

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRÁSILIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JONATHAN SILVA DA CRUZ

**FISIOPATOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DISTROFIA
MUSCULAR DE DUCHENNE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado em forma de artigo como requisito, do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília (UNICEUB), sob orientação da Professora Dra. Ana Cláudia de Souza.

BRASÍLIA – DF

2021

Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Jonathan Silva da Cruz¹

Ana Cláudia de Souza²

Resumo

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular degenerativa de caráter genético, herdada recessivamente pelo cromossomo sexual X, que afeta somente indivíduos do sexo masculino com prevalência de 1 para 3500. É caracterizada por uma degeneração progressiva e perda da massa muscular que decorrem por conta de ciclos de degeneração/regeneração, que envolvem inflamações, necroses e fibroses como consequência da mutação herdada no gene da distrofina, uma proteína responsável por manter a integridade da célula muscular, a mutação é responsável por causar uma deficiência ou não produção da proteína. Não há tratamento definitivo para a DMD, o uso de corticoides como medicação para abrandar os sintomas é utilizado permanentemente como uma alternativa, outros tratamentos ainda estão em fase de experimento sendo pesquisados e são cada vez mais promissores. O diagnóstico é feito por meio de testes bioquímicos, moleculares e biópsia, além de avaliação física e do histórico familiar.

Palavras-chave: Duchenne; Duchenne Muscular Distrohpy; Distrofia Muscular de Duchenne; Distrofina; Distrophyn;.

Physiopathology, diagnosis and treatment of Duchenne Muscular Distrophy

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a degenerative neuromuscular disease of genetic character, recessively inherited by the sexual chromosome X, which affects only males with a prevalence of 1 in 3500. It is characterized by a progressive degeneration and a loss of muscle mass that result from degeneration/regeneration cycles, which involve inflammation, necrosis and fibrosis as a consequence of the inherited mutation in the dystrophin gene, a protein responsible for maintaining the integrity of the muscle cell, the mutation is responsible for causing a deficiency or non-production of the protein. There is no definitive treatment for DMD, the use of corticosteroids as a measure to moderate the symptoms is permanently used as an alternative, other treatments are still in the experimental phase being researched and are increasingly promising. Diagnosis is made through biochemical, molecular and biopsy tests, in addition to physical assessment and family history.

Keywords: Duchenne; Duchenne Muscular Distrohpy; Distrofia Muscular de Duchenne; Distrofina; Distrophyn;

¹ Graduando do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

² Doutora em Patologia Molecular pela Universidade de Brasília – UNB, Docente do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1. INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne, ou DMD como é comumente abreviada, é uma doença que afeta os músculos e cérebro do portador de forma que ocorra uma degeneração progressiva devido ao não reparo e regeneração do tecido com consequente perda da massa muscular. Aqueles que portam essa patologia normalmente morrem precocemente por volta dos 20 a 30 anos devido a falhas musculares em órgãos nobres como coração e pulmões (GUIRAUD; DAVIES, 2019; WANG et al., 2014).

Sua causa é genética de herança recessiva ligada ao cromossomo sexual X, a degeneração em si ocorre devido a uma mutação no gene que codifica a distrofina, levando a não tradução ou tradução ineficiente dessa proteína (WANG et al., 2018). Atinge crianças recém-nascidas do sexo masculino com uma prevalência de 1 para 3500 (CDC, 2009; MATTEWS et al., 2010).

A distrofina é responsável por manter a integridade do músculo, força, flexibilidade, e estabilidade, a conexão que é feita entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de actina da célula muscular ocorre por meio do complexo protéico associado a distrofina (DAPC). A perda do DAPC como resultado da ausência da distrofina acaba por levar a deficiências progressivas, tais como ativação de proteases e citocinas pró-inflamatórias, desregulação do cálcio, disfunção de células satélites e das mitocôndrias (GUIRAUD; DAVIES, 2019).

O gene responsável por codificar a distrofina é o DMD, sendo o maior gene já identificado, é formado por 79 éxons, partes que codificam a proteína. Composta por 24 trechos de repetições de espectrina, um domínio rico em cisteína, um domínio de ligação a actina na porção N e um domínio C-terminal (CUNIFF et al., 2008).

Alterações no gene DMD irão gerar alterações ou ausência da distrofina o que provoca uma perda de massa muscular no músculo distrófico, no que diz respeito a unidade da célula muscular, e está relacionada a ocorrência de processos de necrose, inflamação e fibrose, além de surtos de degeneração e regeneração muscular de forma repetitiva associada a uma adaptação vascular prejudicada, devido aos outros processos patológicos, e como consequência induzindo lesões causadas durante a contração (GUIRAUD; DAVIES, 2019).

Os sintomas iniciais da doença ocorrem na infância na maioria dos casos, pela faixa dos 1 e 3 anos de idade, geralmente o quadro clínico se inicia com caminhada atrasada, quedas frequentes, dificuldade de correr e subir escadas, músculos mais volumosos ao redor da panturrilha, coxa e pelve, claramente dando indícios de que já estão sendo afetados (RYDER et al., 2017).

Cerca de 80% das mutações responsáveis por alterar o gene codificador da distrofina são mutações do tipo exclusão ou duplicações dos éxons que constituem o gene da DMD, podendo ser exclusões ou duplicações únicas ou múltiplas, essa análise e compreensão do tipo e da frequência com que aparecem as mutações específicas do paciente portador irão gerar os fenótipos associados à DMD, e são poderosas ferramentas que podem ser usadas para pesquisas científicas, assistência clínica para portadores e diagnósticos genéticos (BLADEN et al., 2015).

O processo inicial de diagnóstico ocorre geralmente na primeira infância, após a percepção do quadro clínico de sinais e sintomas que sugerem possivelmente que a criança tenha a doença, como por exemplo, fraqueza, sinal de Gowers, dificuldade em subir escadas ou andar com os dedos dos pés (CIAFALONI et al., 2009).

O diagnóstico deve ser feito por um especialista neuromuscular, que possa avaliar de forma clínica a criança, além de ter acesso e interpretar as informações investigadas de forma rápida e correta, associando os dados com a apresentação clínica do paciente, após o diagnóstico, geneticistas e conselheiros genéticos aumentam o acompanhamento e o apoio a família do portador (BUSHBY et al., 2010).

O diagnóstico é baseado na comprovação por testes de uma mutação no gene da DMD, ou na identificação por meio de biópsia muscular de uma quantidade anormal da proteína distrofina ou sua qualidade, a biópsia é geralmente usada como diagnóstico (CUNIFF et al., 2008).

Com a estatística aproximada de 70% dos indivíduos com DMD apresentando deleções ou duplicações de um ou mais éxons, o teste de duplicação e exclusão do gene codificador da distrofina são os primeiros usados como confirmatórios, caso os testes genéticos não sejam conclusivos, deve-se coletar por meio de biópsia um pedaço de amostra muscular para análises de imunohistoquímica e técnicas de western blot (BIRNKRANT et al., 2018).

O teste para comprovação de mutações no gene causador da Distrofia Muscular de Duchenne, em amostra sanguínea, é sempre importante e extremamente necessário, mesmo que a DMD seja confirmada pela ausência da expressão da proteína distrofina na biópsia muscular (BUSHBY et al., 2010).

Os membros da família do paciente portador da DMD devem receber aconselhamento genético para determinar possíveis membros no futuro que correm risco de serem portadores, o teste de portadora é recomendado para membros do sexo feminino, de um homem ou

menino que foram geneticamente confirmados como portadores da Distrofia Muscular de Duchenne (BIRNKRANT et al., 2018).

Nesta última década as pesquisas envolvendo à DMD vêm passando por crescente avanço, buscando novos caminhos e meios para se compreender a doença e encontrar um tratamento (FORTES; KOILLER; ARAÚJO, 2018).

