

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

**ANA CAROLINA GUIMARÃES COSTA DOS SANTOS**

**DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E O TESTE GENÉTICO PRÉ-  
IMPLANTACIONAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado em forma de artigo como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Costa Vinhaes de Lima.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a minha orientadora Fernanda Costa Vinhaes de Lima, pelo empenho, orientação e confiança neste presente trabalho. Agradecer também o meu professor Eduardo Cyrino pelo suporte ao longo do semestre.

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram nos momentos difíceis e confusos que me fortaleceram ainda mais.

Gratidão ao universo que me mandou energias positivas durante o processo, me manteve no trilho certo, com muita saúde e inteligência, permitindo que meu caminho seja cheio de luz e prosperidade.

## **Distrofia muscular de Duchenne e o teste genético pré-implantacional**

Ana Carolina Guimarães Costa dos Santos<sup>1</sup>  
Fernanda Costa Vinhaes de Lima<sup>2</sup>

### **Resumo**

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a doença muscular progressiva mais comum em crianças do sexo masculino. Por se tratar de uma doença sem cura, o aconselhamento para o teste genético pré-implantacional (PGT) é de extrema importância. O objetivo do trabalho foi apresentar a relevância do PGT para o diagnóstico da Distrofia Muscular de Duchenne, além de atualizar informações relevantes sobre a doença, por meio de uma revisão narrativa da literatura, construída com dados dos últimos vinte anos. A DMD possui herança recessiva ligada ao X, com mutação no gene distrofina, cuja função é providenciar a estabilidade da membrana muscular. O PGT permite a seleção de gametas livres de patologias, possibilitando a gestação de uma criança saudável. Contudo, surgem questões éticas sobre o procedimento em diversas áreas da sociedade. Novas pesquisas permitirão a implementação de estratégias públicas para o PGT, proporcionando gravidezes saudáveis para casais de todas as classes sociais.

**Palavras-chave:** DMD; PGT; teste genético pré-implantacional, PGD, questões éticas PGT.

## **Duchenne muscular dystrophy and the pre-implantation genetic test**

### **Abstract**

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common progressive muscle disease in male children. As this is an incurable disease, counseling for preimplantation genetic testing (PGT) is extremely important. The objective of the study was to present the relevance of the PGT for the diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy, in addition to updating relevant information about the disease, through a narrative review of the literature, built with data from the last twenty years. DMD has an X-linked recessive inheritance, with a mutation in the dystrophin gene, whose function is to provide stability of the muscle membrane. The PGT allows the selection of pathology-free gametes, enabling the gestation of a healthy child. However, ethical questions about the procedure arise in several areas of society. New research will allow the implementation of public strategies for the PGT, providing healthy pregnancies for couples from all social classes.

**Key words:** DMD; PGT; pre-implantation genetic test; PGD; ethical issues PGT.

---

<sup>1</sup>Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – CEUB.

<sup>2</sup>Doutora em Patologia Molecular. Professora do Centro Universitário de Brasília – CEUB.

## 1 INTRODUÇÃO

A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a doença muscular progressiva mais comum observadas em crianças do sexo masculino. É uma patologia de caráter recessivo ligada ao cromossomo X causada por uma mutação no gene DMD. O gene distrofina é o maior gene humano identificado, contendo 79 éxons, que codificam várias isoformas de proteína como a distrofina, cuja a sua função é a ligação do citoesqueleto da fibra muscular com a lâmina basal subjacente. Qualquer alteração ou perda de distrofina força o excesso de cálcio na membrana celular, resultando em excesso de água na mitocôndria, portanto, o músculo do esqueleto afetado sofre distrofia, disfunção mitocondrial e necrose (BIANCO et al., 2017).

Patologicamente, a DMD é caracterizada pela degeneração progressiva rápida e necrose dos músculos proximais e pseudo-hipertrofia de panturrilha. A maioria dos pacientes com DMD mostra fraqueza muscular precoce na infância, os sintomas geralmente aparecem antes dos 5 anos de idade, já aos 12 muitos dependem de cadeira de rodas e nem chegam ao início da terceira década de vida devido a problemas cardíacos e respiratórios (GIADERT; FERNANDEZ; CLAUSTRES, 2009).

Atualmente, não há terapia eficaz disponível para a cura dessa patologia, onde seu tratamento é a base de corticoides e fisioterapias para melhorar a qualidade de vida do paciente. Por isso o fornecimento do aconselhamento genético para o diagnóstico pré-implantacional é de extrema importância para casais em risco de ter seus filhos acometidos pela doença ou filhas portadoras do gene mutado, reduzindo assim a incidência de DMD (DINH et al., 2019).

A tecnologia de reprodução humana assistida (RHA) consiste na seleção dos gametas de melhor qualidade e com o avanço das técnicas de biologia molecular em conjunto com a engenharia genética produz ferramentas necessárias para caracterização de diversas doenças genéticas e alterações cromossômicas (POMPEU; VERZELETTI, 2015).

Dentro do diagnóstico pré-implantacional temos o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD, do inglês, preimplantation genetic diagnosis), no qual usa essas técnicas para a detecção de doenças relacionadas a anormalidades cromossômicas, mutações gênicas para condições mendelianas na qual faz a identificação de embriões saudáveis, e o uso de marcadores genômicos para a avaliação confiável da qualidade embrionária de casais diagnosticados com desordens genéticas hereditária. O PGD deu origem ao screening genético pré-implantacional (PGS, do inglês screening genetic preimplantation), um procedimento que identifica embriões com aberrações cromossômicas de mulheres com idade avançada e em

casos de casais com cariótipo normal que sofreram abortos de repetição (PIZZATO et al., 2016).

Com o passar dos anos e dos avanços na tecnologia da reprodução humana, a nomenclatura do PGD não era mais adequada, assim mudando para o teste genético pré-implantacional (PGT). O PGT inclui três principais subcategorias: PGT para aneuploidias (PGT-A), PGT para distúrbios monogênicos (PGT-M) e PGT para rearranjos estruturais de cromossomos (PGT-SR). O PGT-A era anteriormente conhecido como PGS e o PGT-M anteriormente conhecido como PGD (FESAHATA; MONTAZERI; HOSEINI, 2020).

O teste genético pré-implantacional (PGT) é realizado em embriões obtidos pela técnica de fertilização in vitro (FIV) antes mesmo da sua implantação no útero, permitindo assim o diagnóstico de um grande número de doenças genéticas monogênicas. A feitura do PGT dá-se pela extração de uma ou mais células do embrião para biópsia feita por micromanipulação, com microscópio equipado e ferramentas específicas para essa finalidade. Existem três tipos de biópsias pré-implantacionais (BIANCO et al., 2017).

A biópsia do blastômero acontece durante o terceiro dia de desenvolvimento do embrião em cultura, quando esse apresenta de seis a oito células trofoblásticas. Já a dos corpúsculos polares extraídos do ovócito acontece antes da fertilização, portanto os corpúsculos não carregam as informações genéticas do espermatozoide e limitam a análise aos dados maternos. O terceiro tipo de biópsia acontece no 5º dia de desenvolvimento, em fase de blastocisto, quando o embrião já apresenta entre 32 e 64 células. A biópsia do blastocisto é a que apresenta as melhores taxas de sucesso para implantação, principalmente porque permite a análise de um maior número de células (MENDES; COSTA, 2010).

