia da polimerase (PCR) múltipla, são o teste “padrão” para o diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne, por serem um procedimento simples, rápido, económico e preciso, permitindo identificar deleções no gene da distrofina. A PCR pode ser usada para detetar mais de 98% das mutações, neste caso as deleções existentes, obtendo-se resultados em apenas 24 horas. No entanto, a PCR múltipla não possibilita detetar duplicações e determinar alterações de grelhas de leitura. (Sun et al., 2020d) Por outro lado, pode recorrer-se a técnicas de amplificação por sonda dependente de ligação multiplex (MPLA), para a pesquisa em simultâneo dos 79 exões por forma a identificar duplicações e deleções. (Sun et al., 2020d) Há ainda a possibilidade de serem usadas técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) que podem ser

particularmente úteis na detecção de mutações pontuais. Este último tipo de mutações também pode ser detectado com hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), embora esta técnica seja usada com menos frequência. (Venugopal & Pavlakis, 2020f)

4. Estratégias terapêuticas

Atualmente, ainda não existe uma cura definitiva para a Distrofia Muscular de Duchenne. No entanto, tem ocorrido alguma evolução nas estratégias terapêuticas usadas e, conseqüentemente, a longevidade dos doentes também tem melhorado.

Os doentes podem ser tratados com base na sintomatologia que apresentam, recorrendo a estratégias médicas e/ou cirúrgicas, nomeadamente na área da fisioterapia, ortopedia e nutrição. Quanto à abordagem terapêutica, pode recorrer-se a terapias farmacológicas, terapias genéticas e terapias celulares, entre outras.

4.1 Terapias Farmacológicas

Nos pontos abaixo abordam-se as principais opções farmacológicas usadas no tratamento dos doentes com DMD, bem como no alívio dos sintomas da mesma.

4.1.1 Corticosteróides

Atualmente o tratamento dos doentes com DMD passa pela administração de corticosteróides, sendo os mais estudados e utilizados a prednisona, a prednisolona e o deflazacort. (Bez, A. et al, 3023). Presentemente, os corticosteróides são os únicos agentes farmacológicos com benefícios documentados, ainda que estejam associados a vários efeitos adversos. Sabe-se que são os únicos fármacos que conseguem modificar a história natural da doença, sendo capazes de atrasar a sua progressão e manter a força e função dos músculos esqueléticos melhorando a qualidade de vida destes doentes. Os estudos mostram um papel importante também na preservação da função respiratória e na prevenção da escoliose e da cardiomiopatia nos doentes com DMD, quando há tolerância ao fármaco para terapêutica a longo prazo. Segundo o consenso de diagnóstico e tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne, nunca é tarde para iniciar o tratamento com corticosteróides, pois são visíveis os benefícios a nível motor em qualquer momento

do início da terapêutica. (Ricci et al., 2022) É importante indicar que o tratamento com corticosteróides não deve ser descontinuado após a perda de mobilidade, dada a sua eficácia também nas características não motoras da doença.

A evidência indica que a dose de 0,75 mg/ kg/dia ou 10mg/ kg por semana de prednisona ou de prednisolona é uma dose segura e o deflazacort com uma dose diária de 0,9 mg/Kg/dia tem uma eficácia semelhante com menos efeitos secundários, tais como: menor ganho de peso, menor perda da massa muscular e melhor perfil lipídico. (Hoffman et al, 2019) Contudo, estes fármacos apresentam efeitos adversos que a longo prazo prejudicam a situação clínica do doente, nomeadamente, o aumento de peso, síndrome de cushing, alterações comportamentais, fraturas vertebrais e supressão do crescimento ósseo linear. (Falzarano et al., 2015b) Estes efeitos implicam um controlo e monitorização regulares na utilização dos mesmos, com o intuito de otimizar a sua utilização nestes doentes. Na maioria dos casos os benefícios prevalecem sobre os efeitos adversos. A decisão de escolher qual o corticosteróide (entre os vários corticosteróides disponíveis) deve ser administrado, o momento para iniciar o tratamento e qual a melhor maneira de monitorizar os efeitos adversos, deve ser tomada tendo em conta as especificidades de cada criança, nomeadamente o estado funcional, a sua idade e os fatores de risco pré-existentes para o aparecimento dos efeitos colaterais.

Os estudos indicam que estes fármacos devem ser administrados precocemente, a partir dos 4 anos de idade, quando é visível a diminuição ou estagnação da atividade muscular. (Shieh, 2018b) A prednisolona é frequentemente utilizada na Europa em vez de prednisona, e sabe-se que tem um mecanismo de ação idêntico ao Deflazacort. A primeira tem a vantagem de ser mais económica e de ter grande disponibilidade no mercado. Já o Deflazacort, apesar de apresentar menor risco de aumento de peso para alguns doentes, é mais caro e tem menor disponibilidade no mercado. Alguns especialistas mantêm a terapêutica com corticosteróides mesmo após a perda de deambulação, com o intuito de manter a força dos membros superiores e retardar a progressão da escoliose e o declínio da função cardíaca e respiratória. Algum tempo após o início da corticoterapia, variável de doente para doente, os doentes acabam por invariavelmente perder força e função muscular, embora esteja provado que é uma perda menor do que a que ocorre nos doentes que não são submetidos a corticoterapia. É então um tratamento eficaz no que diz respeito ao prolongamento da função motora, mas não na recuperação total da função perdida. (Shieh, 2018b)

Novos corticosteróides estão em desenvolvimento para o tratamento da DMD como Valomorone e Edasalnoxent. (Ricci, et al, 2022)

Recentemente, o Valomorene foi proposto para o tratamento na DMD como um corticosteróide com propriedades anti-inflamatórias, sem efeitos imunossupressores ou hormonais significativos. Estão em desenvolvimento estudos que estabelecem o perfil de segurança e eficácia de Vamorolone e que procuram vantagens potenciais deste novo análogo em relação aos corticoesteróides atualmente utilizados. Foi realizado um estudo compreendendo 28 pacientes do sexo masculino com DMD. As doses utilizadas de Valomorene foram de 0,25, 0,75, 2,0 e 6,0 mg/kg por dose em suspensão oral. Foi possível concluir que em todas as doses testadas, o Valomorene foi seguro e bem tolerado durante o período de tratamento de 24 semanas. O grupo referente à dose de 2,0 mg/kg atingiu o resultado primário de eficácia de melhoria da função muscular sem evidência da maioria dos efeitos adversos causados pelos corticosteróides. (Hoffman et al, 2019)

No mesmo sentido, está em desenvolvimento o corticosteróide Edasalnexent que pode beneficiar pacientes com DMD com base nas suas propriedades anti-inflamatórias. O Edasalnexent é constituído por uma pequena nova molécula administrada por via oral que liga covalentemente dois compostos que inibem a via de sinalização NF-kB (principal fator de degeneração muscular e supressão do músculo). Um estudo de fase II, que compreendeu pacientes do sexo masculino entre os 4 e os 8 anos de idade, mostrou que o tratamento com Edasalnexent foi bem tolerado e a maioria dos efeitos adversos foram ligeiros, mostrando assim um perfil de segurança adequado. O Edasalnexent foi associado à diminuição da progressão da doença, à preservação da função muscular e a uma diminuição significativa dos níveis dos genes regulados por NF-kB, bem como melhoria nos biomarcadores da saúde muscular e inflamação. Estes resultados apoiam ensaios clínicos futuros e possivelmente a sua aprovação. (Finkel et al, 2021)