Ainda não existe tratamento para a cura da DMD disponível no momento, sendo a única medida terapêutica com efeito na redução da progressão da doença o uso de corticoides (DESGUERRE; LAUGEL, 2015). Na literatura, além da indicação do uso de corticoides para redução da velocidade da doença, há algumas recomendações sobre suporte, manejo e cuidados na DMD, com objetivo de proporcionar uma melhor qualidade de vida do paciente, essas recomendações são divididas em 8 áreas de manejo: ortopédico, psicossocial, cardíaco, respiratório, gastrointestinal/nutricional e da deglutição/fala, corticoterapia, diagnóstico, reabilitação (FORTES; KOILLER; ARAÚJO, 2018).

A história natural de progresso da Distrofia Muscular de Duchenne graças à intervenção farmacológica começou a mudar, tratamentos mais eficazes de quadro clínico subjacente da doença, além de outros avanços adicionais, continuam a oferecer um melhor curso de qualidade de vida para o paciente. Incluindo potenciais terapias moleculares e genéticas (BUSHBY et al., 2010).

O conhecimento acerca da história natural e principalmente da fisiopatologia da DMD associado ao avanço da biologia molecular é um importante aliado para auxiliar no diagnóstico e principalmente no tratamento dessa patologia. Portanto, o objetivo deste trabalho é descrever por meio de uma revisão de literatura os aspectos etiológicos, fisiopatológicos, diagnóstico e tratamento da DMD.

2. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão de literatura do tipo narrativa ou tradicional. Segundo Rother (2007), artigos de revisão narrativa são aqueles publicados com objetivo de descrever e discutir o desenvolvimento de determinado assunto baseando-se em um olhar teórico ou contextual, são constituídas basicamente por análises da literatura em artigos de revista e livros sob o olhar da interpretação e na análise crítica do autor.

As bases de dados utilizadas para pesquisa e procura dos artigos foram: PubMed Central, Scielo, Portal da Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde (BVS) e o portal bibliográfico Google Acadêmico.

Foram utilizadas as seguintes palavras-chave para a seleção e procura dos artigos: Fisiopatologia da síndrome de Duchenne, Duchenne, Duchenne Muscular Dystrophy, Distrofia Muscular de Duchenne, Duchenne diagnostic, Duchenne treatment.

Foram selecionados os artigos entre os anos 2000 e 2020 cujo foco estava na doença da Distrofia Muscular de Duchenne elencando aspectos relacionados a história da doença, os aspectos genéticos que levam a doença, o quadro clínico e sua evolução, os mecanismos fisiológicos que levam a fisiopatologia, a fisiopatologia propriamente explicada, o acompanhamento e os cuidados que as pessoas portadoras necessitam, e o tratamento.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 História

A DMD não possui muitos relatos antigos na literatura, breves descrições podem ser encontradas antes de 1868, como o relato definitivo feito por Duchenne. Neste relatório, ele descreveu 13 casos, a incluir 2 casos femininos, em que observou uma fraqueza progressiva que afetava de forma inicial os membros inferiores. Outro caso foi uma hipertrofia prematura seguida por uma atrofia gradativa, com histologia característica. Duchenne ainda em vida inovou pelo uso da biópsia muscular para obtenção de amostras, assim sendo capaz de realizar um acompanhamento histológico das características do curso da doença, atribuindo a DMD ao músculo em oposição ao sistema nervoso (ALLEN; WHITEHEAD; FROEHNER, 2016).

O neurologista britânico Willian Richard Gowers também estudou muitos casos da doença, e foi responsável por descrever a técnica de elevação do solo utilizada por pacientes, atualmente conhecida como “manobra de Gowers”. Além disso observou que a DMD era herdada da mãe e não do pai, e que a taxa da doença em mulheres era baixa. O padrão de herança observado é agora reconhecido como característica de mutações recessivas no cromossomo X, no qual as mulheres são portadoras, mas não expressam a doença (GOWERS, 1879).

Em 1980 a situação mudou drasticamente, quando a localização e a sequência do gene da distrofina foram descobertos, e o produto proteico distrofina foi caracterizado, dentro de um curto período de tempo (KUNKEL, 2005). Antes de 1980, somente era conhecido que o gene responsável pela mutação estava no cromossomo X, por meio de vários estudos de doenças genéticas que eram ligadas a mudanças no padrão de bandas do cromossomo X,

gradativamente foi sendo esclarecido que o gene mutado se encontrava no braço curto do cromossomo X (Xp21) (EMERY; MUNTONI, 2003).

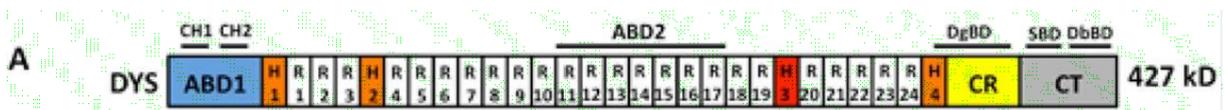
3.2 Etiologia da DMD

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a doença de caráter neuromuscular mais comum em crianças. Sua etiologia está ligada a mutações em genes localizados no cromossomo X, genes esses responsáveis pela produção da proteína distrofina, a mutação pode causar a ausência completa da distrofina no músculo esquelético, respiratório e cardíaco (COWEN et al., 2019).

A distrofina é uma grande proteína em forma de bastonete cujo tamanho corresponde a 110 nm e peso de 427 kDa (figura 1), sua função no organismo é a manutenção da integridade sarcolemal e também tem papel na sinalização intracelular (ABBS et al., 2010; ALLEN; WHITEHEAD; FROEHNER, 2016). Além disso a proteína distrofina é responsável por ligar a rede do citoesqueleto intracelular, actina, aos elementos transmembrana constituintes do complexo de glicoproteína associada a distrofina (DGC), também englobando distroglicano, sarcogliganos e sarcospan (LAPIDOS; KAKKAR; MCNALLY, 2004).

A distrofina possui 4 domínios funcionais principais, como mostra a figura 1 em (A), um domínio de ligação a actina N-terminal (ABD1), esse domínio contém outros 2 homólogos de calponina (CH1 e CH2), um domínio de bastonete central (R1-R24), composto por 24 repetições semelhantes a espectrina, que são interrompidas por dobradiças ricas em prolina em (H1-H4), um domínio rico em cisteína (CR) e o domínio C-terminal (CT). ABD2 é onde se encontra um segundo domínio de ligação a actina (R11-R17). O domínio rico em cisteína e uma parte da dobradiça de H4 formam o local de ligação para β -distroglicano em (DgBD), e o domínio C-terminal também contém locais de ligação para sintrofina (SBD) e distrobrevina (DbBD) (GAO; MCNALLY, 2015).

Figura 1: Distrofina e seus domínios.



Fonte: Adaptado de GAO; MCNALLY (2015)

Para esta função os domínios de ligação de actina, N-terminal, e de ligação DGC, C-terminal são necessários e devem estar intactos, quanto ao que diz respeito ao domínio de bastonete central, que são repetições semelhantes a espectrina, são menos importantes. As

mutações na DMD interrompem o quadro de leitura aberto, do inglês Open Reading Frame (ORF), o que acarreta na produção de variantes de distrofina de forma prematura, truncadas e instáveis sem o terminal C, o que resulta na origem de níveis altamente reduzidos ou na ausência de distrofina (BEEKMAN et al., 2018).

Cerca de dois terços das mutações responsáveis por causar a DMD, são compostas por deleções que envolvem um ou mais exóns, que têm tendência a se agruparem em torno de dois pontos mutacionais. O ponto mais comum se estende do exón 45 ao 55, removendo uma porção do domínio de bastonete central, a segunda deleção mais comum compreende o exón 3 ao 19, e remove uma parte ou todo o domínio de ligação a actina N-terminal em conjunto com uma parte do domínio de bastonete central. Quando ocorre de uma deleção interromper o quadro de leitura, a proteína truncada se expressa em níveis extremamente baixos se associando ao fenótipo da DMD (GAO; MCNALLY, 2015).