Os principais métodos da análise genética das biópsias embrionárias são a hibridização fluorescente in situ (FISH), uma nova técnica chamada comparative genomic hybridization (CGH) permite a análise de todo o genoma e para analisar uma alteração específica de um gene usa-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) (POMPEU; VERZELETTI, 2015).

O PGT é uma metodologia menos invasiva do que diversas técnicas de diagnóstico pré-natal conhecidas como a amniocentese e cordocentese. Com o crescimento da procura pelo diagnóstico pré-implantacional (DPI) e com as novas possibilidades proporcionadas por esta técnica surgem diversas questões quanto a suas aplicações e também quanto às implicações éticas envolvidas no seu uso (BIANCO et al., 2017).

No Brasil, não há legislação federal específica e o DPI é regulamentado pelas resoluções do Conselho Federal de Medicina, porém o uso do PGD para a escolha do sexo é proibido em muitos países, incluindo o Brasil. Contudo, tendo em vista o princípio da beneficência, quando

a escolha do sexo do bebê visa a contribuir para a saúde da criança por evitar patologias ligadas aos cromossomos sexuais, essa deverá ser permitida juridicamente e vista como benéfica. A técnica deve ser usada para o bem-estar do ser humano e limitada aos casos com indicação terapêutica (MENDES; COSTA, 2010).

A maioria das mutações identificadas desta patologia são deleções em aproximadamente 60-65% dos casos de DMD, duplicações têm sido observadas em 5%-15% e os casos remanescentes (cerca de 30%) podem ser causados por pequenas mutações tais como microdeleções, microinserções, mutação de ponto, ou mutações de splicing (mais raros). Por isso é importante enfatizar que para realização do diagnóstico genético pré-implantacional nos casos de doenças monogênicas como a DMD, é essencial conhecer a mutação, já que a análise genética é realizada em um pequeno número de células e que o gene da distrofina é o maior gene humano identificado, o PGD é específico para mutação daquela família. Portanto, se a família não tem o diagnóstico molecular, é necessário estudar previamente a mutação familiar por meio do aconselhamento genético (BIANCO et al., 2017).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo apresentar a relevância do teste genético pré-implantacional para o diagnóstico da Distrofia Muscular de Duchenne, além de elucidar sua fisiopatologia, componentes genéticos, diagnóstico e tratamento.

## **2 METODOLOGIA**

Trata-se de uma revisão bibliográfica do tipo narrativa que são publicações amplas, apropriadas para descrever e discutir o desenvolvimento ou o "estado da arte" de um determinado assunto, sob ponto de vista teórico ou contextual. Constitui basicamente de análise da literatura publicada em livros, artigos de revista impressas e/ou eletrônicas na interpretação e análise crítica pessoal do autor de forma qualitativa (ROTHER, 2007).

Foram utilizados artigos, relatos de casos, pesquisas, ensaios e dissertações obtidos por meio de pesquisas em bibliotecas virtuais como Science Direct, SCIELO, PubMed e Portal da Biblioteca Virtual Regional em Saúde (BVS). Foram utilizados para a busca as palavras chave: Distrofia muscular de Duchenne, teste genético pré-implantacional e PGT-M, utilizado o conector "AND/E", nos idiomas: inglês, espanhol e português.

O período de busca concentrou-se nos últimos 20 anos. Ao total, foram selecionados 35 artigos científicos, 1 trabalho de conclusão de curso de graduação e 4 páginas de sites institucionais disponíveis com texto completo na íntegra.

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 Histórico e epidemiologia

O neurologista francês Dr. Guillaume Benjamin Amand Duchenne, em 1861, definiu e descreveu casos de uma doença degenerativa que levou o seu nome, Distrofia Muscular de Duchenne, tendo realizado biópsias, entre outros procedimentos, para fundamentar sua investigação. Já o quadro clínico da doença, prognóstico e possibilidade de tratamento foram descritos apenas em 1879, por Willian R. Gowers. A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) tem um lugar especial na genética médica, uma vez que o gene da distrofina, responsável por esta doença, foi o primeiro a ser identificado por métodos de clonagem posicional há quase 30 anos. Para todos aqueles preocupados com distrofia muscular, isso era um evento importante que prometeu tanto a transformação de pesquisas sobre a patogênese da doença e a possibilidade de desenvolver um tratamento eficaz pela primeira vez (FONSECA; MACHADO; FERRAZ, 2007).

É a miopatia mais frequente e severa apresentada que acomete o sexo masculino, com sua incidência de 1:3600 - 6000 nascidos vivos (ABDIM, 2021). Por tratar-se de uma condição de herança genética recessiva ligada ao cromossomo X, homens são os mais afetados, entretanto raramente é reportada a ocorrência de mulheres sintomáticas, em casos de inativação do X ou outras anormalidades do cromossomo X. Porém a presença dos sintomas é de forma mais branda, com sua incidência de 1:50.000.000 nascidas vivas e aproximadamente 8% das mulheres portadoras da mutação apresentam fraqueza muscular (FREUND et al., 2017).

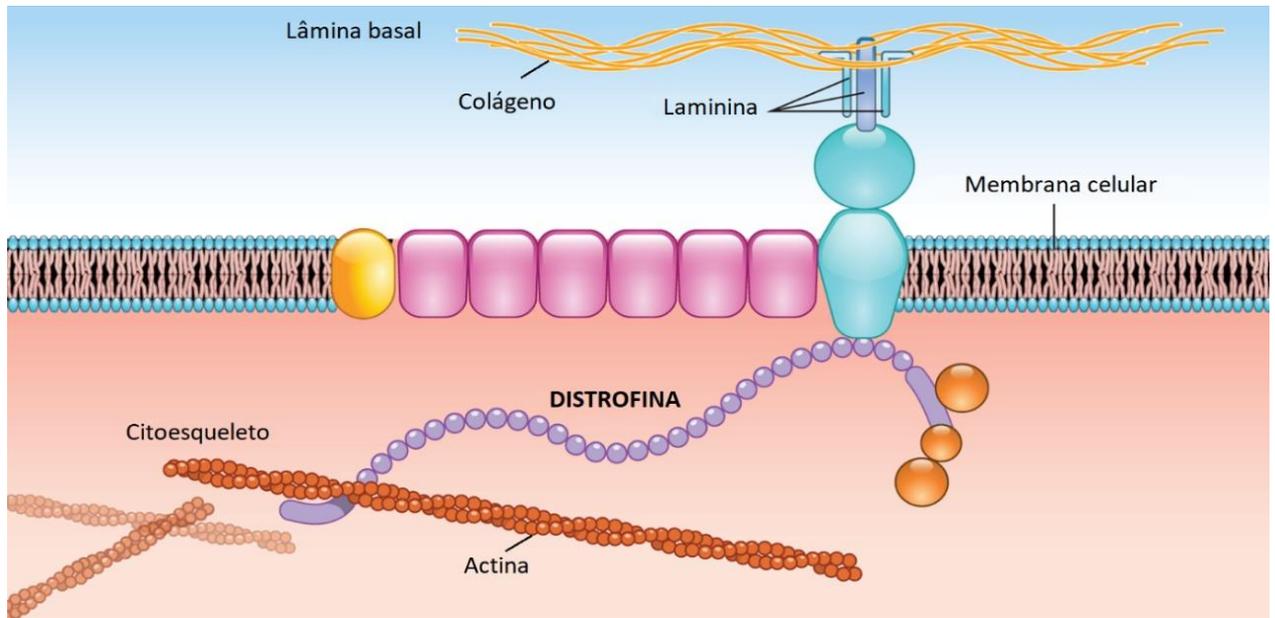
#### 3.2 Aspectos clínicos e fisiopatológicos