Em suma, as principais vantagens da corticoterapia nos doentes com DMD são: prolongamento do tempo e capacidade de andar, redução da necessidade de intervenção cirúrgica na coluna vertebral, redução da disfunção cardiopulmonar, atraso da necessidade de ventilação e aumento da esperança média de vida e qualidade de vida. Os parâmetros clínicos mais utilizados na avaliação da corticoterapia na DMD são: o prolongamento da capacidade de ficar de pé e levantar-se do chão, subir escadas e andar. O aumento da força muscular ou função não são incluídos. A inclusão de doentes sob

corticoterapia em estudos sobre DMD pode assim ser problemática por mascarar a evolução natural da doença. A introdução dos corticosteróides na terapêutica das distrofias musculares, em especial na DMD, no final da década de 60, permitiu o aumento da esperança média de vida dos doentes para a 3ª década de vida e veio revolucionar a abordagem a esta patologia, sendo atualmente a terapêutica mais eficaz e efetiva. (Ricci et al., 2022)

4.1.2 Fármacos não esteróides

Existem ainda outras estratégias farmacológicas com recurso a fármacos não esteróides, como por exemplo, inibidores da histona desacetilase, tendo sido demonstrado em experimentação em animais que a administração deste tipo de inibidores atrasa a progressão da doença. (Colussi et al., 2008; Consalvi et al., 2013)

Por outro lado, tendo em conta que na DMD ocorre diminuição da síntese de óxido nítrico (NO), a administração de medicamentos dadores de NO em conjunto com anti-inflamatórios não esteróides (ex. ibuprofeno) pode contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos doentes, nomeadamente por reduzir o processo inflamatório e prevenir a perda do músculo esquelético. (Cordani et al., 2014)

4.2 Terapia Genética

4.2.1 Substituição do gene da distrofina

Desde a descoberta da causa molecular da DMD, a possibilidade de obter uma cura definitiva através de uma cópia funcional do gene DMD tem sido promissora. Para doenças de mutação num único gene, resultando na ausência de expressão proteica, como acontece na DMD, o objetivo da terapia de substituição genética é introduzir nas células distróficas uma cópia funcional do gene, para permitir recuperar a produção de distrofina funcional.

Esta terapia tem sido subdividida consoante a utilização ou não de vetores virais para a transdução do gene. O subgrupo que não utiliza vetores virais inclui: *skipping* de exões e correção do gene. (Chen et al., 2022)

As maiores dificuldades encontradas no desenvolvimento da terapia génica são: a necessidade de atingir diferentes músculos (em particular o diafragma e coração), a otimização da via de administração, a necessidade de uma expressão mais prolongada, a possível ocorrência de resposta imune ou de fibrose e a prevenção de lesões. (Bez et al., 2023)

4.2.2. Vetores Virais

Nos últimos anos, a utilização de vírus adeno-associados (VAA), com a função de vetores, proporcionou a possibilidade de entregar material genético a uma variedade de tecidos. (Sun et al., 2020)

Os vetores virais, são vetores derivados de adenovírus e estão entre os vetores mais utilizados para a terapia genética. Atualmente, o vetor viral escolhido para a aplicação na DMD é a forma recombinante de vírus adeno associados, rVAA, capazes de infetar as células com capacidade replicativa, permitindo a expressão persistente por vários anos.

Foi desenvolvida uma versão diferente de distrofina de tamanho reduzido, mini ou microdistrofina com cerca de 4 kb de comprimento e sem o domínio C-terminal (figura 5). Estudos revelam que injeções intramusculares de micro distrofina administradas usando vetores VAA foram testadas de modo a melhorar o transporte destes. (Sun et al., 2020)

Vários ensaios clínicos sobre a transferência de distrofina por VAA foram realizados a nível mundial nas últimas décadas. Ainda assim, permanecem desafios em relação à eficiência, à otimização do método de administração e à previsão das respostas imunológicas. Fatores como a idade do doente, dose e métodos de administração devem ser cuidadosamente avaliados e estudados. No entanto, os VAA são vetores atraentes devido à sua toxicidade relativamente baixa e à sua capacidade de persistir por meses ou anos, mas como a sua expressão pode diminuir após a divisão celular, a readministração destes vetores ainda pode ser considerada.



Figura 5 - Terapia gênica utilizando vírus adeno-associados (VAA) para entrega de micro ou minidistrofina. (Adaptado de Bez et al., 2023)

4.2.3. Tratamentos Moleculares

Compreende-se por “tratamentos moleculares” os termos: “skipping de exões” e “leitura de codões Stop” onde estão indicadas terapêuticas que têm como objetivo obter a expressão da proteína distrofina a partir do material genético do próprio doente, por meio do *splicing* do RNA (“*skipping* de exões”) ou da tradução de RNA mensageiro (RNAm) com a leitura de codões stop, de forma a corrigir total ou parcialmente o efeito da mutação causadora da doença.

4.2.3.1. Skipping de Exões

Foi descrita a possibilidade da restauração da distrofina por “Skipping de Exões”. Este termo geralmente refere-se ao uso de oligonucleótidos antissense (AONs) que conseguem ligar-se a uma sequência específica de RNA mensageiro de forma a remover os exões mutados ou a mais restaurando o padrão de leitura genética. Desta forma, é promovida a modificação genética, com a conseqüentemente reparação ou alteração das mutações genéticas da DMD. O “skipping” de exões pode ser aplicado a 60-80% das mutações genéticas da DMD, as quais causam especificamente uma mudança da grelha de leitura. (Rodino-Klapac et al., 2013)

Para omitir um ou mais exões do padrão de leitura são usados oligonucleótidos antissense (AONs) que são sintetizados com o intuito de hibridarem com o pré-RNA mensageiro, que resulta no *skip* de um exão e por consequência é transcrito um RNA mensageiro que ao ser traduzido conduz à formação da proteína funcional (figura 6).

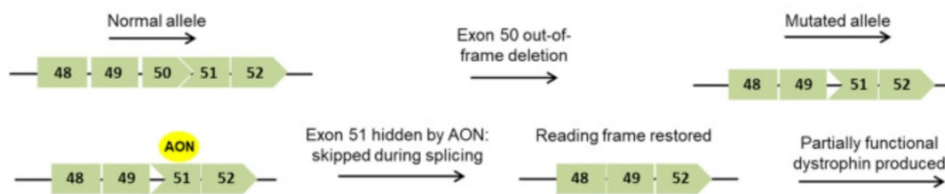


Figura 6 -Estratégia de Skipping de exões, representando a “camuflagem” do exão 51 adjacente ao exão 50 que foi deletado, conduzindo à restauração da grelha de leitura e, conseqüentemente, permitindo a tradução de um produto de distrofina ligeiramente menor e parcialmente funcional. (Adaptado de Bez et al., 2023)

Existem diferentes estruturas de AONs. Alguns dos mais usados são: o Drisapersen, 2-O-metil-RNA com uma base de fosforotioato (2'OMeP), e Eteplisern um oligômero morfolino de fosfordiamidato (PMO). Esta forma de terapia tem sido apoiada por diversos ensaios clínicos. (Sun et al., 2020) Obteve-se a expressão de distrofina com padrão normal eficiente sem efeitos adversos associados, depois de uma injeção intramuscular do 2'OMeP e PMO ter omitido o exão 51 em humanos. O Eteplisern foi aprovado pela FDA em 2016, por conseguir aumentar a produção de distrofina em pacientes com DMD. (Sun et al., 2020)

Os PMOs são análogos sintéticos do DNA que contêm uma estrutura de anéis de morfolino de seis lados que são ligados entre si por uma ligação de fosfordiamidato e apresentam melhor tolerância, reduzindo assim os efeitos adversos.