3.3 Desenvolvimento da DMD

Em doenças neuromusculares degenerativas, como a DMD, as repercussões patológicas da ausência de distrofina além da perda do complexo proteico associado a distrofina (DAPC), se mostram de forma extrema, por meio de uma cascata sucessiva de eventos, como ciclos repetido de degeneração e regeneração muscular prejudicada, e também impulsos de inflamação (GUIRAUD; DAVIES, 2019).

Na regeneração muscular existem sinais em comum, que podem ser observados por miofibras centronucleadas, aglomerados de pequenas fibras e principalmente MyHC-emb (miosina embrionário de cadeia pesada), além disso é aumentada a expressão da proteína utrofina como parte do processo de reparo no músculo distrófico. Ocorre também três tipos diferentes de ondas envolvendo células e moléculas do sistema imunológico, com o início dado pela primeira onda por meio de moléculas do sistema complemento, seguidos por neutrófilos e mastócitos, e por último o macrófago M1 pró-inflamatório, que vai secretar uma variedade de citocinas, esse recrutamento do sistema imune tem a função de regular a proliferação, ativação e diferenciação de células-satélite do músculo (BAGHDADI; TAJBAHKHSH, 2018). Na DMD, ocorre uma redução dos progenitores musculares e um aumento de células satélite, resultado da polaridade da célula satélite que é prejudicada, o que leva a um déficit de reparo e uma regeneração prejudicada (DUMONT et al., 2015).

Em músculos esqueléticos distróficos de humanos e também de camundongo, mesmo em estágio avançado da DMD, o número de células satélites é elevado, isso sugere que o

número de células satélites não é o principal motivo para falha na regeneração, o músculo de portadores da doença tem a proporção de progenitores que expressam miogenina (Myog), que fazem parte do programa de diferenciação da célula muscular, anormalmente baixa (KOTTLORS; KIRSCHNER, 2010; CHAKKALAKAL et al., 2014).

A reserva de células-tronco é preservada pelos progenitores miogênicos, que são de suma importância para a regeneração muscular, gerados por processos de divisões celular assimétricas, e também pela amplificação simétrica das células satélite. Regulações intracelulares decorrentes da mutação da distrofina fazem com que a geração de progenitores miogênicos, que são necessários para a regeneração muscular de forma adequada, seja fortemente reduzida (DUMONT et al., 2015).

A doença se inicia com rupturas da membrana do sarcolema muscular, que vão levar a um aumento de cálcio basal nas células e como consequência uma sinalização celular inadequada, além disso, as rupturas também causam fragilidade sarcolemal, o que leva a ocorrência do enfraquecimento das células musculares e uma inflamação crônica patogênica (TIDBALL; VILLALTA, 2010).

Os defeitos genéticos da distrofina ou sarcoglicanos levam a uma interrupção do DAG, o que se sabe que resulta em distrofia e/ou cardiomiopatia em humanos e também em modelos animais. Contudo, ainda permanecem indefinidos os principais eventos moleculares iniciais responsáveis por levar a degeneração dos miócitos, embora existam atribuições ao aumento da permeabilidade do miócito ao cálcio, e também a defeitos de membrana, como maior fragilidade relacionada a estresse mecânico (IWATA et al., 2003).

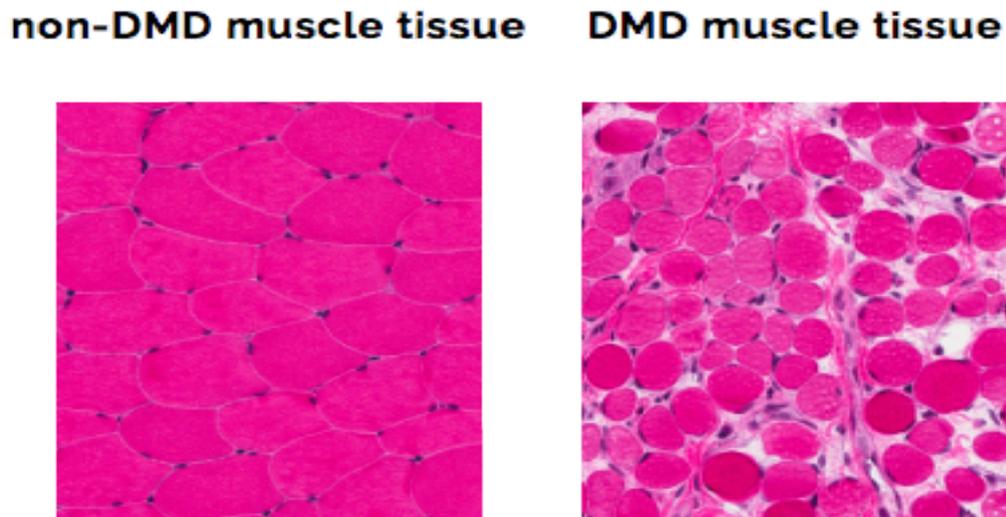
A degeneração também não está somente envolvida com a fragilidade da fibra muscular, a progressão da doença humana é acentuada devido a funcionalidade reduzida das células-tronco musculares devido ao encurtamento dos telômeros levando a célula a exaustão (SACCO et al., 2010; WEBSTER; BLAU, 1990).

A atividade e a expressão anormal de moléculas nas células musculares, como óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), canais de íons de cálcio do tipo L, canais de íons de sódio, ou o canal de cálcio ativado por estiramento, que ficam localizados no sarcolema, podem estar relacionados à degeneração muscular (BRENMAN ET AL., 1995; SATO et al., 2008; WAKAYAMA et al., 2002; FRIGERI et al., 2004; HIRN et al., 2008; FRIEDRICH et al., 2008; IWATA et al., 2003; MATSUMURA et al., 2011).

Em algum momento, devido a regeneração muscular não conseguir acompanhar o ritmo dos ciclos de regeneração e degeneração, as células sofrem uma necrose completa e são substituídas por fibroblastos, miofibroblastos, células do sistema imunológico, e em alguns

casos células adiposas. Esses fibroblastos e miofibroblastos produzem tecido cicatricial e matriz extracelular excessiva, que com o tempo se tornam permanentes (MANN et al., 2011).

Figura 2: Comparativo entre biópsias de células musculares normais e de portadores de DMD. Observa-se nas células afetadas, diferenças de tamanho, ausência da distrofina, presença de fibrose, núcleos aumentados, e citoplasma um pouco pálido.



Fonte: Serapta Therapeutic, Inc (2021)

3.4 Fisiopatologia da DMD

A DMD é uma doença progressiva de caráter grave caracterizada pela perda muscular, sua taxa de expressão em meninos recém-nascidos chega em cerca de 1 em 5000. Por volta dos 3 anos de idade os primeiros sinais e sintomas surgem, com o comprometimento motor e dificuldade para deambular, o que marca o início de uma perda progressiva e degeneração do tecido muscular, levando a uma dependência de cadeira de rodas ainda no início da adolescência (BOCCANEGRA et al., 2020; LOBODA; DULAK, 2020).

Na maior parte dos casos de pacientes com DMD, a aceleração progressiva da doença e o enfraquecimento muscular ocorrem entre as idades de 10 a 14 anos, ao chegar aos 20 anos, os pacientes afetados já começam a demonstrar insuficiência cardíaca e respiratória, o que geralmente leva à morte ainda na 2ª ou 3ª década de vida (EMERY, 2002; MERCURI; MUNTONI, 2013).