Patologicamente, a DMD é caracterizada pela degeneração progressiva rápida, necrose dos músculos proximais e pseudo-hipertrofia da panturrilha. Essa condição é causada por mutações no gene DMD que codificam várias isorformas de proteínas como a distrofina, cuja a sua função é a ligação do citoesqueleto da fibra muscular com a lâmina basal subjacente. Qualquer alteração ou perda de distrofina gera o influxo de cálcio na membrana celular, resultando em excesso de água na mitocôndria, portanto, o músculo afetado sofre distrofia, disfunção mitocondrial, fibrose e necrose (BIANCO et al., 2017).

A proteína distrofina, que está presente no sarcolema das fibras musculares esqueléticas, cardíacas e em pequenas quantidades no cérebro, é essencial na função contrátil e na proteção da fibra muscular em relação aos danos causados pela contração muscular (FORTES et al., 2018). Essa proteína é um componente essencial no complexo distrofina-glicoproteínas que

fazem a ligação do citoesqueleto de actina com a lâmina basal (figura 1), providenciando a estabilidade da membrana muscular (BABBS et al., 2021).

**Figura 1.** Complexo de proteínas associadas à distrofina. Representação esquemática mostrando a interação da distrofina com proteínas citoplasmáticas, transmembrana e extracelulares no músculo esquelético.



Fonte: Adaptado de RAVIDRAN, 2018.

O primeiro sinal da doença é a fraqueza muscular, que surge geralmente por volta dos 4 anos de idade e sua progressão é rápida. Normalmente é acompanhada com a perda da contração muscular da coxa e da pelve, começando com os clássicos sintomas da Distrofia Muscular de Duchenne, o sinal de Gower (figura 2). O sinal caracteriza-se pelo andar cambaleante e nas pontas dos pés. Por volta dos 13 anos, os pacientes já estão dependentes da cadeira de rodas e a fragilidade da membrana gera, gradativamente, a perda das miofibras e a substituição do tecido muscular por tecido adiposo e fibroso. Por fim, a DMD leva à morte precoce, por volta dos 20-30 anos, por disfunções cardiorrespiratórias (RUGOWSKA; STAROSTA; KONIECZNY, 2021).

A escoliose também está presente em praticamente todos os pacientes e se acentua após a perda da deambulação, contribuindo bastante para a redução da capacidade vital respiratória. As fraturas de ossos longos ocorrem geralmente devido à queda em 21-44% dos meninos. Além do atraso motor, observa-se também atraso da linguagem. O retardo mental é um aspecto bastante frequente entre meninos com DMD (30% dos casos). Além da disfunção cognitiva,

também se observa nessa doença maior frequência de comorbidades psiquiátricas, como transtorno do déficit de atenção e hiperatividade. As disfunções de neurodesenvolvimento observadas na distrofia são resultantes da ausência completa ou parcial da distrofina no sistema nervoso central, pois essa proteína também é encontrada nos terminais neuronais pós-sinápticos do córtex, hipocampo e cerebelo, áreas intensamente envolvidas com o raciocínio e aprendizado (NARDES; ARAÚJO; RIBEIRO, 2012).

**Figura 2.** Sinal de Gowers: paciente utiliza suas mãos para "escalar" seu próprio corpo a partir de uma posição agachada devido à falta de força muscular no quadril e coxas.



Fonte: PAPO, 2021.

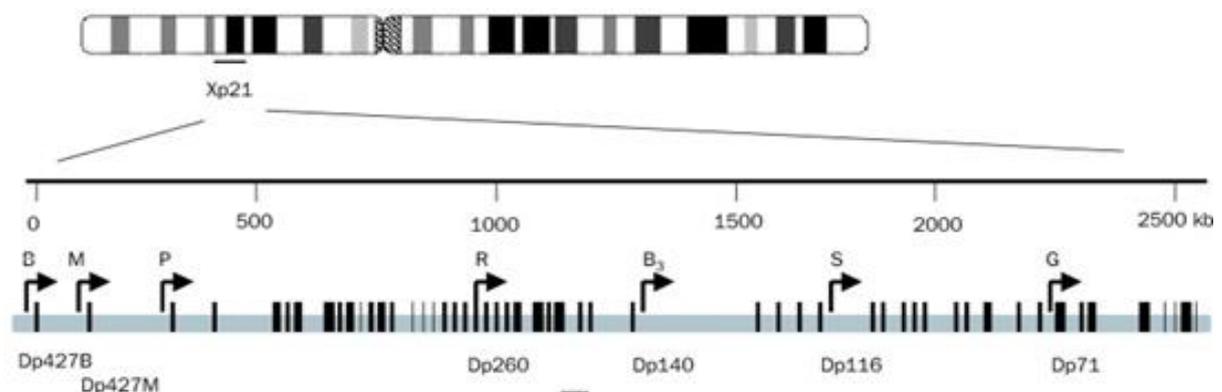
### 3.3 Genética

O gene DMD é o maior gene conhecido nos humanos, localizado no braço curto do cromossomo X, no *locus* Xp21 (figura 3), e consiste em 79 éxons espalhados por mais de 2,6 milhões de pares de bases de sequência genômica (MALMGREN et al., 2006). A maioria das mutações que os pacientes apresentam são deleções (aproximadamente 60-65%), duplicações (entre 5-14%) e pequenas mutações remanescentes como por exemplo as mutações pontuais, onde há inserção ou exclusão de um ou mais nucleotídeos. Nestes casos, as mais frequentes são

as mutações sem sentido (nonsense), as quais representam 10% dos pacientes (OSORIO et al., 2018).

Em razão do tamanho deste gene, ele é propenso a mais rearranjos e recombinações que podem causar várias mutações (REN et al., 2007). Isso explica o alto índice de mutações espontâneas, resultando na maior ocorrência de meninos com DMD sem histórico familiar prévio da doença (FALZARANO et al., 2015). Essas mutações levam à alteração da tradução da leitura do código genético, gerando precocemente um códon de parada, resultando na geração de uma proteína instável, não funcional, ou até mesmo a total ausência de produção da proteína distrofina (FREUND et al., 2017).

**Figura 3.** *Locus* Xp21 – Gene DMD está localizado no braço curto do cromossomo X.



Fonte: MUNTONI; TORELLI; FERLINI, 2003.

As características clínicas são variáveis porque a correlação genótipo-fenótipo geralmente segue a regra: mutações que interrompem a tradução do quadro de leitura causa ausência quase completa de proteína e levam ao fenótipo DMD grave, enquanto as mutações que mantêm o quadro de leitura permitem a produção de uma proteína mais curta e estão associados com um fenótipo mais suave (NERI et al., 2020).