Atualmente está em curso um estudo de fase II para avaliar o Drisapersen, que induz o skipping do exão 51. (Sun et al., 2020)

Existem outros PMOs que estão em estudo de fase III como o Golodirsen que mostra levar à omissão do exão 53 e Casimersen projetado para a omissão do exão 45. (Sun et al., 2020)

Em dezembro de 2019, o Golodirsen foi aprovado pela FDA para o tratamento de pacientes com DMD. No estudo de fase II de 168 semanas que envolveu 25 pacientes, todos os participantes apresentaram resposta à omissão do exão 53, juntamente com o aumento da expressão da distrofina. Outro PMO, Viltolarsen foi testado no Japão (20, 40 e 80 mg/kg por semana por infusão intravenosa) e nos Estados Unidos (40 e 80 mg/kg por semana por infusão intravenosa). Segundo o estudo feito nos Estados Unidos, após 24 semanas de tratamento, houve um aumento de 5,8% da proteína distrofina. Em março de 2020, o Viltolarsen intravenoso obteve aprovação no Japão para o tratamento de pacientes com DMD com mutações do exon 53. Atualmente, os ensaios clínicos do Viltolarsen continuam a ser realizados nos Estados Unidos e no Canadá. (Sun et al., 2020)

Com estas estruturas de AONs há ainda algumas limitações, nomeadamente pelo facto de nenhuma destas produzir ainda quantidades significativas de distrofina no coração. Outra questão importante é a dúvida se esta terapia apenas atrasa o progresso da doença ou se o impede de ocorrer, ou se haverá mesmo um ganho de função anteriormente inexistente.

4.2.3.2 Supressão de Mutações *nonsense*

Devido a mutações que levam à existência de codões de terminação prematuros, resultando assim numa proteína distrofina truncada e, conseqüentemente, não funcional, surgiram várias estratégias que visam a sua restauração.

A leitura de codões “stop” (figura 7) utiliza certos medicamentos que induzem seletivamente a leitura ribossômica de codões de stop prematuros. Esta forma de tratamento aplica-se apenas a rapazes com mutações que resultem em codões “stop” precoces que terminam prematuramente o processo de síntese da distrofina, ocorrendo

em aproximadamente 13 a 15 % dos pacientes com DMD. O objetivo é fazer com que haja leitura destas mutações, o que é conseguido através da administração de substâncias que interferem com a leitura de codões stop devido à introdução de uma sequência nucleotídica ao nível do mRNA, no local aminoacil do ribossoma, criando uma mutação missense que permite a síntese da proteína funcional. (Babbs et al., 2020)

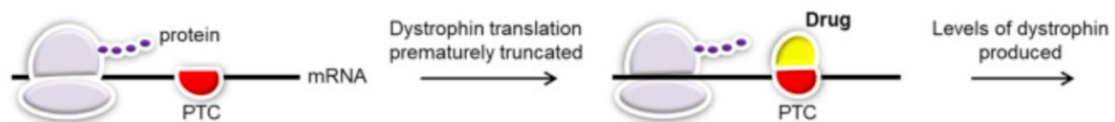


Figura 7 – Esquema representativo da supressão de mutações nonsense, recorrendo a pequenas moléculas que diminuem a sensibilidade do ribossoma a codões Stop do mRNA, possibilitando dessa forma a tradução contínua da distrofina nos pacientes com mutações sem sentido. (PTC: codão stop prematuro) (Adaptado de Bez et al., 2023)

Dos fármacos já estudados, existem duas estratégias farmacológicas principais: uma com recurso à gentamicina e outra ao ataluren.

Foi comprovado que a gentamicina, um antibiótico aminoglicosídeo, tem capacidade de promover a leitura de codões stop. No entanto, a eficácia global da gentamicina não é clara e pode ser bastante limitada, uma vez que os ensaios clínicos mostram resultados mistos. Como é referido por Sun et al. (2020), num estudo em ratinhos mdx foi demonstrado que a administração de gentamicina restaurou a expressão da distrofina para aproximadamente 20% do nível normal e noutro estudo envolvendo 12 doentes (com idades entre 5 e 15 anos) apenas metade deles apresentaram níveis significativamente aumentados de distrofina nos seus tecidos musculares, após 6 meses de administração da gentamicina. Além destas inconsistências, adicionalmente a gentamicina apresenta alguns efeitos adversos que colocam os pacientes em risco, nomeadamente, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, citotoxicidade e resistência bacteriana.

Na tentativa de serem evitados os efeitos adversos da gentamicina, foi desenvolvido outro antibiótico, com o nome de Neomicina, bom como alguns análogos sintéticos do mesmo.

Por exemplo, em 2017 foram desenvolvidos o 3-epi-desoxinegamicina e leucil-3-epi-desoxinegamicina, os quais promovem a produção de distrofina. Atualmente já existem outros análogos da Neomicina, cujo potencial no tratamento da DMD é considerado promissor. Assim, encontram-se em curso estudos adicionais que visam a sua aplicação clínica. (Sun et al., 2020)

No intuito de se criar um fármaco oral não aminoglicosídeo, surgiu o Ataluren, um comprimido administrado oralmente que mostrou resultados promissores em estudos experimentais onde os ensaios clínicos relativos à segurança e tolerância do fármaco, bem como na expressão aumentada da distrofina. O Ataluren trata-se de uma pequena molécula que se mostrou eficaz na supressão de mutações e que apresenta baixa toxicidade para o doente. Em 2014, o Ataluren foi aprovado pela EMA para o tratamento de mutações “nonsense”, de pacientes com 2 ou mais anos de vida. (Sun et al., 2020) O modo de funcionamento do Ataluren nestes doentes permite que na tradução de proteínas nas células a mutação seja transposta, possibilitando a produção de uma proteína distrofina funcional. Está ainda a ser conduzido um estudo em humanos com o objetivo de avaliar a segurança e a farmacocinética do Ataluren em pacientes com DMD. (Sun et al., 2020)

4.2.3.3. Suprarregulação de Utropina

A utropina é uma proteína com uma estrutura semelhante à distrofina, sendo 80% idênticas. Em contraste com a distrofina, a utropina é expressa principalmente nas junções neuromusculares.

A regulação positiva da utropina foi uma das primeiras abordagens para substituir a distrofina. Na reparação muscular, em pacientes com DMD, a expressão da utrofina é naturalmente aumentada devido à ausência de distrofina, funcionando como o mecanismo de compensação da redução de distrofina. Considerando este facto, propôs-se que se poderia aumentar significativamente os níveis de utropina, utilizando químicos

que pudessem suprarregular a atividade promotora do gene desta proteína, com o objetivo de prevenir a distrofia muscular. (Zhou et al., 2006) Esta estratégia tem a vantagem de evitar potenciais reações imunes porque a utropina é naturalmente produzida nos pacientes. Estudos experimentais mostraram alguns efeitos benéficos: o desenvolvimento da força e resistência foram recuperados até 80% depois da sobreexpressão de utropina.

Existe um novo medicamento Ezutromid que demonstra que este modulador de utropina é capaz de aumentar o mRNA da utropina e os níveis da proteína. Estudos *in vitro* em células humanas tratadas com Ezutromid mostram uma redução do fenótipo distrófico e uma melhoria das funções musculares. Por outro lado, um estudo no qual foi administrado Ezutromid em voluntários saudáveis mostrou que este medicamento é seguro e bem tolerado. (Babbs *et al.*, 2020)

4.2.3.4. Terapia Celular

Terapêuticas baseadas em tratamentos celulares oferecem a oportunidade de substituir a distrofina para obtenção de uma potencial cura, e as células estaminais são uma abordagem promissora para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne. (Falzarano et al., 2015)

As células estaminais são uma abordagem alternativa e promissora para a regeneração muscular pela sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em vários tipos de células.