Após o marco do paciente ficar preso a uma cadeira de rodas, várias complicações comórbidas progridem rapidamente, como, a escoliose e contraturas musculares. A escoliose leva a problemas ortopédicos adicionais, que levam a possíveis problemas respiratórios, pois

o ombro fica mais alto que o outro, à medida que a cavidade torácica diminui. Indo um pouco mais além, os pacientes também podem desenvolver sintomas de cardiomiopatia, que faz com que as câmaras do coração aumentem e as paredes fiquem mais finas, e ao final da adolescência ou início dos 20 anos, se associa aos problemas respiratórios, e uma vez que os músculos respiratórios e o coração sejam danificados, se torna fatal (RYDER et al., 2017).

A ausência de distrofina também leva a consequências secundárias, como, distúrbios do sistema metabólico (HEYDEMANN, 2018). Mudanças na função mitocondrial e na sinalização de insulina foram observadas em pacientes e também em modelos animais (RODRIGUEZ-CRUZ et al., 2015; CAMERINO et al., 2014; GAMBERI et al., 2018; RYBALKA et al., 2014; KUZNETSOV et al., 1998). Os pacientes apresentam alterações em sua composição corporal e também no gasto energético (HOGAN, 2008; SAURE et al., 2018; SHIMIZU-FUJIWARA et al., 2012).

Cerca de 50% dos pacientes demonstram excesso de peso, mesmo em jovens que nunca fizeram o uso de glicocorticoides em idade precoce. O uso de corticosteroides, que hoje é o principal tratamento para a doença, faz com que os efeitos do excesso de peso sejam exacerbados, o que pode levar a ganho de peso, hiperglicemia, restrições de crescimento e características cushingóides (MARTIGNE et al., 2011; WEST et al., 2013; BERNABE-GARCÍA et al., 2019; DAVIDSON et al., 2014). Contudo, pacientes com idade mais avançada, devido a dificuldades com a alimentação, estão em risco de baixo peso e desnutrição (PANE et al., 2006; MATTHEWS et al., 2016).

A principal causa de dificuldade com a alimentação é a diminuição da força muscular, que levam a disfagia, problemas gastrointestinais, como, constipação e esvaziamento gástrico retardado, além disso durante a fase tardia da doença pode haver um aumento de necessidade energética, causado pela presença da insuficiência respiratória. A consequência desses dois fatores leva a um balanço energético negativo acompanhado pela perda de peso (MESSINA et al., 2008).

O esvaziamento gástrico retardado acontece devido a alteração das células do músculo liso gástrico, e pode contribuir para o refluxo gastresofágico (RGE), a presença de RGE também aumenta os possíveis riscos de aspiração. A constipação tem o envolvimento do músculo liso do cólon que é afetado devido à imobilidade, fraqueza dos músculos da parede abdominal e ingestão inadequada de líquidos, o que leva a um aumento das fezes no cólon causado pelo trânsito gastrointestinal mais lento, e como consequência fezes duras e secas (DAVIS; SAMUELS; MULLINS, 2015).

Pacientes com a doença também apresentam uma variedade de dificuldades de deglutição, a incluir fraqueza facial, mastigação reduzida e má coordenação da língua, esses problemas levam a uma conseqüente diminuição da ingestão de alimento, perda ou incapacidade de ganhar peso, inalação de alimentos pelas vias aéreas com problemas respiratórios subsequentes e infecções respiratórias recorrentes além de episódios aumentados de engasgo, tosse e cusparada ao comer, o que resulta em constrangimentos e dificuldades psicológicas do paciente (MOORE et al., 2016; PANE et al., 2006; MESSINA et al., 2008; JONES et al., 2016).

3.5 Tratamento da DMD

Ainda não existe tratamento para a cura da DMD disponível no momento (DESGUERRE; LAUGEL, 2015). Atualmente, os corticosteroides são a principal forma de tratamento farmacológico para a doença. Entretanto, avanços na biologia molecular possibilitaram o desenvolvimento de diferentes estratégias terapêuticas. (NAKAMURA, 2019).

A terapia de leitura para mutações nonsense, terapia de salto de exón para recuperação do quadro de leitura, terapia gênica usando vetores virais e a terapia de transplante de células estão sendo desenvolvidas ativamente (YOKOTA et al., 2009; WELCH et al., 2007; OKADA; TAKEDA, 2013; IKEMOTO et al., 2007).

A terapia gênica para o tratamento da DMD envolve a introdução nas células musculares de um gene DMD completo ou funcionalmente truncado (cDNA) através de um vetor viral, para restaurar a expressão da distrofina. Os vetores comuns mais usados nas células musculares não divididas incluem vetores lentivirais, vírus adeno-associados (AAV), adenovirais e cromossomos artificiais humanos (HAC), todos têm a capacidade de expressar a longo prazo o gene exógeno sem que cause reações imunológicas evidentes no paciente (NAKAMURA, 2019).

A restauração da funcionalidade pode ser obtida com a transferência de gene viral do DMD de comprimento total, contudo, esta abordagem é restringida devido a capacidade limitada dos vetores virais recombinantes usados (HOWARTH; LEE; UNEY, 2010).

Devido ao grande tamanho do gene DMD sua transcrição tem sido um enorme empecilho no desenvolvimento de métodos para a terapia gênica. Contudo, com estudos em modelos animais e na clínica, foram obtidos conhecimentos relevantes sobre os domínios estruturais da distrofina, o que permitiu o design racional de mini-distrofinas e

microdistrofinas altamente funcionais, com mais receptibilidade a usos na terapia gênica. Para que a transmissão da função da distrofina de comprimento total ocorra, as micro e mini-distrofinas se ligam aos domínios de ligação de actina N-terminal, rico em cisteína e C-terminal, e o domínio de bastonete é truncado (NAKAMURA, 2019).

A terapia *readthrough* é realizada por meio de métodos que inibem a terminação da tradução em mutações nonsense, através desse procedimento é possível restaurar a expressão da distrofina (HOWARD et al., 2000). Esta terapia é aplicável a somente 10% dos pacientes com a doença (NAKAMURA, 2019).

Quanto a terapia de salto de exón, a ideia de seu uso é proporcionar o salto de exóns em torno da mutação original, com isso ocorre a correção do quadro de leitura do gene e à restauração da expressão da distrofina no sarcolema do paciente, essa terapia também tem chamado a atenção como potencial tratamento para a doença (CRAWFORD; PARTRIDGE; CHAMBERLAIN, 2001; LU et al., 2000; YOKOTA et al., 2006).

As questões éticas envolvendo o salto de exóns em relação a outras terapias, como as terapias gênicas mediadas por vetores e por transplantes de células tronco, são consideradas menores, isso porque os AOs (Oligonucleotídeos antisense) não são classificados como agentes de terapia genética, mas sim como drogas, pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e outras agências que representam a União Europeia e o Japão. O salto de exóns pode ser utilizável em até 90% dos pacientes com mutações de deleção (ALTER et al., 2006; RUS et al., 2004).

Estudos também foram capazes de demonstrar a potencial capacidade de uso da CRISPR como tratamento para doenças genéticas, como, fibrose cística, doença de Huntington, doença cardiovascular, doenças do sangue e DMD (CRANE et al., 2015; MONTEYS; EBANKS; KEISER; DAVIDSON, 2017; DING et al., 2014; OUSTEROUT et al., 2015; ROMERO et al., 2019). O potencial da CRISPR também é extremamente útil para o desenvolvimento de tratamentos personalizados, como edição do genoma ou salto de exóns, que requerem mutações de origem específicas para testes (LIM et al., 2020).

Recentemente a CRISPR foi disponibilizada para o uso na terapia de salto de exóns, a primeira edição de genes em vivo utilizando-a foi realizada no gene DMD de camundongos mdx para corrigir uma mutação nonsense no exón 23. (OUSTEROUT et al., 2015; LONG et al., 2014;). Camundongos mdx com 7 a 9 semanas de idade demonstraram aproximadamente 50% de fibras musculares positivas para distrofina, que foram confirmadas por imunocoloração, além de apresentarem diminuição dos níveis séricos de creatinoquinase (CK) e melhora da força de preensão (NAKAMURA, 2019).