Portadoras do sexo feminino geralmente são assintomáticas, mas algumas apresentam sintomas leves de doença muscular, 20% manifestam fraqueza muscular, e cerca de 10% podem desenvolver cardiomiopatia. Mães de meninos com Distrofia muscular de Duchenne e suas parentes de primeiro grau do sexo feminino devem sempre ser direcionadas ao aconselhamento genético (ANNEXSTAD; LUND-PETERSEN; RASMUSSEN, 2014). Se um indivíduo do sexo feminino é portador da mutação genética em um dos dois cromossomos, o segundo cromossomo X a "protege" devido à produção regular de distrofina, entretanto, podem ocorrer mulheres sintomáticas por alterações na inativação ou outras anormalidades do cromossomo X

(CRUZEIRO et al., 2020). Como a DMD é herdada de forma recessiva ligada ao cromossomo X, as portadoras do alelo mutado, do sexo feminino, têm 50% de chance de transmitir a mutação em sua prole. Os homens que herdam a mutação são afetados, enquanto as mulheres que herdam a mutação são portadoras (MALMGREN et al., 2006).

Outro aspecto importante é o mosaicismismo gonadal. Isto é, aproximadamente 10% das mães de casos isolados de DMD, nas quais não foi detectada mutação no sangue periférico, podem ser portadoras da mutação na linhagem germinativa. Estas mulheres têm um risco aumentado de vir a ter filhos afetados pela DMD (ZATZ, 2002).

### **3.4 Diagnóstico**

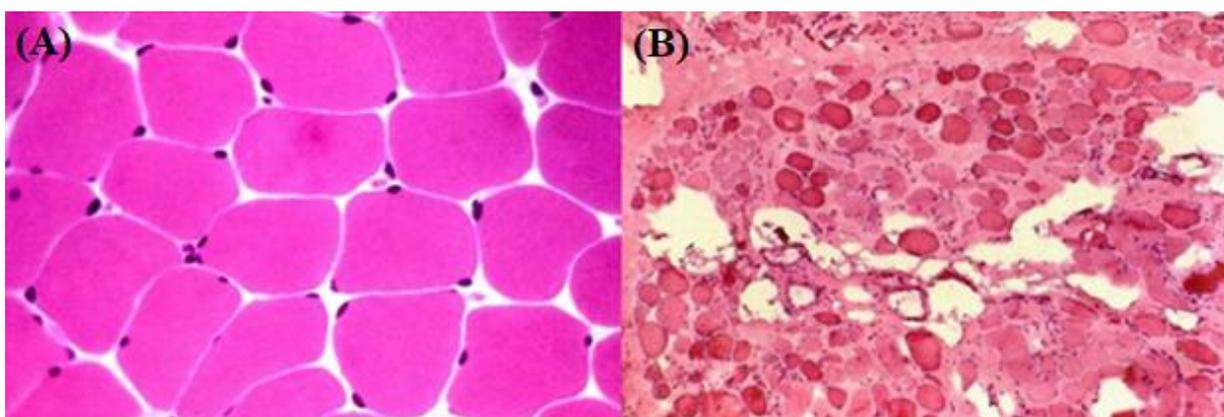
O diagnóstico da patologia deve ser o mais rápido possível e preciso para garantir um início precoce de intervenções no paciente. Apesar da clínica presente desde os primeiros anos de vida, com atraso de aquisição de marcha, quedas frequentes, dificuldade em subir e descer escadas, o diagnóstico é feito predominantemente na idade de 5 anos, quando os sintomas são mais evidentes (FORTES et al., 2018).

O diagnóstico pode ser estabelecido, na maioria dos casos, a partir da história familiar, de achados clínicos, laboratoriais e genéticos, podendo ser utilizados eventualmente exames eletrofisiológicos ou histológicos. Atualmente, os níveis de enzimas musculares esqueléticas, principalmente de CK (creatinoquinase), biópsia muscular e análise de DNA são amplamente empregados no diagnóstico e na caracterização da DMD. Outras investigações, como a histoquímica muscular, estudos de inervação muscular, microscopia eletrônica, eletrocardiografia e tomografia computadorizada podem fornecer informações adicionais para uma melhor compreensão sobre a evolução da DMD, bem como no auxílio do diagnóstico diferencial (FONSECA; MACHADO; FERRAZ, 2007).

Devido às anormalidades estruturais e funcionais da membrana celular muscular, ocorre uma elevação das enzimas musculares séricas, tais como a CK. Os níveis séricos de CK são marcadamente elevados na DMD e são pelo menos 10–20 vezes (frequentemente 50–200 vezes) o limite superior do normal antes dos 5 anos. O teste genético molecular constitui a base do diagnóstico. Deleções e duplicações podem ser detectadas por amplificadores de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA) ou microarray cromossômico de alta resolução. Mutações pontuais, pequenas exclusões e pequenas duplicações ou inserções, podem ser identificados usando o sequenciamento de próxima geração ou SNPS (YIU; KONBERG, 2015).

A biópsia muscular pode, em caso de dúvida, ainda fornecer importantes informações adicionais sobre o grau de deficiência da distrofina (ANNEXSTAD; LUND-PETERSEN; RASMUSSEN, 2014). O estudo de microscopia de luz mostra um padrão distrófico com desestruturação da arquitetura fascicular do músculo, necrose e degeneração das fibras musculares, e aumento do tecido adiposo-conjuntivo. Por técnica de imunohistoquímica (figura 4) verifica a deficiência de distrofina (OSORIO et al., 2018).

**Figura 4.** Imunohistoquímica na DMD. (A) tecido normal das fibras musculares. (B) presença de fibrose, adipócitos, degeneração e irregularidade no diâmetro das fibras musculares.



Fonte: Adaptado de UNICAMP, 2021.

### 3.5 Tratamento

Ainda não há cura para a DMD. Existem alguns tratamentos que podem amenizar os sintomas, melhorando a qualidade de vida, diminuindo a alta morbidade e o óbito precoce desses pacientes (FONSECA; MACHADO; FERRAZ, 2007). O tratamento abrangente é sintomático e especialmente voltado para a prevenção de complicações da doença precoce (escoliose, retrações assimétricas, insuficiência cardíaca e respiratória) (ORTEZ et al., 2019).

Os padrões de tratamentos de glicocorticoides orais, controle cardíaco, controle pulmonar, vacinações, fisioterapia e cuidados ortopédicos, controle nutricional e saúde óssea são frequentemente destacados (SHIEH, 2018). No momento, os corticosteroides são os únicos agentes farmacológicos com documentação de benefícios, mesmo que estejam associados a vários efeitos adversos (ganho de peso, distúrbios do sistema nervoso, sintomas gastrointestinais, distúrbios metabólicos, osteoporose com aumento risco de fraturas vertebrais) (FALZARANO et al., 2015).

Com o avançar da doença na infância e os sinais e sintomas clássicos vão progressivamente aumentando, nesta fase, é necessária a cooperação com fisioterapeutas, mas

também com um psicólogo que irá preparar a criança para a perda de mobilidade. O manejo de meninos com DMD é multidisciplinar e gira em torno de gestão sintomática e reabilitadora, vigilância e tratamento de complicações esperadas (YIU; KONBERG, 2015).