As células estaminais são autorregeneradoras e privilegiadas imunologicamente. Proliferam durante mais tempo que os mioblastos, migram desde o sistema circulatório depois de uma injeção intra-arterial e são mais efetivas na regeneração muscular e expressão de distrofina do que as células mioblásticas. Estas células têm a capacidade de irem para o músculo depois de administração sistémica, acoplando-se ao sítio de lesão.

Esta estratégia terapêutica foca-se na utilização de células estaminais normais no transporte e entrega do gene normal da distrofina no músculo distrófico, com o objetivo de que estas se multipliquem, proliferem e se diferenciem para formar novas fibras musculares, recuperando a produção de distrofina e melhorando a sua função.

Tendo como finalidade regenerar células musculares com distrofina normal nos pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne, foram já tentadas várias estratégias de transplantação de células derivadas do músculo em estudos experimentais e ensaios clínicos. Estas células podem ser obtidas tanto do paciente, casos em que são corrigidas *ex vivo* e reimplantadas (transferência autóloga), como também provenientes de um dador saudável e injetadas no doente com DMD (transferência alogénica). (Konieczny et al., 2013)

Os mioblastos são células precursoras do músculo, diferenciam-se para formar miofibras e foram um dos primeiros tipos de células a serem exploradas para a transplantação.

A transplantação de mioblastos implica os seguintes passos: isolamento de células mioblásticas a partir de músculo esquelético de um dador saudável, seguido da expansão das células em cultura e por fim a administração no tecido distrófico. Estudos experimentais iniciais que foram realizados em animais, revelaram resultados promissores com expressão de distrofina a níveis de 30 a 40 % do normal, contudo, os poucos ensaios clínicos feitos em humanos posteriormente foram desapontantes. (Chakkalakal et al., 2005)

As principais limitações no transplante de mioblastos são: a morte rápida de 75 a 80 % dos mioblastos injetados, a falha na migração dos mioblastos no local de injeção e a imuno rejeição. (Konieczny et al., 2013)

As células estaminais embrionárias têm sido utilizadas como terapia celular devido à sua capacidade ilimitada de autorrenovação e de diferenciação em todos os tipos de células adultas. No entanto, este procedimento levanta preocupações a nível ético e moral.

Por outro lado, as células estaminais adultas são células intrínsecas a vários tecidos capazes de preservar, originar ou substituir células diferenciadas do respetivo tecido. Estas células apresentam várias limitações, como a restrição no tipo de células em que se podem diferenciar, nem todas possuem aptidão para transpor a parede dos vasos, possuem divisão indefinida e são de difícil isolamento e manutenção em laboratório.

Os mesoangioblastos (MABs) são células estaminais derivadas de vasos sanguíneos capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo células musculares esqueléticas e cardíacas. Devido à sua capacidade de transpor a barreira vascular, a eficácia destas células, administradas por via intra-arterial, foi testada em modelos

animais, e obteve-se a expressão de distrofina em mais de 70% das fibras musculares que levou a uma melhoria da mobilidade. Falzarano *et al.* (2015), referiu um estudo no qual não foram descritos efeitos adversos relacionados com este tratamento. Dada assim a sua capacidade significativa de restaurar a estrutura e função musculares, a administração intra-arterial de MABs tem-se tornado uma das mais promissoras terapias celulares na distrofia muscular.

Outras células usadas no tratamento da DMD são as Células CD133 +, as quais são células derivadas do músculo ou sangue que expressam o antígeno de células estaminais e se mostram capazes de originar fibras de distrofina. A segurança da terapia com este tipo de células foi avaliada através de injeção intramuscular de células CD133 + derivadas de músculo, tendo sido demonstrado que este procedimento é seguro e viável. Nos estudos realizados, verificou-se que as células CD133 + derivadas de músculo são mais eficientes na melhoria da morfologia e recuperação da função do músculo esquelético, que as derivadas do sangue. (Falzarano et al., 2015)

Podem ainda recorrer-se a Células Satélite, que são células progenitoras que se localizam entre a membrana basal e o sarcolema das fibras musculares. Estas células têm sido as mais estudadas devido à sua capacidade de diferenciação em mioblastos esqueléticos, ativando subsequentemente a diferenciação miogénica, originando novas fibras musculares. Quando transplantadas, as células satélite, mostraram-se responsáveis pela regeneração de fibras musculares maduras, restauração da expressão de distrofina, redução da inflamação e fibrose musculares e melhoria da função muscular fisiológica. (Meregalli et al., 2010)

4.3. Outras Terapêuticas

Apesar de ainda não haver exatamente uma cura para a deficiência de distrofina, muito tem sido feito no que toca a melhorar a qualidade de vida destes doentes, de forma a que consigam viver mais anos, o que se pensa ser devido primariamente a um cuidado multidisciplinar e coordenado. Assim, o tratamento disponível hoje em dia para os

acidentes com DMD é frequentemente dirigido à sintomatologia e às patologias que se desenvolvem como consequência da própria doença. Refere-se, resumidamente, abaixo algumas dessas comorbidades e correspondentes tratamentos.

Cardiomiopatia

Dado que a maioria dos pacientes com DMD acaba por desenvolver cardiomiopatia e arritmia, é importante fazer o rastreio destas comorbidades. Recomenda-se o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) como primeira linha. Estudos sugerem que o tratamento precoce com IECA pode retardar a progressão da doença e prevenir o aparecimento de insuficiência cardíaca. Podem ainda ser usados beta-bloqueadores, pois proporcionam um efeito antiarrítmico e melhoram a fração de ejeção e a remodelação ventricular adversa. A prevenção de tromboembolia sistêmica com anticoagulantes pode ser considerada nos casos de disfunção cardíaca grave. (Venugopal & Pavlakis, 2020)

A vigilância consiste na avaliação cardiológica com ECG e ecocardiograma, a qual deve ser realizada no momento do diagnóstico ou aos 6 anos de idade. A vigilância de rotina deve ser efetuada uma vez a cada dois anos até os 10 anos de idade e depois anualmente. Se houver evidência de cardiomiopatia, é indicada vigilância a cada seis meses. (Venugopal & Pavlakis, 2020)

Intervenções Ortopédicas/Exercício

A fisioterapia para prevenir contraturas é a base das intervenções ortopédicas. Consoante as necessidades do paciente, podem ser usados exercícios de alongamento passivo e aparelhos ortopédicos para auxiliar na marcha. A cirurgia para ajudar nas contraturas pode ser necessária para doença avançada. (Venugopal & Pavlakis, 2020)

As diretrizes recomendam que todos os doentes participem em exercícios de impacto significativo tendo em conta a progressão da doença para evitar a atrofia dos músculos.

A atividade deve ser reduzida se for observado desenvolvimento de dor muscular significativa.

A reabilitação motora, através da fisioterapia também assume um papel importante na qualidade de vida destes doentes, trabalhando a capacidade de andar e privilegiando o alongamento passivo e ativo dos membros superiores e inferiores. Em conjugação com esta abordagem, é aconselhada a prática de natação na manutenção da capacidade cardiorrespiratória, abrandamento da diminuição de força e melhoria do estado geral. O objetivo é promover exercícios aeróbios, de baixa resistência, e de longa duração que possam prolongar ou manter a função do músculo distrófico, tendo sempre em consideração as especificidades de cada doente. É importante fazer estes exercícios no mínimo de 4 a 6 vezes por semana e continuá-los depois de se perder a marcha, já que eles melhoram a dor e a rigidez muscular.