Também foram utilizados vetores AAV para entregar componentes CRISPR in vivo para deletar o exón 23 mutado do gene DMD do genoma de camundongos mdx, de forma intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular. Através de imunocoloração e Western blot foram confirmados a restauração da distrofina nos músculos cardíacos e esqueléticos, além de melhorias na função do músculo esquelético e re-localização dos componentes DGC no sarcolema LONG et al., 2016; NELSON et al., 2016; TABEBORDBAR et al., 2016).

Além disso, células-tronco pluripotentes derivadas de DMD induzidas por humanos têm também proporcionado o desenvolvimento de terapia por CRIPR (YOUNG et al., 2016; KYRYCHENKO et al., 2017). A tecnologia CRISPR e o salto de exóns utilizando AOs, em sua essência produzem os mesmos resultados, mas ao contrário dos AOs, a CRISPR tem a vantagem de induzir as correções do gene DMD mutado permanentemente sem exigir tratamento repetitivo. Contudo, ainda é preciso estabelecer a eficácia e segurança da terapia em estudos pré-clínicos antes de dar o início a ensaios clínicos em pacientes (NAKAMURA, 2019).

3.6 Diagnóstico da DMD

Pacientes portadores da DMD podem ser diagnosticados por meio de uma avaliação clínica completa, que envolvem o histórico completo e detalhado do paciente e testes específicos, que incluem teste genético molecular para detectar mutações da distrofina e análise bioquímica, que pode detectar por exemplo, creatinoquinase sérica elevada, que é um marcador de necrose muscular (BIRNKRANT et al., 2018).

Contudo a suspeita do diagnóstico de DMD deve ser considerada independentemente do histórico familiar, no geral é desencadeado de três maneiras, o mais comum é a observação da função muscular anormal em uma criança do sexo masculino, outra forma é a detecção de um aumento na creatinoquinase sérica testada para indicações não relacionadas, e por último após a descoberta de transaminases aumentadas, como a aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, que são produzidas pelos músculos e também pelas células do fígado (BUSHBY et al., 2010).

Portanto o diagnóstico da DMD, em qualquer criança do sexo masculino com transaminases aumentadas, deve ser considerado antes da biópsia hepática. Embora a doença seja comumente diagnosticada por volta dos 5 anos, pode ser suspeitado muito mais cedo devido a atrasos na obtenção de marcos de desenvolvimento (PARSONS; CLARKE; BRADLEY, 2004).

Em uma criança do sexo masculino, a presença do sinal de Gowers deve levantar uma investigação diagnóstica de DMD, principalmente se a criança apresentar marcha bamboleante. Em caso de um histórico familiar positivo de DMD, o teste de creatinoquinase deve possuir um baixo limiar, contudo isso sofre influência da idade da criança. Crianças com menos de 5 anos não podem ter o diagnóstico de DMD excluído por um exame muscular normal, no entanto, quanto maior for a idade, o exame muscular normal torna menos provável a criança ter DMD (BUSHBY et al., 2010).

Os testes genéticos comumente usados para identificar mutações na distrofina são PCR multiplex, amplificação de sonda dependente de ligação multiplex, amplificação de condição única/ primer interno e hibridização de sonda amplificável em multiplex (PRIOR; BRIDGEMAN, 2005; LALIC et al., 2005; FLANIGAN et al., 2003; DENT et al., 2005).

A PCR multiplex está amplamente disponível e é a menos cara, contudo detecta apenas deleções e não cobre todo o gene, de forma que uma exclusão nem sempre pode ser caracterizada. A amplificação de condição única/ primer interno irá detectar deleções e fornecer dados de sequenciamento. A amplificação da sonda dependente da ligação multiplex e a hibridização de sonda amplificável vão detectar deleções e duplicações, cobrindo todos os exóons (BUSHBY et al., 2010).

Caso a análise por uma ou mais dessas técnicas identifique uma mutação da distrofina característica completa, nenhum outro teste é necessário, se o teste de deleção e/ou duplicação for negativo, será necessário fazer o sequenciamento do gene da distrofina, em procura de mutações pontuais ou pequenas deleções/inserções (FLANIGAN et al., 2003; DENT et al., 2005).

A biópsia muscular aberta é necessária, caso o diagnóstico diferencial entre várias possibilidades, inclua a DMD, e pode ser realizada dependendo da situação clínica, disponibilidade de teste genético e das instalações do centro onde o paciente está sob acompanhamento (MUNTONI, 2001).

A imunocitoquímica e imunoblott são os principais testes feitos na biópsia muscular para DMD, e pode fornecer informações sobre a quantidade e o tamanho molecular da distrofina, desde que ela esteja presente, os testes devem ser interpretados por um patologista neuromuscular experiente. Após um diagnóstico positivo para DMD na biópsia, o teste genético é obrigatório, caso o diagnóstico genético for feito primeiro, a biópsia muscular não é necessária, levando em conta que algumas famílias de pacientes veem o procedimento como traumático (BUSHBY et al., 2010).

Fatores como lipídios e metabólitos, como ácidos graxos e creatina; proteínas, como a lactato desidrogenase (LDH); fatores genômicos, como a proteína de ligação a TFG β latente 4 do genótipo LTBP4; e microRNAs, como o miR-1, miR-31, miR-133a e miR-206, podem ser úteis no diagnóstico da DMD, embora não sejam específicos (SZIGYARTO; SPITALI, 2018).

Também a checagem dos níveis séricos de metaloproteinase 9 da matriz (MMP-9), folistatina e miostatina (GDF-8) têm aplicabilidade potencial no diagnóstico, como biomarcadores não invasivos (SEGURA et al., 2015).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como foi revisado, existem relatos desde a época de 1868 acerca da Distrofia Muscular de Duchenne, onde a partir desse ponto começou a ser profundamente investigada, sua etiologia, desenvolvimento, fisiopatologia, que está em grande parte já explicada na literatura, embora ainda muitos tópicos permaneçam sobre pesquisa, tratamentos e diagnósticos, chegando ao ponto onde o acervo literário sobre a doença ter se tornado rico e vasto, além disso pesquisas em busca de tratamentos e diagnósticos específico e inovadores continuam a ser desenvolvidas, dando espaço para um ainda crescimento contínuo de novas informações sobre a DMD.

Atualmente, a biologia molecular está no topo das pesquisas que envolvem a DMD, pelo motivo de ser uma doença genética, está firmemente atrelada a área que ainda se encontra também em desenvolvimento e crescimento, e, portanto, pode ser considerada uma porta de egresso promissora para jovens biomédicos que desejam se envolver com pesquisa e desenvolvimento, já que é uma das áreas em que pode atuar.

A maior parte dos dados revisados foram encontrados na língua inglesa, o que talvez possa indicar que não há muitas pesquisas envolvendo a DMD no Brasil, o que justificaria os poucos dados na língua-mãe.

Pode-se concluir que, as informações e conhecimento sobre a DMD são amplamente conhecidos no mundo todo, por possuir um acervo literário rico e explicativo, contudo, no Brasil quase não há informação e pesquisas sobre a doença, logo se faz necessário que o conhecimento seja mais difundido, e que novas pesquisas sejam propostas e realizadas, por se tratar de uma doença embora não tão comum, atinge uma grande parte dos nascidos-vivos do sexo masculino.