O objetivo do cuidado nutricional é prevenir o excesso de peso ou obesidade, e desnutrição por meio da avaliação regular do crescimento e peso dos pacientes ao decorrer de suas vidas. Visa promover uma alimentação saudável e equilibrada, com ingestão ideal de calorias, proteínas, fluidos e micronutrientes, especialmente cálcio e vitamina D (BIRNKRANT et al., 2018).

O desenvolvimento da terapia gênica para DMD tem sido dificultado pelo grande tamanho do gene e volume de músculos do corpo humano. Com os avanços recentes nos novos tratamentos modificadores da doença, a terapia gênica parece ser cada vez mais viável. A abordagem de *éxon skipping* e a abordagem de supressão de prematuros códons de parada são terapias genéticas promissoras. O *éxon skipping* usa oligonucleotídeos antisense (AONs) para induzir salto de éxons mutantes do RNA pré-mensageiro (mRNA) na transcrição de distrofina, que restaura a leitura interrompida do quadro e produz uma forma abreviada da proteína distrofina. Os alvos atuais mais utilizados incluem os éxons 44, 45, 51 e 53. A supressão de códons prematuros é realizada por meio de uma droga oralmente biodisponível que foi projetada para fazer sua ligação a subunidades de RNA ribossômico, interferindo no reconhecimento de códons de parada prematuros, isso permite a tradução e produção de uma proteína distrofina modificada (MESSINA; VITA, 2018).

Por ser uma doença sem cura, o fornecimento do aconselhamento genético para o diagnóstico pré-implantacional é de extrema importância para casais em risco de ter seus filhos acometidos pela doença ou filhas portadoras do gene mutado, reduzindo assim a incidência da DMD (DINH et al., 2019). O Teste genético pré-implantação (PGT) oferece uma alternativa ao diagnóstico pré-natal para evitar a interrupção de gravidezes afetadas e oferece uma oportunidade para a obtenção de uma criança saudável (REN et al., 2007).

### **3.6 Teste genético pré-implantacional (PGT)**

Teste genético pré-implantacional, anteriormente denominado como diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), envolve o uso de tecnologias de reprodução assistida (ART) para o diagnóstico genético de embriões, permitindo o nascimento de crianças saudáveis em famílias com alto risco de transmitir doenças hereditárias para a prole, além de evitar a interrupção da gravidez em caso de feto afetado ou o nascimento de uma criança afetada. As principais indicações para o teste genético pré-implantacional são aberrações monogênicas

específicas e relacionadas ao sexo, distúrbios e desequilíbrios cromossômicos estruturais, bem como rastreio de aneuploidias (FELDMAN et al., 2020).

O primeiro procedimento de diagnóstico genético pré-implantacional realizado com sucesso foi reportado em 1990, sendo utilizado para evitar o nascimento de crianças com doença ligada ao X e, atualmente, é realizado em diversas clínicas pelo mundo. O primeiro relatório sobre crianças nascidas após PGT foi publicado pela Handyside e colaboradores, em 1990, descrevendo o uso de amplificação por PCR para a detecção de sequências Y repetitivas para determinação de gênero em famílias com doenças ligadas ao X (MENDES; COSTA, 2013).

Familiarizar-se com os novos termos é essencial para os especialistas e pacientes envolvidos na área de infertilidade e medicina reprodutiva. O PGT inclui três subcategorias: PGT para aneuploidias (PGT-A), PGT para distúrbios de gene único/monogênicos (PGT-M) e PGT para rearranjos estruturais de cromossomos (PGT-SR). O PGT-A é utilizado para detectar aneuploidias e, anteriormente, era conhecido como PGS. O PGT-M, anteriormente conhecido como PGD, destina-se aos defeitos monogênicos (FESAHATA; MONTAZERI; HOSEINI, 2020).

O teste genético pré-implantacional é uma técnica derivada dos procedimentos de reprodução humana assistida (RHA), que consiste na seleção dos gametas de melhor qualidade para implantação. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, em conjunto com a engenharia genética, o teste produz ferramentas necessárias para a caracterização de diversas doenças genéticas e alterações cromossômicas. O PGT envolve a biópsia de uma única ou algumas células de embriões fertilizados *in vitro* e testes das amostras biopsiadas (POMPEU; VERZELETTI, 2015).

A sociedade internacional de diagnóstico genético pré-implantacional (PGDIS) indica o PGT-M para as seguintes condições: 1) Os portadores de distúrbios mendelianos; 2) tipagem HLA para encontrar célula-tronco compatível ao irmão mais velho que requer terapia com célula-tronco; 3) Os portadores de anormalidades cromossômicas estruturais e diferentes translocações para aumentar a chance de ter uma gravidez não afetada em casais portadores; 4) RPL (aborto de repetições) com etiologia inexplicada (RPL idiopática) com o objetivo de reduzir as complicações e efeitos colaterais causados por abortos repetidos (FESAHATA; MONTAZERI; HOSEINI, 2020).

As técnicas de biópsia usadas em fertilização *in vitro* (FIV) visam a obter material para a feitura de testes genéticos pré-implantacionais. Para tanto, podem ser usados oócitos ou embriões humanos, os quais terão sua composição genética avaliada a fim de escolher um embrião ou oócito cromossomicamente normal. A biópsia do embrião humano deve ser

considerada como o equilíbrio entre a retirada de células para uma análise genética segura e eficiente somada à preservação do potencial de implantação do embrião. Uma das questões de grande interesse nos centros de RHA é qual o melhor momento de fazer a biópsia embrionária. Outro aspecto de grande relevância é a alta taxa de mosaicismo cromossômico, que pode causar um aumento de resultados falso-positivos e falso-negativos, sendo fundamental, a importância do conhecimento das características das amostras para que as análises sejam feitas adequadamente (AQUINO; MARTINHAGO; MARTINHAGO, 2013).

O procedimento de biópsia envolve a abertura da zona pelúcida (ZP), matriz glicoproteica que envolve os oócitos e, posteriormente, os embriões, para em seguida, proceder com a aspiração do material celular para análise genética. A abertura da ZP pode ser executada de três maneiras: mecanicamente (dissecção parcial da zona ou corte de zona), quimicamente, com o auxílio de uma solução ácida de Tyrode, ou com laser diodo infravermelho. O material genético pode ser obtido em diferentes estágios embrionários, no primeiro dia de desenvolvimento após a fertilização é possível retirar os corpos polares (CPs). A biópsia pode também ser feita no terceiro dia de desenvolvimentos para obtenção de um ou dois blastômeros. Outro momento em que pode ser feita a remoção das células embrionárias é durante o quinto dia de cultivo e a análise é feita a partir de algumas células da trofotoderma de blastocistos (figura 5) (PIZZATO et al., 2017).

**Figura 5.** Biópsia embrionária do trofotoderma do blastocisto. Os embriões são submetidos ao Assisted Hatching (pequeno orifício na zona pelúcida realizado com laser), onde parte das células trofodérmicas são aspiradas e enviadas para análise cromossômica.



Fonte: CASTELLOTTI, 2020.