O tratamento das complicações ortopédicas, através da cirurgia, por exemplo de deformidades e alinhamento da coluna vertebral após o início da fase de declínio da doença, permite aumentar a esperança média de vida e a qualidade de vida. (Venugopal & Pavlakis, 2020)

Nutrição

Os pacientes correm risco de desnutrição, incluindo obesidade.

A osteoporose aparece nestes pacientes, aumentando o risco de fraturas em atividades como a fisioterapia, a vestir-se ou nos cuidados diários. Estimou-se num estudo que cerca de 30 % dos pacientes com DMD dependentes de cadeira de rodas teve uma fratura. Dado também que o confinamento à cadeira de rodas lhes pode dificultar a exposição solar, pode ser recomendada a toma diária de carbonato de cálcio com vitamina D, bem como a toma semanal de alendronato, já que este atua como inibidor da reabsorção óssea. (Venugopal & Pavlakis, 2020)

Função respiratória

Os pacientes com DMD têm alto risco de complicações respiratórias à medida que os músculos respiratórios vão perdendo a sua função, algo que acontece principalmente a partir da segunda década de vida. É recomendado que as crianças com DMD que ainda andem e com 6 ou mais anos de idade façam, pelo menos uma vez por ano, um teste da capacidade vital forçada através de espirometria. O período mais crítico para o cuidado respiratório acontece depois da perda da capacidade de andar. Nesta fase é importante, a cada 6 meses, medir: a saturação por oximetria de pulso, pressões expiratórias e inspiratórias máximas. Quando a condição se agrava aparece a necessidade de ventilação noturna. Os métodos preferidos para o suporte respiratório são os ventiladores não invasivos de pressão positiva (VNPP).

De facto, mais recentemente, verificou-se que o tratamento da insuficiência ventilatória noturna com o uso de ventilação assistida em combinação com melhores cuidados cardíacos são responsáveis pelo aumento da esperança média de vida dos doentes com DMD. (Venugopal & Pavlakis, 2020)

Problemas gastrointestinais

A obstipação e o refluxo gastroesofágico são as condições gastrointestinais mais comuns em crianças com DMD. O refluxo pode ser tratado com inibidores da bomba de prótons ou antagonistas do recetor H₂, usando procinéticos, sucralfato e antiácidos como terapêuticas adicionais. Em particular os inibidores da bomba de prótons têm poucos efeitos secundários e boa eficácia. A obstipação beneficia-se primariamente com uma boa hidratação e uma dieta equilibrada. Por outro lado, também podem ser usados emolientes fecais e laxantes como o leite de magnésio e a lactulose.

Avaliação psicossocial

Os doentes com DMD precisam de apoio e monitorização contínua, pois o fardo psicológico que a doença gera é muito maior que as dificuldades físicas.

No geral, os pacientes com DMD mostram uma adaptação psicossocial semelhante à de outras doenças médicas crônicas. Devido ao atraso mental por vezes marcado, os pacientes mostram pouca reciprocidade social, juízo social e discriminação afetiva. Para além destes aspetos, os doentes têm que conviver com limitações físicas que podem levar a isolamento social e acesso reduzido a atividades sociais.

Há risco aumentado do desenvolvimento de distúrbios semelhantes ao autismo, transtorno de défice de atenção com hiperatividade e perturbação obsessivo-compulsiva. (Venugopal & Pavlakis, 2020) Por vezes o doente está demasiado ansioso, o que pode ser agravado por défices cognitivos na flexibilidade mental.

As dificuldades psicossociais observadas devem ser tratadas com as mesmas intervenções comprovadas que são usadas na população geral. Podem também ser consideradas intervenções psicofarmacológicas para tratar sintomas psiquiátricos moderados a severos. No entanto, é recomendado cuidado com o estado do coração do doente e as possíveis interações farmacológicas com outros fármacos que se aplicam na doença, como os corticosteróides.

Os doentes devem ser avaliados nas seguintes áreas: adaptação emocional, funcionamento neurocognitivo, desenvolvimento da fala, possível presença de autismo e suporte social. Constata-se que, apesar das consequências físicas da doença, a maioria dos adultos com DMD têm progressão para conseguirem uma qualidade de vida elevada.

Abordagem à dor

A dor deve ser avaliada ao longo de toda a doença, sendo que se deve pesquisar qual a causa subjacente para a mesma. Para suprimir ou melhorar a dor usa-se a fisioterapia, correção postural, ortóteses, e melhorias ergonómicas nas cadeiras de rodas e camas. Poder-se-á ter que intervir a nível farmacológico, tendo sempre em atenção interações medicamentosas e a condição respiratória e cardíaca da pessoa.

Tendo em conta os aspetos acima referidos, o tratamento da DMD implica uma abordagem multidisciplinar. Todos os tratamentos referidos, no entanto, não têm características curativas, mas visam melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida. Esta patologia encontra ainda algumas lacunas por existirem dificuldades na criação de ferramentas de avaliação funcional que sejam clinicamente abrangentes.

4.4. CRISPR

Na última década, a edição genética passou a ser uma possibilidade que se encontra na vanguarda com o intuito da identificação de mecanismos de reparação do DNA, sendo a *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR) uma das técnicas mais promissoras de edição genética.

A CRISPR/Cas é uma ferramenta de edição do genoma que consiste em dois componentes: uma transcrição do *locus* CRISPR que resulta em curtos fragmentos de RNA com capacidade de desempenhar o reconhecimento de um DNA exógeno específico que atua como um guia (sgRNA) a um local particular no genoma, e uma proteína chamada Cas9 que hidrolisa o DNA nesse local. (Chen et al., 2022)

No que diz respeito à DMD, foi demonstrado em modelos animais (ratos mdx) que a edição do genoma mediado por CRISPR corrige permanentemente as mutações da doença e restaura a função da distrofina. A utilização desta estratégia foi realizada em 1987 pela primeira vez em ratinhos, corrigindo o exão 23 mutado. (Cho et al., 2013)

Nos últimos anos, também ao nível do genoma humano a edição genética através de CRISPR abriu portas a uma nova estratégia terapêutica através da eliminação e correção de mutações patológicas, sendo assim promissora para a restauração permanente da expressão da distrofina e as funções musculares em indivíduos com DMD.

Com a finalidade de demonstrar que as mutações de DMD podem ser restauradas recorrendo a edição genética incorporando CRISPR, foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo* para o tratamento e cura da Distrofia Muscular de Duchenne. Nesses estudos foram relatados efeitos terapêuticos em células humanas, ratos, cães e porcos com várias mutações de DMD, fornecendo assim informações cruciais, como a dose necessária, veículo de administração, via de administração e os níveis necessários para a recuperação funcional da distrofina. (Chen et al., 2022)

Os dois principais componentes do sistema CRISPR/Cas9 usados na DMD, são a endonuclease associada a CRISPR (Cas) e um único RNA guia (sgRNA), que direciona Cas9 para uma região específica de 20 nucleotídeos no genoma. O sgRNA orienta a endonuclease Cas de forma a que esta se ligue diretamente aos exões alvo, criando quebras no DNA. (Min et al., 2019)

As principais estratégias para a correção terapêutica de mutações DMD mediada por CRISPR são excisão de exões, skipping de exões, reenquadramento de exões, knockin de exões, edição de base e edição de primer. (Chen et al., 2022)

Apesar da terapia genética CRISPR ser promissora para tratar pacientes com DMD ao longo da vida, ainda são necessários mais estudos clínicos, em particular que avaliem a sua eficácia e segurança.