REFERÊNCIAS

- ABBS, S. et al. Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. **Neuromuscular Disorders**, London, v.20. n.6, p.422-427, Jun, 2010. Doi 10.1016/j.nmd.2010.04.005.
- ALLEN, D. G.; WHITEHEAD, N. P.; FROEHNER, S. C. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. **Physiological Reviews**, Rockville, v.96, n.1, p. 253-305, Jan, 2016. Doi: 10.1152/physrev.00007.2015.
- ALTER, J. et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. **Nature Medicine**, New York, v.12, n.2, p.175-177, Feb, 2006. Doi: 10.1038/nm1345.
- BAGHDADI, M. B.; TAJBAKSHI, S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. **Developmental Biology**, Rockville, v.433, n.2, p. 200-209, Jan, 2018. Doi: 10.1016/j.ydbio.2017.07.026.
- BEEKMAN, C. Use of capillary Western immunoassay (Wes) for quantification of dystrophin levels in skeletal muscle of healthy controls and individuals with Becker and Duchenne muscular dystrophy. **PLoS One**, San Francisco, v.13, n.4, Apr, 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0195850.
- BIRNKRANT, D. J. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. **The Lancet Neurology**, London, v.17, n.3, p.251-267, Mar, 2018. Doi: 10.1016/S1474-4422(18)30024-3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869704/>. Acesso em: 15 set. 2019.
- BLADEN, C. L. et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. **Human Mutation**, Baltimore, v.36, n.4, p.395-402, Mar, 2015. Doi: 10.1002/humu.22758. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4405042/>. Acesso em: 17 set. 2019.
- BOCCANEGRA, B. et al. Safety issues and harmful pharmacological interactions of nutritional supplements in Duchenne muscular dystrophy: considerations for Standard of Care and emerging virus outbreaks. **Pharmacological Research**, Milan, v.158, Aug, 2020. Doi: 10.1016/j.phrs.2020.104917.
- BUSHBY, K. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet Neurology**, London, v.9, n.1, p.77-93, Jan, 2010. Doi: 10.1016/S1474-4422(09)70271-6. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(09\)70271-6/fulltext#sec1080709e1260](https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(09)70271-6/fulltext#sec1080709e1260). Acesso em: 15 set. 2019.

BRENMAN, J. E. et al. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, Massachusetts, v.82, n.5, p.743-752, Sep, 1995. Doi: 10.1016/0092-8674(95)90471-9.

BRUNELLI, S. et al. Nitric oxide release combined with nonsteroidal antiinflammatory activity prevents muscular dystrophy pathology and enhances stem cell therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.104, n.1, p.264-269, Jan, 2007. Doi: 10.1073/pnas.0608277104.

CAMERINO, G. M. et al. Gene expression in mdx mouse muscle in relation to age and exercise: aberrant mechanical-metabolic coupling and implications for pre-clinical studies in Duchenne muscular dystrophy. **Human molecular genetics**, Oxford, v.23, n.21, p.5720-5732, Nov, 2014. Doi: 10.1093/hmg/ddu287.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Prevalence of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Among Males Aged 5–24 Years — Four States, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. Atlanta, v.58, n.40, Oct, 2009. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5840.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2019.

CHAKKALAKAL, J. V. et al. Early forming label-retaining muscle stem cells require p27^{kip1} for maintenance of the primitive state. **Development**, Histon, v.141, n.8, p.1649-1659, Apr, 2014. Doi : 10.1242/dev.100842.

CIAFALONI, E. et al. Delayed Diagnosis in Duchenne Muscular Dystrophy: Data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). **The Journal of Pediatrics**, Cincinnati, v.155, n.3, p.380-385, Sep, 2009. Doi: 10.1016/j.jpeds.2009.02.007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884059/>. Acesso em: 25 set. 2019.

COWEN, L. et al. Variability and trends in corticosteroid use by male United States participants with Duchenne muscular dystrophy in the Duchenne Registry. **BMC Neurology**, New York, v.19, n.84, May, 2019. Doi: 10.1186/s12883-019-1304-8.

CUNNIFF, C. et al. Mutation Analysis in a Population-Based Cohort of Boys With Duchenne or Becker Muscular Dystrophy. **Journal of Child Neurology**, Thousand Oaks, v.24, n.4, p.425-430, Apr, 2009. Doi: 10.1177/0883073808324770. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5882193/>. Acesso em: 29 ago. 2019.

CRANE, A. M. et al. Targeted Correction and Restored Function of the *CFTR* Gene in Cystic Fibrosis Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**, Cambridge, v.4, n.4, p.569-577, Apr, 2015. Doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.005.

CRAWFORD, G. E. et al. Suppression of revertant fibers in mdx mice by expression of a functional dystrophin. **Human molecular genetics**, Oxford, v.10, n.24, p.2745-2750, Nov, 2001. Doi: 10.1093/hmg/10.24.2745.

CRUZ, M. R. et al. Evidence of Insulin Resistance and Other Metabolic Alterations in Boys with Duchenne or Becker Muscular Dystrophy. **International journal of endocrinology**, Cairo, May, 2015. Doi: 10.1155/2015/867273.

DAVIDSON, Z. E. et al. Observations of body mass index in Duchenne muscular dystrophy: a longitudinal study. **European journal of clinical nutrition**, London, v.68, n.8, p.892-897, Aug, 2014. Doi: 10.1038/ejcn.2014.93.

DAVIS, J.; SAMUELS, E.; MULLINS, L. Nutrition Considerations in Duchenne Muscular Dystrophy. **Nutrition in clinical practice: NCP**, Baltimore, v.30, n.4, p.511-521, Aug, 2015. Doi: 10.1177/0884533615586202.

DENT, K. M. et al. Improved molecular diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort. **American journal of medical genetics**, Hoboken, v.134, n.3, p.295-298, Apr, 2005. Doi: 10.1002/ajmg.a.30617.

DESGUERRE, I.; LAUGEL, V.

Diagnostic et histoire naturelle de la dystrophie musculaire de Duchenne. **Archives de Pédiatrie**, Paris, v.22, n.12S1, p.1224-1230, Dec, 2015. Doi: 10.1016/S0929-693X(16)30005-7. Disponível em: <https://www.em-consulte.com/en/article/1026535>. Acesso em: 4 de out. 2019.

DING, Q. et al. Permanent Alteration of PCSK9 With In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing. **Circulation Research**, Baltimore, v.115, n.5, p.488-492, Aug, 2014. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304351.

DUMONT, N. A. et al. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. **Nature Medicine**, New York, v.21, n.12, p.1455-1463, Dec, 2015. Doi: 10.1038/nm.3990.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **The Lancet**, London, v.359, n.9307, p.687-695, Feb, 2002. Doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7.

FORTES, C. P. D. D.; KOILLER, L. M.; ARAÚJO, A. P. Q. C. Cuidados com a pessoa com distrofia muscular de Duchenne: revisando as recomendações. **Revista Brasileira de Neurologia**. Rio de Janeiro, v.54, n.2, p.5-13, Abr, 2018. Disponível em: <https://revistas.ufrj.br/index.php/rbn/article/view/19108/CUIDADOS%20COM%20A%20PESSOA%20COM%20DISTROFIA%20MUSCULAR%20DE%20DUCHENNE%3A%20REVISANDO%20AS%20RECOMENDAC%3%83%C2%87%C3%83%C2%95ES>. Acesso em: 4 de out. 2019.

FLANIGAN, K. M. et al. Rapid Direct Sequence Analysis of the Dystrophin Gene. **American journal of human genetics**, Baltimore, v.72, n.4, p.931-939, Apr, 2003. Doi: 10.1086/374176.

FRIEDRICH, O. et al. L-Type Ca²⁺ Channel Function Is Linked to Dystrophin Expression in Mammalian Muscle. **PLoS One**, San Francisco, v.3, n.3, Mar, 2008. Doi: 10.1371/journal.pone.0001762.

FRIGERI, A. et al. Aquaporins in skeletal muscle: reassessment of the functional role of aquaporin-4. **FASEB journal**, Bethesda, v.18, n.7, p.905-907, May, 2004. Doi: 10.1096/fj.03-0987fje.