As desvantagens da biópsia de corpo polares são que apenas as aneuploidias maternas podem ser identificadas, portanto, não pode ser aplicado se o parceiro for portador de uma anomalia cromossômica. Por outro lado, um benefício é o fato de pode ser realizada logo após a retirada do oócito. Os resultados podem ser disponíveis dentro de dois dias, e a transferência de embriões frescos pode ser aplicada (SCIORIO; TRAMONTANO; CATT, 2019). A biópsia do blastômero acontece durante o terceiro dia de desenvolvimento do embrião em cultura, quando esse apresenta de seis a oito células trofoblásticas. O terceiro tipo de biópsia acontece no 5º dia de desenvolvimento, em fase de blastocisto (biópsias de células do trofotoderma), quando o embrião já apresenta entre 32 e 64 células. A biópsia do blastocisto é a que apresenta as melhores taxas de sucesso para implantação, principalmente porque permite a análise de um maior número de células (MENDES; COSTA, 2013).

Após a realização da biópsia embrionária, os embriões são criopreservados até o resultado da análise genética. Mais e mais centros que executam o PGT realizam uma transferência de embriões única, uma política que pode ser vinculada a mecanismos de ressarcimento e legislação. A substituição do congelamento lento por vitrificação, vem sendo adotado pelas diversas clínicas de reprodução. A técnica mais recomendada, atualmente, para a criopreservação de embriões é a vitrificação, pelo fato desta técnica não produzir cristais de gelo no momento da solidificação dos embriões no ultra-resfriamento em nitrogênio líquido, demonstrando-se ser superior ao congelamento lento em termos de taxa de sobrevivência para embriões e blastocistos em estágio de clivagem (RYCKE; BERCKMOES, 2020).

### **3.7 Técnicas de análise genética embrionária**

As famílias que são portadoras de doenças hereditárias têm como o objetivo eliminar mutações genéticas, identificando os embriões saudáveis antes da gestação, conseqüentemente protegendo os descendentes. Assim como também há famílias no intuito de prevenir os riscos de alterações cromossômicas identificando os embriões euploides, reduzindo as taxas de falhas de implantação, abortamento de repetições e nascimentos de bebês com anomalias cromossômicas. O PGT-A (antigo PGS), testa embriões apenas para encontrar anormalidades numéricas, examinando então todos os 46 cromossomos. O PGT-A pode ser realizado pelas técnicas de FISH, NGS e aCGH, que permitem uma maior análise cromossômica do DNA (FESAHATA; MONTAZERI; HOSEINI, 2020).

Os padrões de herança de doenças hereditárias monogênicas incluem: autossômica dominante, autossômica recessiva, dominante ligada ao X, recessivo ligado ao X e mitocondrial hereditário. O pré-requisito de um PGT-M viável é claramente ter delineado os alelos mutantes

de certas doenças hereditárias do casal que está em busca do FIV. Entretanto, os tipos de mutação, bem como a estrutura genômica de cada gene são diferentes e, portanto, a genotipagem adotada no PGT-M deve ser individualizado e personalizado, se desejarmos detecção de mutação (CHEN et al., 2017). Houveram avanços significativos na tecnologia usada para análise genética e cromossômica usando pequenas quantidades de DNA, incluindo reação em cadeia da polimerase (PCR), Multiplex PCR, hibridização fluorescente in situ (FISH), simples microarranjos de polimorfismo de nucleotídeos (SNP), comparativos hibridização genômica (aCGH), e nova geração sequencing (NGS) (SULLIVAN-PYKE; DOKRAS, 2018).

Em doenças monogênicas, PGT-M é usado para detectar variações patogênicas específicas na sequência do gene associado com certos fenótipos. Antes de realizar o teste, o padrão de herança da variação genética em questão deve ser definido, por isso a importância do aconselhamento genético, para assim se detectar as mutações familiares parentais para se ter um diagnóstico preciso. As análises genéticas mais utilizadas no PGT-M são: PCR, Multiplex PCR, SNP e FISH (RODRIGUES et al., 2020).

A PCR foi considerada a técnica mais importante dos laboratórios moleculares modernos pelo fato de amplificar pequenas quantidades de DNA ao grau de poderem ser visualizados e submetidos a análise genética. Entretanto, o uso dessa técnica em célula única, devido à pouca quantidade de DNA contido na célula proveniente da biópsia, tem se mostrado desafiadora. Os problemas frequentemente encontrados são o aumento de contaminação e *allele dropout* (ADO). Com a finalidade de reduzir as taxas de *allele dropout*, Ray e Handyside (1996) sugeriram aumentar a temperatura de desnaturação nos primeiros ciclos da PCR. Além disso, estudos têm demonstrado que a amplificação simultânea de um ou mais marcadores polimórficos, localizados no mesmo cromossomo e perto do gene causador da doença em estudo, pode assegurar uma análise sem ADO. Essa metodologia é denominada multiplex PCR e também usada para melhorar a detecção de mutação características de doenças monogênicas (PIZZATO et al., 2017).

A hibridização fluorescente in situ (FISH) é um dos métodos usados na análise das células e detecta de 81% a 87% dos embriões anormais. Permite a análise de cinco a 12 dos 23 pares cromossômicos (22 pares de cromossomos autossomos denominados com números de 1 a 22 e o par sexual X e Y). O princípio da técnica de FISH permite identificar uma sequência alvo de DNA por meio do uso de uma sonda de DNA específica. Essa é uma sequência complementar ao alvo, marcado com fluorocromo. O que ocorre é a hibridização da sonda com

o DNA do material, que será analisado em microscópio fluorescente (POMPEU; VERZELETTI, 2015).

Os SNP são matrizes de alta densidade contendo até vários milhões de sondas, que permitem genotipagem de centenas de milhares de SNPs (polimorfismo) selecionados em todos os cromossomos em uma única reação. É uma tecnologia que utiliza amostras de DNA dos pais biológicos, que são usadas como referência para testar, interpretar e comparar as amostras e aumentar a precisão dos resultados, detectando os polimorfismos (pequenas variações de locais específicos do DNA) no embrião estudado. O PCR multiplex e SNP possuem o mesmo princípio de teste baseado em ligação para PGT-M, mas o fluxo de trabalho do SNP é muito mais padronizado e uniforme, sem a necessidade de uma avaliação pré-clínica específica do locus familiar (RYCKE; BERCKMOES, 2020).

### **3.8 Associação entre o PGT-M e a distrofia muscular de Duchenne**

A maioria dos pacientes com DMD mostra fraqueza muscular precoce na infância, e tornam-se cadeirantes por volta dos 12 anos de idade, e morrem devido à insuficiência respiratória ou cardíaca no fim da adolescência ou início dos 20 anos. A importância de prevenção da DMD tem sido extensivamente enfatizada, uma vez que não há terapia curativa disponível. Portanto, é essencial o diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético para reduzir o nascimento de meninos afetados com a doença (BIANCO et al., 2017).