4.4.1. *Skipping* de exões por corte único

O *skipping* de exões recorrendo a CRISPR trata-se de uma correção permanente no genoma humano, na qual os exões mutantes são ignorados conduzindo à produção de uma proteína distrofina mais curta, mas semifuncional, fazendo assim com que uma mutação grave resulte em sintomas mais leves de DMD.

Em aproximadamente 83% dos pacientes com DMD, as deleções no gene da distrofina podem ser restauradas através do *skipping* de exões, uma vez que esta técnica permite que um ou mais exões sejam excluídos para restaurar a distrofina funcional. (Chey et al., 2022)

No *skipping* de exões por corte único é utilizado apenas um sgRNA, o qual é desenhado com o objetivo de alcançar o exão mutado de forma a que ocorra um único corte no alvo genómico na presença da proteína Cas9, resultando assim no salto do exão mutado (figura 8). As extremidades de corte são depois ligadas por reparação não homóloga. Consequentemente este tipo de edição genética restaura a grelha de leitura no RNAm, o que permite a expressão da proteína distrofina que embora truncada é funcional. (Chen et al., 2022)

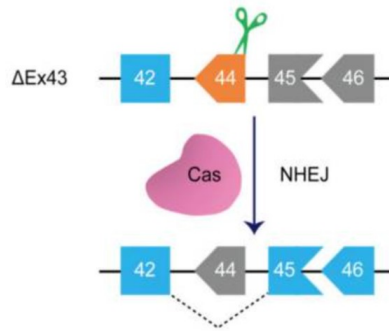


Figura 8 - Excisão de um exão através de um único corte, em presença da enzima Cas, seguido da ligação não-homóloga (NHEJ) das correspondentes extremidades. (Adaptado de Chen et al., 2022)

A abordagem conseguida pelo skipping de exões é eficaz com CRISPR fazendo o uso apenas de um sgRNA, em vez de dois sgRNAs de forma a atacar o exão mutante, conseguindo assim anular o local aceitador de splice ou o local doador de splice. Foi estudado que a eficácia é superior ao fazer skipping de exões usando apenas um sgRNA, em comparação com a utilização de dois sgRNAs. (Chen et al., 2022)

In vitro, o skipping de exões de corte único foi usado para “saltar” os exões 43, 45, 51 e 53. A restauração da distrofina e a melhoria funcional foram observadas nas linhagens celulares editadas.

Esta abordagem foi também testada in vivo em modelos de ratos e cães. A restauração da expressão da distrofina e a função muscular melhorada foram demonstradas. O skipping do exão 45 via CRISPR/Cas9 também demonstrou sucesso, permitindo que o exão 43 se unisse com o exão 46, restaurando assim a distrofina. (Chen et al., 2022)

4.4.2. Reenquadramento de exões

Outra estratégia para restaurar a distrofina envolve o reenquadramento de exões (“exon reframing”) clivando apenas um dos seus lados e posterior união das extremidades desse corte único (figura 9). Esta forma de edição genética é planeada para “reenquadrar” a

grelha de leitura da distrofina, através da introdução de pequenas inserções ou deleções na região do exão. (Happi Mbakam et al., 2022).

Esta técnica de edição genética é semelhante ao skipping de exões por corte único. Ao usar apenas um sgRNA para induzir um único corte no exão na presença da enzima Cas, os indels gerados conduzem ao reenquadramento da grelha de leitura que resulta na tradução da distrofina restaurada.

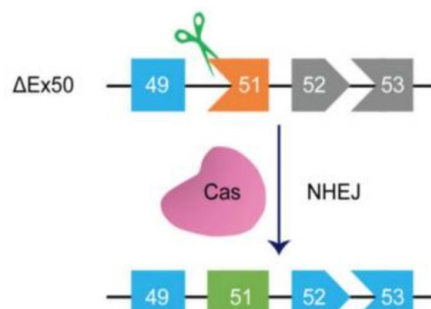


Figura 9 - Reenquadramento de exões através de um único corte, na presença de Cas, após a ligação não-homóloga (NHEJ) das extremidades resultantes da clivagem. (Adaptado de Chen et al., 2022)

Vários estudos demonstraram a restauração eficiente da distrofina através do reenquadramento de exões em humanos e em modelos animais. Esta estratégia oferece a possibilidade de corrigir permanentemente mutações específicas da DMD. (Bez et al., 2023)

4.4.3. *Skipping* de exões por corte duplo

A remoção de um ou mais exões por edição genética CRISPR aplica-se aproximadamente a 85% de todos os pacientes com DMD portadores de duplicações,

deleções ou mutações pontuais de exões. Uma das formas de corrigir algumas dessas mutações é recorrer a excisão de exões por corte duplo.

Ao contrário da edição genética por corte único, a deleção de exões por corte duplo (figura 10) requer dois sgRNA, posicionados um em cada lado do exão mutado e, conseqüentemente, em presença de Cas, os locais genômicos são clivados ao mesmo tempo. (Chen et al., 2022)

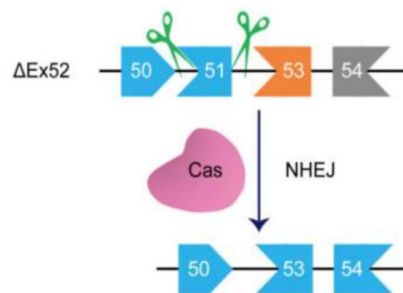


Figura 10 - Deleção de um exão mutado (51) por corte simultâneo em cada dos seus lados com recurso a dois sgRNA (no esquema representados pela tesoura) na presença de Cas e com posterior ligação não-homóloga (NHEJ) das extremidades resultantes do corte duplo.

(Adaptado de Chen et al., 2022)

É importante mencionar que este método de excisão de exões por corte duplo se aplica a uma proporção maior de pacientes com DMD, pois trata-se de um método menos específico, permitindo assim a remoção de múltiplos exões num *hotspot* mutacional. (Chen et al., 2022) No entanto, isto pode levar a uma proteína distrofina mais curta em comparação com a abordagem de deleção de corte único. Contudo, a técnica de deleção de exões por corte duplo pode ser útil para corrigir mutações devidas a duplicação de exões, as quais afetam uma percentagem considerável dos pacientes com DMD. Um exão duplicado pode ser removido com a orientação de dois sgRNA direcionados para a região do intrão próxima ao exão duplicado. Assim, o gene da distrofina pode ser restaurado, o que resulta na produção de proteína distrofina completa idêntica à distrofina normal. Foi demonstrado que com este método é possível remover a mutação de duplicação, sendo

restaurada a expressão da distrofina completa e, conseqüentemente, melhorar a funcionalidade muscular *in vivo*. (Chen et al., 2022)

O “ponto crítico” entre os exões 45 a 55, trata-se de um alvo atraente para uma estratégia de exclusão de vários exões, uma vez que em pacientes com DMD com mutações entre os exões 48 a 50, foi demonstrado por Erkut & Yokota, (2022) que a exclusão de toda a região do exão 45-55 restaurou a expressão da distrofina. Outras grandes deleções duplas envolvendo este “ponto crítico” também foram testadas, incluindo os exões 44 a 54 e 48 e 57. (Erkut & Yokota, 2022)

4.4.4. “Exon Knockin”

Todas as estratégias descritas anteriormente, usam a edição do gene CRISPR para eliminar exões, resultando assim em uma forma truncada de distrofina. Em comparação, a estratégia de “exon knockin” pode utilizar reparação homóloga direta (HDR) induzida por CRISPR (figura 11), que envolve um DNA molde doador, que resulta na restauração da proteína distrofina completa. (Bez et al., 2023)

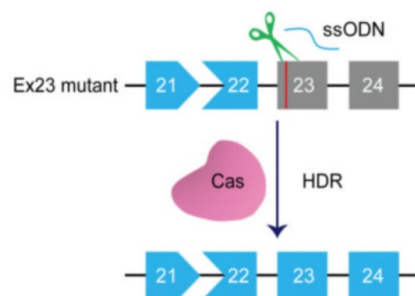


Figura 11 - “Exon Knockin” por reparação direta homóloga (HDR) em presença da Cas e de um molde doador (ssODN). (Adaptado de Chen et al., 2022)

Esta estratégia terapêutica é particularmente útil para mutações nas regiões essenciais dos terminais N e C da distrofina. Até agora, a estratégia de knockin baseada em HDR tem sido explorada para solucionar mutações pontuais em modelos animais de DMD ou para casos de deleção de um único exão em DMD humana. (Chen et al., 2022) Independentemente da sua utilidade, o recurso a este método apresenta algumas limitações, não só pelo facto de ter uma baixa eficiência, mas também pelo facto de existir o risco de ocorrer uma integração invertida e de o comprimento do DNA molde doador permitido para alguns vetores constituir uma dificuldade para grandes deleções no gene DMD.