FUJIWARA, M. S. et al. Decreased resting energy expenditure in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Brain and Development**, Tokyo, v.34, n.3, p.206-212, Mar, 2012. Doi: 10.1016/j.braindev.2011.05.005

GAMBERI, T. et al. Proteome analysis in dystrophic mdx mouse muscle reveals a drastic alteration of key metabolic and contractile proteins after chronic exercise and the potential modulation by anti-oxidant compounds. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v.170, n.1, p.43-58, Jan, 2018. Doi: 10.1016/j.jprot.2017.09.009.

GAO, Q.; MCNALLY, E. M. The Dystrophin Complex: structure, function and implications for therapy. **Comprehensive Physiology**, Rockville, v.5, n.3, p. 1223-1239, July, 2015. Doi: 10.1002/cphy.c140048.

GUIRAUD, S.; DAVIES, K. E. Regenerative biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. **Neural Regeneration Research**, Mumbai, v.14, n.8, p.1317-1320, Aug, 2019. Doi: 10.4103/1673-5374.253534. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6524502/>. Acesso em: 20 ago. 2019.

GARCIA, M. B. et al. Body composition and body mass index in Duchenne muscular dystrophy: Role of dietary intake. **Muscle and Nerve**, New York, v.59, n.3, p.295-302, Mar, 2019. Doi: 10.1002/mus.26340.

HEYDEMANN, A. Skeletal Muscle Metabolism in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy—Implications for Therapies. **Nutrients**, Basel, v.10, n.6, p.796, Jun, 2018. Doi: 10.3390/nu10060796.

HIRN, C. et al. Na_v1.4 Deregulation in Dystrophic Skeletal Muscle Leads to Na⁺ Overload and Enhanced Cell Death. **Journal of General Physiology**, New York, v.132, n.2, p.199-208, Aug, 2008. Doi: 10.1085/jgp.200810024.

HOGAN, S. E. Body composition and resting energy expenditure of individuals with Duchenne and Becker muscular dystrophy. **Canadian journal of dietetic practice and research**, Markham, v.69, n.4, p.208-212, Nov, 2008. Doi: 10.3148/69.4.2008.208.

HOWARD, M. T. et al. Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Annals of neurology**, Boston, v.48, n.2, p.164-169, Aug, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1531-8249%28200008%2948%3A2%3C164%3A%3AAID-ANA5%3E3.0.CO%3B2-B?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 12 de abr. 2021.

HOWARTH, J. L.; LEE, W. B.; UNEY, J. B. Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). **Cell biology and toxicology**, Princeton, v.26, n.1, p.1-20, Oct, 2010. Doi: 10.1007/s10565-009-9139-5.

IKEMOTO, M. et al. Autologous transplantation of SM/C-2.6(+) satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mice. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, San Diego, v.15, n.12, p.2178-2185, Dec, 2007. Doi: 10.1038/sj.mt.6300295.

IWATA, W. et al. A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. **Journal of Cell Biology**, New York, v.161, n.5, p.957-967, Jun, 2003. Doi: 10.1083/jcb.200301101.

JONES, K. et al. Interventions for dysphagia in long-term, progressive muscle disease. **The Cochrane database of systematic reviews**, Chichester, v.9, n.2, p430-403, Feb, 2016. Doi: 10.1002/14651858.CD004303.pub4.

KOTTLORS, M.; KIRSCHNER, J. Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. **Cell and Tissue Research**, New York, v.340, n.3, p.541-548, May, 2010. Doi: 10.1007/s00441-010-0976-6.

KUNKEL, L. M. Cloning of the DMD Gene. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.76, n.2, p.205-214, Feb, 2005. Doi: 10.1086/428143.

KUZNETSOV, A. V. et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. **Molecular and cellular biochemistry**, New York, v.183, n.1, p.87-96, Jun, 1998. Doi: 10.1023/a:1006868130002.

KYRYCHENKO, V. et al. Functional correction of dystrophin actin binding domain mutations by genome editing. **Journal of clinical investigation insight**, Ann Arbor, v.2, n.18, Sep, 2017. Doi: 10.1172/jci.insight.95918.

LALIC, T. et al. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. **European journal of human genetics**, London, v.13, n.11, p.1231-1234, Nov, 2005. Doi: 10.1038/sj.ejhg.5201465.

LAPIDOS, K. A.; KAKKAR, R.; MCNALLY, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. **Circulation Research**, Dallas, v.94, n.8, p. 1023-1031, Apr, 2004. Doi: 10.1161/01.RES.0000126574.61061.25.

LIM, K. R. Q. et al. CRISPR-Generated Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy. **Genes**, Basel, v.11, n.3, p.342, Mar, 2020. Doi: 10.3390/genes11030342.

LOBODA, A.; DULAK, J. Muscle and cardiac therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: past, present, and future. **Pharmacological reports**, Kraków, v.72, n.5, p.1227-1263, July, 2020. Doi: 10.1007/s43440-020-00134-x.

LONG, C. et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. **Science**, New York, v.345, n.6201, p.1184-1188, Sep, 2014. Doi: 10.1126/science.1254445.

LONG, C. et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. **Science**, New York, v.351, n.6271, p.400-403, Jan, 2016. Doi: 10.1126/science.aad5725.

LU, Q. L. et al. Massive Idiosyncratic Exon Skipping Corrects the Nonsense Mutation in Dystrophic Mouse Muscle and Produces Functional Revertant Fibers by Clonal Expansion. **The journal of cell biology**, New York, v.148, n.5, p.985-996, Mar, 2000. Doi: 10.1083/jcb.148.5.985.

MANN, C. J. et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, London, v.1, n.21, May, 2011. Doi: 10.1186/2044-5040-1-21.

MARTIGNE, L. et al. Natural evolution of weight status in Duchenne muscular dystrophy: a retrospective audit. **The British journal of nutrition**, Cambridge, v.105, n.10, p.1486-1491, May, 2011. Doi: 10.1017/S0007114510005180.

MATHEWS, K. D. et al. Muscular Dystrophy Surveillance Tracking and Research Network (MD STARnet): Case Definition in Surveillance for Childhood-Onset Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. **Journal of Child Neurology**, Thousand Oaks, v.25, n.9, p.1098-1102, Sep, 2010. Doi: 10.1177/0883073810371001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674568/#R1>. Acesso em: 29 ago. 2019.

MATTEWS, E. et al. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. **The Cochrane database of systematic reviews**, Oxford, v.5, n.5, May, 2016. Doi: 10.1002/14651858.CD003725.pub4.

MATSUMURA, C. Y. et al. Stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in mdx mice. **American journal of physiology**, Bethesda, v.301, n.6, p.1344-1350, Dec, 2011. Doi: 10.1152/ajpcell.00056.2011.

MERCURI, E.; MUNTONI, F. Muscular dystrophies. **The Lancet**, London, v.381, n.9869, p.845-860, Mar, 2013. Doi: 10.1016/S0140-6736(12)61897-2.

MESSINA, S. et al. Feeding problems and malnutrition in spinal muscular atrophy type II. **Neuromuscular Disorders: NMD**, New York, v.18, n.5, p.389-393, May, 2008. Doi: 10.1016/j.nmd.2008.02.008.

MIZUNOYA, W. et al. Nitric oxide donors improve prednisone effects on muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. **American journal of physiology**, Bethesda, v.300, n.5, p.1065-1077, May, 2011. Doi: 10.1152/ajpcell.00482.2010.

MOORE, G. E. et al. Describing nutrition in spinal muscular atrophy: A systematic review. **Neuromuscular Disorders**, New York, v.26, n.7, p.395-404, Jul, 2016. Doi: 10.1016/j.nmd.2016.05.005.

MONTEYS, A. M. et al. CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, San Diego, v.25, n.1, p.12-23, Jan, 2017. Doi: 10.1016/j.ymthe.2016.11.010.