O teste genético pré-implantacional monogênico (PGT-M) para portadoras do sexo feminino com DMD oferece uma alternativa ao diagnóstico pré-natal para evitar a interrupção de gravidezes afetadas e oferece uma oportunidade para a obtenção de crianças saudáveis. Mas, continua difícil devido ao enorme tamanho do gene, heterogeneidade mutacional, alta taxa de recombinação intragênica e alta frequência de mutações de novo. Sendo assim, ainda não existe um protocolo de PGT-M universal para DMD, conseqüentemente estes protocolos são projetados para a mutação específica familiar, que permitirá a transferência de embriões saudáveis para o útero materno. A sexagem de embriões já foi descrita anteriormente, no entanto, com uma estratégia de seleção "apenas por gênero", todos os embriões machos serão descartados, e os embriões femininos são transferidos independentemente se é portadora da mutação ou não (REN et al., 2007).

A maioria das mutações são deleções parciais (50-60%) ou duplicações parciais ( $0 \pm 14\%$ ). As deleções parciais são detectadas pela PCR com primers construídos para amplificar os éxons do gene com tendência à deleção. Beggs e colaboradores descreveram sequências de primers de oligonucleotídeo que podem ser usados para amplificar 8 éxons, mais o promotor muscular

do gene da distrofina em um único PCR multiplex, que são capazes de detectar 98% das deleções parciais. As duplicações podem ser detectadas por análise de FISH ou PCR. Essas deleções e duplicações podem ocorrer em qualquer parte do gene, mas estão concentradas entre exons 45-55 e exons 2-10 para deleções e duplicações, respectivamente (AARTSMA-RUS; GINJAAR; BUSHBY, 2016).

A estratégia de PCR pode ser explorada realizando o ensaio quantitativamente para permitir a detecção de duplicação em homens, observando uma proporção de 2:1 na quantidade de produto de PCR gerado a partir de um *locus* duplicado em comparação com o de um *locus* normal. Por causa do tamanho grande do gene DMD, as pequenas mutações são mais difíceis de identificar e requerem abordagens especiais. Pelo menos 15 pequenas mutações no gene da distrofina foram descobertos: dez casos de mutação sem sentido, 3 casos de deleção de base única, um caso de inserção de base, e um caso de mutação de troca de sentido (missense) (HASHIBA et al., 2004).

### 3.9 Questões éticas

Com o crescimento pela procura do PGT e, com as novas possibilidades proporcionadas por esta técnica, surgem diversas questões envolvidas às suas diferentes possibilidades de aplicações, que dão margem à discussão de um grande número de questões éticas pelos mais variados setores da sociedade. A regulamentação do PGT varia em nível mundial devido as diferentes posturas de cada país frente aos procedimentos de RHA, procedimentos invasivos e seleção de embriões (MENDES; COSTA, 2013).

O Conselho Federal de Medicina regulamentou a Resolução CFM nº 2.283/2020, que adota as normas éticas para a utilização das técnicas de reprodução assistida – sempre em defesa do aperfeiçoamento das práticas e da observância aos princípios éticos e bioéticos que ajudarão a trazer maior segurança e eficácia a tratamentos e procedimentos médicos. As técnicas de RA não podem ser aplicadas com a intenção de selecionar o sexo (presença ou ausência de cromossomo Y) ou qualquer outra característica biológica do futuro filho, que não seja de finalidade médica. As técnicas de RA podem ser aplicadas à seleção de embriões submetidos a diagnóstico de alterações genéticas causadoras de doenças - podendo nesses casos ser doados para pesquisa ou descartados, conforme a decisão do(s) paciente(s) devidamente documentada em consentimento informado livre e esclarecido específico. E as técnicas de RA também podem ser utilizadas para tipagem do sistema HLA do embrião, no intuito de selecionar embriões HLA compatíveis com algum irmão já afetado pela doença e cujo tratamento efetivo

seja o transplante de células-tronco, de acordo com a legislação vigente (CFM - Conselho Federal de Medicina, 2020).

O uso do PGT para a escolha do sexo é proibido em muitos países, incluindo o Brasil. Contudo, tendo em vista o princípio da beneficência, quando a escolha do sexo do bebê visa a contribuir para a saúde da criança por evitar patologias ligadas aos cromossomos sexuais, essa deverá ser permitida juridicamente e vista como benéfica. A técnica deve ser usada para o bem-estar do ser humano e limitada aos casos com indicação terapêutica. Concluindo assim que PGT respeita a visão e os valores da sociedade que considera a saúde como um de seus maiores bens (POMPEU; VERZELETTI; 2015).

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A Distrofia muscular de Duchenne é uma patologia incurável e muito debilitante, onde os pacientes presenciam a degeneração progressiva de suas fibras musculares, perdendo aos poucos a força dos movimentos, onde aos 12 anos a maioria dos portadores já se encontra em cadeiras de rodas. Por se tratar de uma doença sem cura, o tratamento da DMD é paliativo, tendo como principal objetivo, a manutenção da qualidade de vida do paciente. Porém, é frequente que o paciente venha a falecer precocemente, até a terceira década de vida, em razão de problemas cardiorrespiratórios decorrentes do desenvolvimento da doença.

Uma das formas de se prevenir o aumento da incidência e prevalência da DMD é realizar o diagnóstico de forma mais precoce possível, e isso foi possibilitado pelo teste genético pré-implantacional, caracterizado por ser uma nova ferramenta da reprodução humana assistida, na qual pode ser realizado o diagnóstico de doenças cromossômicas, gênicas e aberrações em embriões, antes mesmo de serem implantados no útero materno. Essa nova técnica de diagnóstico precoce possibilita casais em risco de ter filhos acometidos pela DMD, uma nova possibilidade e esperança de filhos saudáveis, livres da doença. Além de permitir a seleção de embriões não portadores da mutação, livrando assim a hereditariedade do alelo mutado para todos os outros descendentes da família.

Vê-se necessário a realização de mais pesquisas sobre as técnicas do PGT para se ter um procedimento mais seguro e eficaz, que proporcione mais confiabilidade dos casais com seus respectivos profissionais da saúde, e técnicas que visam a melhor qualidade embrionária tanto para o embrião que vai ser gestado, quanto para os outros embriões que ficarão no congelamento. É necessário reconhecer que o PGT deve respeitar questões e valores éticos, tendo em vista que se trata de uma ferramenta que valoriza a saúde do ser humano.

Recomenda-se a implementação de estratégias públicas sobre o PGT, visando o diagnóstico precoce de diversas doenças, proporcionando gravidezes saudáveis para casais de todas as classes sociais, permitindo assim, um controle eficaz do aparecimento de doenças debilitantes e sem cura.

## REFERÊNCIAS

AARTSMA-RUS, A.; GINJAAR, L. B.; BUSHBY, K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. **Medicine genetic**, Reino Unido, v.53, p.145–151, jan. 2016. DOI:10.1136/jmedgenet-2015-103387.

ABDIM (Associação brasileira de distrofia muscular). Distrofia muscular de Duchenne, 2021.

ANNEXSTAD, E. J.; LUND-PETERSEN, I.; RAUSMUSSEN, M. Duchenne muscular dystrophy. **Tidsskr Nor Laegeforen**, v.134, n.14, p.1361-1364, ago. 2014. DOI:10.4045/tidsskr.13.0836.

AQUINO, A. C.; MARTINHAGO, A. C. N.; MARTINHAGO, C. D. Biópsia embrionária: qual a melhor escolha? **Reprodução e climatério**, São Paulo, v.28, n.3, p.122-129, jul, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.recli.2014.06.001>.