Por outro lado, a correção da mutação também pode ser feita pelo método de “Exon knockin” mediado por uma integração independente de homologia (figura 12), que permite a inclusão eficiente de um exão no local específico do genoma, já que recorre a um molde doador exógeno com a sequência de DNA desejada flanqueada pelos locais de clivagem Cas9. Tendo em conta que a proteína Cas9 cliva quer essa sequência e quer o alvo genómico, a maquinaria de reparação integra a sequência de DNA doadora no locus genómico exato.

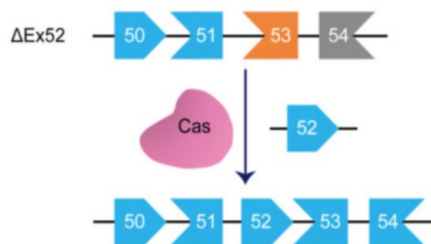


Figura 12 - Processo de “Exon Knockin” mediado por integração independente de homologia, no qual uma sequência de DNA exógeno é inserida no local exato do genoma repondo a correspondente sequência em falta (exão 52). (Adaptado de Chen et al., 2022)

4.4.5. Prime Editing

Recentemente, foi desenvolvida uma nova estratégia, denominada “prime editing”, que foi adicionada às técnicas CRISPR para tratar mutações pontuais de DMD.

A técnica de “Prime editing” aproveita um nCas9 cataliticamente inativo. O nCas9 é acoplado a uma transcriptase reversa projetada e entregue com um sgRNA, conhecido como RNA guia (pegRNA). A transcriptase reversa usa o pegRNA como modelo para adicionar uma alteração no DNA no local alvo. O pegRNA atua assim como um modelo doador para a reparação precisa do gene por meio de conversões, inserções ou deleções de pares de bases (figura 13). (Chen et al., 2022)

Embora o “prime editing” tenha potencial para corrigir uma variedade de mutações causadoras de DMD, as restrições de tamanho continuam a ser um problema para a aplicação desta estratégia *in vivo*.

Esta abordagem permite transições e transversões, bem como inserções e deleções genômicas específicas do local para reparação homóloga direta.

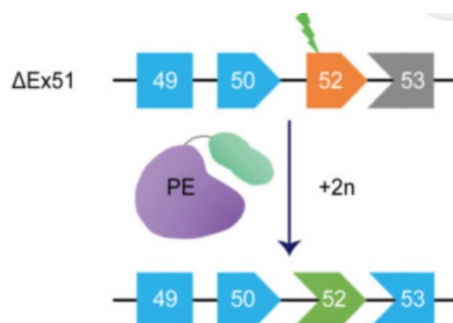


Figura 13 - “Prime Editing”
(Adaptado de Chen et al., 2022)

4.4.6. “Base Editing”

Estima-se que 25–35% dos pacientes com DMD apresentam mutações pontuais. O sistema recentemente desenvolvido designado por “base editing” oferece uma estratégia poderosa para corrigir com segurança mutações DMD, especialmente mutações pontuais. (Erkut & Yokota, 2022)

Existem duas categorias principais de *base editing* de DNA: editores de base de citosina (CBEs) que catalisam as transições C•G para T•A, e editores de base de adenina (ABEs) que convertem os pares de bases A•T em G•C.

O *base editing* em termos mecânicos é realizado por conversão direta de bases na posição mutada ou por *skipping* de exões (figura 14).

Foi sugerido por Jin et al., (2019) que os ABEs, por terem uma alta especificidade nas conversões que originam no genoma, são mais seguros que os CBEs. Adicionalmente foi demonstrado que diversos ABEs são eficazes em ratinhos DMD portadores de uma única deleção de exões ou mutações sem sentido, o que sustenta o seu potencial terapêutico. (Chen et al., 2022)

Esta estratégia tem sido usada para interromper locais aceitadores de splicing e pode ser usada para interromper codões Stop prematuros, fornecendo assim novas oportunidades para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne.

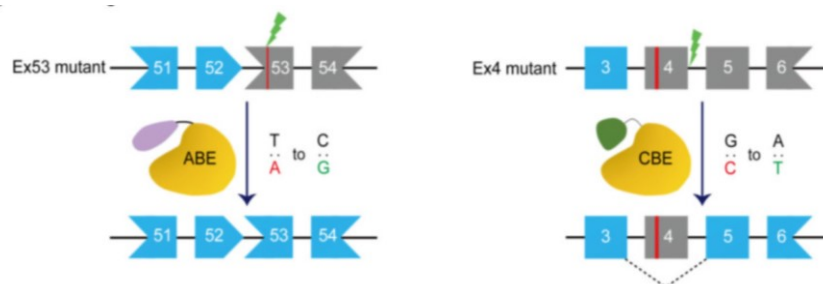


Figura 14 - *Base editing*. (A) Recurso a ABE para corrigir uma mutação pontual no exão 53 através da transição de A•T para G•C; (B) Utilização de CBE para mutar o local doador de splice do exão 4 trocando C por T, causando o skipping do exão 4 na transcrição.

(Adaptado de Chen et al., 2022)

4.4.7. CRISPR/CAS9: Desafios futuros

Apesar dos vários avanços recentes, a abordagem experimental de CRISPR ainda se encontra em uma fase inicial de desenvolvimento para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne.

Notavelmente, o risco de mutação fora do alvo em questão, *in vivo*, é uma preocupação significativa. Outras questões a serem abordadas são a eficiência de entrega deste tratamento a todos os músculos esqueléticos afetados e principalmente ao coração, além de questões relacionadas com a manutenção da expressão da distrofina a longo prazo. (Bez et al., 2023)

Além disso, há uma série de questões imunológicas a ter em conta, como por exemplo a reação do sistema imunitário em relação à distrofina substituída, esta ainda é uma preocupação que permanece com todos os tratamentos que recorrem à edição genética usando CRISPR. São necessários mais estudos para abordar completamente essas preocupações, como por exemplo, estudos com foco na segurança e eficiência do tratamento.

O sistema CRISPR foi recentemente introduzido em ensaios clínicos para outras doenças, como doenças sanguíneas (hemofilia A), a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, cancro, alergias, e distúrbios cardiovasculares, imunológicos e neurológicos. (Bez et al., 2023)

Embora o sistema CRISPR enfrente vários desafios, sem dúvida criou novas possibilidades para o tratamento de doenças do foro hereditário que certamente criará novas oportunidades para muitas aplicações nos próximos anos.