MUNTONI, F. Is a muscle biopsy in Duchenne dystrophy really necessary?. **Neurology**, Minneapolis, v.57, n.4, p.574-575, Aug, 2001. Doi: 10.1212/wnl.57.4.574.

NAKAMURA, A. Mutation-Based Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: From Genetic Diagnosis to Therapy. **Journal of personalized medicine**, Basel, v.9, n.1, p.16, Mar, 2019. Doi: 10.3390/jpm9010016.

NELSON, C. E. et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Science**, New York, v.351, n.6271, p.403-407, Jan, 2016. Doi: 10.1126/science.aad5143.

OKADA, T.; TAKEDA, S. Current Challenges and Future Directions in Recombinant AAV-Mediated Gene Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. **Pharmaceuticals**, Basel, v.6, n.7, p.813-836, Jul, 2013. Doi: 10.3390/ph6070813.

OUSTEROUT, D. G. et al. Multiplex CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Correction of Dystrophin Mutations that Cause Duchenne Muscular Dystrophy. **Nature communications**, London, v.6, n.6244, Feb, 2015. Doi: 10.1038/ncomms7244.

PALMA, C. D.; CLEMENTI, E. Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair. **Molecular Neurobiology**, Clifton, v.46, n.3, p.682-692, Dec, 2012. Doi: 10.1007/s12035-012-8311-8.

PANE, M. et al. Feeding problems and weight gain in Duchenne muscular dystrophy. **European journal of paediatric neurology**, London, v.10, n.6, p.231-236, Nov, 2006. Doi: 10.1016/j.ejpn.2006.08.008.

PARSONS, P. E.; CLARKE, A. J.; BRADLEY, D. M. Developmental progress in Duchenne muscular dystrophy: lessons for earlier detection. **European journal of paediatric neurology**, London, v.8, n.3, p.145-153, May, 2004. Doi: 10.1016/j.ejpn.2004.01.009.

PRIOR, T. W.; BRIDGEMAN, S. J. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophy. **The Journal of molecular diagnostics**, Bethesda, v.7, n.3, p.317-326, Aug, 2005. Doi: 10.1016/S1525-1578(10)60560-0.

RAMACHANDRAM, J. et al. Nitric Oxide Signaling Pathway in Duchenne Muscular Dystrophy Mice: Upregulation of L-arginine Transporters. **The Biochemical journal**, London, v.449, n.1, p.133-142, Jan, 2013. Doi: 10.1042/BJ20120787.

ROMERO, E. G. et al. CRISPR to fix bad blood: a new tool in basic and clinical hematology. **Haematologica**, Pavia, v.104, n.5, p.881-893, May, 2019. Doi: 10.3324/haematol.2018.211359.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v.20, n.2, p.5-6, Jun, 2007. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-21002007000200001>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-21002007000200001. Acesso em: 27 out. 2019.

RUS, A. A. et al. Antisense-Induced Multiexon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy Makes More Sense. **American journal of human genetics**, Baltimore, v.74, n.1, p.83-92, Jan, 2004. Doi: 10.1086/381039.

RYBALKA, E. et al. Defects in Mitochondrial ATP Synthesis in Dystrophin-Deficient *Mdx* Skeletal Muscles May Be Caused by Complex I Insufficiency. **PLoS One**, San Francisco, v.9, n.12, Dec, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0115763.

RYDER, S. et al. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, New York, v.12, n.79,

Apr, 2017. Doi: 10.1186/s13023-017-0631-3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5405509/>. Acesso em: 1 de set. 2019.

SACCO, A. et al. Short Telomeres and Stem Cell Exhaustion Model Duchenne Muscular Dystrophy in mdx/mTR Mice. **Cell**, Massachusetts, v.143, n.7, p.1059-1071, Dec, 2010. Doi: 10.1016/j.cell.2010.11.039.

SATO, K. et al. Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression. **Acta Myologica**, Napoli, v.27, n.1, p.30-36, July, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2859605/>. Acesso em: 18 de mar. 2021.

SAURE, C. et al. Energy expenditure, body composition, and prevalence of metabolic disorders in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Diabetes and metabolic syndrome**, Amsterdam, v.12, n.2, p.81-85, Jun, 2018. Doi: 10.1016/j.dsx.2017.08.006.

SEGURA, M. A. A. et al. Non-Invasive Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy and Carrier Detection. **Molecules: a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry**, Basel, v.20, n.6, p.11154-11172, Jun, 2015. Doi: 10.3390/molecules200611154.

Serapta Therapeutics, Inc. **Understanding the role of dystrophin in Duchenne**. Cambridge, 2021. Disponível em: <https://www.duchenne.com/importance-of-dystrophin>. Acesso em: 29 jun 2021.

SZIGYARTO, C. A. K.; SPITALI, P. Biomarkers of Duchenne muscular dystrophy: current findings. **Degenerative neurological and neuromuscular disease**, Auckland, v.2018, n.8, p.1-13, Jan, 2018. Doi: 10.2147/DNND.S121099.

TABEBORDBAR, M. et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. **Science**, New York, v.351, n.6271, p.407-411, Jan, 2016. Doi: 10.1126/science.aad5177.

THOMAS, G. D. et al. Treatment with a Nitric Oxide-Donating NSAID Alleviates Functional Muscle Ischemia in the Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. **PLoS One**, San Francisco, v.7, n.11, Nov, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0049350.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, A. S. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.298, n.5, p.1173-1187, May, 2010. Doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009.

WAKAYAMA, Y. et al. Reduced aquaporin 4 expression in the muscle plasma membrane of patients with Duchenne muscular dystrophy. **Archives of Neurology**, Chicago, v.59, n.3, p.431-437, Mar, 2002. Doi: 10.1001/archneur.59.3.431.

WANG, R. T. et al. Online Self-Report Data for Duchenne Muscular Dystrophy Confirms Natural History and Can Be Used to Assess for Therapeutic Benefits. **PLoS Currents**, San Francisco, Oct, 2014. Doi: 10.1371/currents.md.e1e8f2be7c949f9ffe81ec6fca1cce6a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4207635/>. Acesso em: 17 ago. 2019.

WANG, R. T. et al. DMD genotype correlations from the Duchenne Registry: Endogenous exon skipping is a factor in prolonged ambulation for individuals with a defined mutation subtype. **Human Mutation**, Baltimore, v.39, n.9, p.1194-1202, Jul, 2018. Doi: 10.1002/humu.23561. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6175390/>. Acesso em: 17 de ago. 2019.

WEBSTER, C.; BLAU, H. M. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, New York, v.16, n.6, p.557-565, Nov, 1990. Doi: 10.1007/BF01233096.

WELCH, E. M. et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. **Nature**, London, v.447, n.7140, p.87-91, May, 2007. Doi: 10.1038/nature05756.

WEST, N. A. et al. Patterns of growth in ambulatory males with Duchenne muscular dystrophy. **The Journal of pediatrics**, Saint Louis, v.163, n.6, p.1759-1763, Dec, 2013. Doi: 10.1016/j.jpeds.2013.08.004.

YOKOTA, T. et al. Expansion of revertant fibers in dystrophic mdx muscles reflects activity of muscle precursor cells and serves as an index of muscle regeneration. **Journal of cell science**, London, v.119, n.113, p.2679-2687, July, 2006. Doi: 10.1242/jcs.03000.

YOKOTA, T. et al. A Renaissance for Antisense Oligonucleotide Drugs in Neurology Exon Skipping Breaks New Ground. **Archives of neurology**, Chicago, v.66, n.1, p.32-38, Jan, 2009. Doi: 10.1001/archneurol.2008.540.

YOUNG, C. S. et al. A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v.18, n.4, p.533-540, Apr, 2016. Doi: 10.1016/j.stem.2016.01.021.