5. Conclusão

Desde que a Distrofia Muscular de Duchenne foi descoberta, conseguiu-se ter um aumento muito importante na esperança média de vida dos doentes afetados por esta doença, devido aos avanços tecnológicos e estratégias terapêuticas em uso e outros ainda em investigação.

Genericamente todas as medidas a que se ocorre têm como objetivo controlar os sintomas da DMD, nomeadamente promovendo a manutenção da função e da força do músculo ou atenuando o comprometimento respiratório. Assim, as várias abordagens terapêuticas utilizadas atualmente, integradas numa rede de cuidados multidisciplinares, têm permitido diminuir o ritmo da progressão da doença e que estes doentes atinjam a idade adulta com uma melhor qualidade de vida.

Até ao momento a única medicação que mostra eficácia em atrasar a progressão da doença baseia-se na administração de corticosteróides.

As terapias que atualmente estão a ser desenvolvidas são específicas para as mutações, baseadas em células ou DNA, e também fármacos para modular as vias celulares e expressão génica.

Abordagens genéticas, como leitura de codões Stop, skipping de exões, terapia genética ou a expressão de uma proteína para substituir a distrofina ausente, têm feito excelentes progressos.

Recentemente, a edição genética através do método CRISPR emergiu como uma estratégia promissora para corrigir permanentemente as mutações causadas na DMD, restaurando assim a proteína distrofina total.

Referências Bibliográficas:

Babbs, A., Chatzopoulou, M., Edwards, B., Squire, S. E., Wilkinson, I. V. L., Wynne, G. M., Russell, A. J., & Davies, K. E. (2020). From diagnosis to therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Biochemical Society Transactions*, 48(3), 813–821. <https://doi.org/10.1042/BST20190282>

Bez, A., Hosny, N., Cohen, H., Martin, A. A., Hahn, D., Bauer, J., & Metzger, J. M. (2023). *Duchenne muscular dystrophy: disease mechanism and therapeutic strategies*. 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1183101>

Chakkalakal, J. V., Thompson, J., Parks, R. J., & Jasmin, B. J. (2005). Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. *The FASEB Journal*, 19(8), 880–891. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1956rev>

Chen, G., Wei, T., Yang, H., Li, G., & Li, H. (2022). CRISPR-Based Therapeutic Gene Editing for Duchenne Muscular Dystrophy: Advances, Challenges and Perspectives. *Cells*, 11(19), 2964. <https://doi.org/10.3390/cells11192964>

Chey, Y. C. J., Arudkumar, J., Aartsma-Rus, A., Adikusuma, F., & Thomas, P. Q. (2022). CRISPR applications for Duchenne muscular dystrophy: From animal models to potential therapies. *WIREs Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1580>

Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M., & Kim, J.-S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, *31*(3), 230–232. <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>

Colussi, C., Mozzetta, C., Gurtner, A., Illi, B., Rosati, J., Straino, S., Ragone, G., Pescatori, M., Zaccagnini, G., Antonini, A., Minetti, G., Martelli, F., Piaggio, G., Gallinari, P., Steinkuhler, C., Steinkulher, C., Clementi, E., Dell’Aversana, C., Altucci, L., & Mai, A. (2008). HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(49), 19183–19187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805514105>

Consalvi, S., Mozzetta, C., Bettica, P., Germani, M., Fiorentini, F., Del Bene, F., Rocchetti, M., Leoni, F., Monzani, V., Mascagni, P., Puri, P. L., & Saccone, V. (2013). Preclinical studies in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy with the histone deacetylase inhibitor givinostat. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *19*, 79–87. <https://doi.org/10.2119/molmed.2013.00011>

Cordani, N., Pisa, V., Pozzi, L., Sciorati, C., & Clementi, E. (2014). Nitric Oxide Controls Fat Deposition in Dystrophic Skeletal Muscle by Regulating Fibro-Adipogenic Precursor Differentiation. *STEM CELLS*, *32*(4), 874–885. <https://doi.org/10.1002/stem.1587>

Erkut, E., & Yokota, T. (2022). CRISPR Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1832.

<https://doi.org/10.3390/ijms23031832>

Falzarano, M., Scotton, C., Passarelli, C., & Ferlini, A. (2015). Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules*, 20(10), 18168–

18184. <https://doi.org/10.3390/molecules201018168>

Finkel, R. S., Finanger, E., Vandenborne, K., Sweeney, H. L., Tennekoon, G., Shieh, P. B., Willcocks, R., Walter, G., Rooney, W. D., Forbes, S. C., Triplett, W. T., Yum, S. W., Mancini, M., MacDougall, J., Fretzen, A., Bista, P., Nichols, A., & Donovan, J. M. (2021). Disease-modifying effects of edasalonexent, an NF- κ B inhibitor, in young boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of the MoveDMD phase 2 and open label extension trial. *Neuromuscular Disorders*, 31(5), 385–396. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.02.001>

Goyenvalle, A., Seto, J. T., Davies, K. E., & Chamberlain, J. (2011). Therapeutic approaches to muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 20(R1), R69–R78. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr105>

Happi Mbakam, C., Lamothe, G., Tremblay, G., & Tremblay, J. P. (2022).

CRISPR-Cas9 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy.

Neurotherapeutics, 19(3). <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01197-9>

Hoffman, E. P., Schwartz, B. D., Mengle-Gaw, L. J., Smith, E. C., Castro, D., Mah, J. K., McDonald, C. M., Kuntz, N. L., Finkel, R. S., Guglieri, M., Bushby, K., Tulinius, M., Nevo, Y., Ryan, M. M., Webster, R., Smith, A. L., Morgenroth, L. P., Arrieta, A., Shimony, M., & Siener, C. (2019). Vamorolone trial in Duchenne muscular dystrophy shows dose-related improvement of muscle function. *Neurology*, *93*(13), e1312–e1323.

<https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000008168>

Jin, S., Zong, Y., Gao, Q., Zhu, Z., Wang, Y., Qin, P., Liang, C., Wang, D., Qiu, J.-L., Zhang, F., & Gao, C. (2019). Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, *364*(6437), 292–295.

<https://doi.org/10.1126/science.aaw7166>

Konieczny, P., Swiderski, K., & Chamberlain, J. S. (2013). Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle & Nerve*, *47*(5), 649–663.

<https://doi.org/10.1002/mus.23738>

Meregalli, M., Farini, A., Parolini, D., Maciotta, S., & Torrente, Y. (2010). Stem cell therapies to treat muscular dystrophy: progress to date. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, *24*(4), 237–247.

<https://doi.org/10.2165/11534300-000000000-00000>

Min, Y.-L., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2019). CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annual Review of Medicine*, *70*(1), 239–255.

<https://doi.org/10.1146/annurev-med-081117-010451>

Ricci, G., Bello, L., Torri, F., Schirinzi, E., Pegoraro, E., & Siciliano, G. (2022). Therapeutic opportunities and clinical outcome measures in Duchenne muscular dystrophy. *Neurological Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s10072-022-06085-w>

Rodino-Klapac, L. R., Mendell, J. R., & Sahenk, Z. (2013). Update on the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 13(3). <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0332-1>

Shieh, P. B. (2018). Emerging Strategies in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Neurotherapeutics*, 15(4), 840–848. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00687-z>

Sun, C., Shen, L., Zhang, Z., & Xie, X. (2020). Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update. *Genes*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/genes11080837>

Venugopal, V., & Pavlakis, S. (2020). *Duchenne Muscular Dystrophy*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482346/>

Zhou, G., Xie, H., Zhang, S., & Yang, Z. (2006). Current understanding of dystrophin-related muscular dystrophy and therapeutic challenges ahead. *Chinese Medical Journal*, 119(16), 1381–1391. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16934185/>