BABBS, A. et al. From diagnosis to therapy in Duchenne muscular dystrophy. **Biochemical Society Transactions**, Portland, v. 48, n.3, p.813–821, jun. 2020. DOI: 10.1042/BST20190282.

BIANCO, B. et al. Diagnóstico genético pré-implantacional associado à distrofia muscular de Duchenne. **Einstein**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 489-491, dez. 2017. DOI: 10.1590/S1679-45082017RC3994.

BIRNKRANT, D. J. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. **Lancet Neurology**, v.17, n.3, p.251-267, mar. 2018. DOI: doi:10.1016/S1474-4422(18)30024-3.

CASTELLOTTI, D. S. **Biópsia embrionária**, 2021. Disponível em: <https://castellotti.com.br/screening-pre-implantacional-pgs-assista-o-video-da-biopsia-embrionaria/>. Acesso em: 02 jul 2021.

CFM- Conselho Federal de Medicina, Ética médica - Procedimentos de Reprodução Humana, 2021.

CHEN, H. et al. Preimplantation genetic diagnosis and screening: Current status and future Challenges. **Journal of the Formosan Medical Association**, Taiwan, v.117, n.2, p.94-100, fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.08.006>.

CRUZEIRO, M. M.; VALE, T. C.; MARRONE, C. D. Symptomatic female carriers of mutations in the Duchenne muscular dystrophy gene. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 78, n. 9, p. 598-599, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0004-282x20200061>.

DIHN, L. T. et al. Assessment of 6 STR loci for prenatal diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, Taiwan, v.58, n.5, set. 2019, p.645-649, mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2019.07.011>.

FALZARANO, M. S. et al. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. **Molecules**, v.20, n.10, p.18168-18184, out. 2015. DOI: 10.3390/molecules201018168.

FELDMAN, B. et al. Obstetric and Perinatal Outcomes in Pregnancies Conceived After Preimplantation Genetic Testing for Monogenetic Diseases. **Obstetrics & Gynecology**, v.136, n.4, p.782-791, out. 2020. DOI:10.1097/AOG.0000000000004062.

FESAHATA, F.; MONTAZERI, F.; HOSEINIC, S. M. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, Iran, v.136, n.4, p.782-791, out. 2020. DOI: 10.1097/AOG.0000000000004062.

FONSECA, J. G.; MACHADO, M. J. F.; FERRAZ, C. L. M. S.; Distrofia muscular de Duchenne: complicações respiratórias e seu tratamento. **Revista de Ciência Médica**, Campinas, v.16, n.2, p.109-120, abr. 2007. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-489557>. Acesso em: 10 maio 2021.

FORTES, C. P. D. D.; KOLLER, 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, jun. 2018. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-907004>. Acesso em: 10 maio 2021.

FREUND, A. A. et al. Duchenne and Becker muscular dystrophy: a molecular and immunohistochemical approach. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.65, n.1, p.73-76, mar. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2007000100016>.

GIRARDET, A. et al. Rapid and powerful decaplex and dodecaplex PGD protocols for Duchenne muscular dystrophy. **Reproductive BioMedicine Online**, Reino unido UK, v.19, n.6, p.830-837, dez. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.09.023>.

HASHIBA, T. et al. Preimplantation Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal Mammalian Ova Research**, Tokyo, v.21, p.7-12, fev. 2004. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmor/21/1/21\\_1\\_7/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmor/21/1/21_1_7/_pdf). Acesso em: 10 maio 2021.

NARDES, F.; ARAÚJO, A. P. Q. C.; RIBEIRO, M. G. O retardo mental na distrofia muscular de Duchenne. **Jornal de pediatria**, Rio de Janeiro, v.88, n.1, p.6-16, ago. 2012. DOI: 10.2223/JPED.2148.

MALMGREN, H. et al. PGD for dystrophin gene deletions using fluorescence in situ hybridization. **Molecular Human Reproduction**, v.12, n.5 p.353-356, abr. 2006. DOI: 10.1093/molehr/gal039.

MENDES, M. C.; COSTA, A. P. P. Diagnóstico genético pré-implantacional: prevenção, tratamento de doenças genéticas e aspectos ético-legais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.12, n.3, p.374-379, dez. 2013. Disponível em: [https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/23102/1/17\\_v.12\\_3.pdf](https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/23102/1/17_v.12_3.pdf). Acesso em: 10 maio 2021.

MESSINA, S.; VITA, G. L. Clinical management of Duchenne muscular dystrophy: the state of the art. **Neurological Sciences**, Itália, v.39, n.11, p.1837-1845, nov. 2018. DOI: 10.1007/s10072-018-3555-3.

MUNTONI, F; TORELLI, S; FERLINI, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. **The lancet neurology**, Reino Unido, v.2, n.12, p.731-740, dez. 2003. DOI: 10.1016/S1474-4422(03)00585-4.

NERI, M. et al. The Genetic Landscape of Dystrophin Mutations in Italy: A Nationwide Study. Itália, v.11, n.131, mar. 2020. DOI: 10.3389/fgene.2020.00131.

ORTEZ, C. et al. Avances em el tratamiento de la distrofia de Duchene, **MEDICINA**, Buenos aires, v.79, n.3, p.77-81, set. 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1040555>. Acesso em: 10 maio 2021.

OSORIO, A. N. et al. Consenso para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente con distrofia muscular de Duchenne. **Neurología**, Espanha, v.34, n.7, p.469-481, setembro. 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-186349>. Acesso em: 10 maio 2021.

PAPO. **Distrofia Muscular de Duchenne – Neurologia**, 2021. Disponível em: <http://papodefisioterapeutaa.blogspot.com/2016/01/distrofia-muscular-de-duchenne.html> Acesso em: 02 jul. 2021.

PIZZATO, B. et al. Revisão das técnicas de biologia molecular aplicadas no diagnóstico genético pré-implantacional e uma reflexão ética. **Reprodução & Climatério**, Curitiba, v.32, n.1, p.7-14, nov. 2016. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-882430>. Acesso em: 10 maio 2021.

POMPEU, T; VERZELETTI, F. Diagnóstico genético pré-implantacional e sua aplicação na reprodução humana assistida. **Reprodução & Climatério**, Curitiba, v.30, n.2, p.83-89, out. 2015. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-973029>. Acesso em: 10 maio 2021.

RAVINDRAN, S. **Gene Editing Could One Day Treat Muscle Disorders**, 2021. Disponível em: <https://www.the-scientist.com/features/gene-editing-could-one-day-treat-muscle-disorders-64707>. Acesso em: 28 jun. 2021.

REN, Z. et al. Mutation and haplotype analysis for Duchenne muscular dystrophy by single cell multiple displacement amplification. **Molecular Human Reproduction**, v.13, n.6, p.431-436, abr. 2007. DOI:10.1093/molehr/gam020.

RODRIGUES, V. O. et al. Genetics in human reproduction. **JBRA Assist Reproduction**, Minas Gerais, v.24, n.4, p.480-491, out. 2020. DOI: 10.5935/1518-0557.20200007.

ROTHER, E. T. Revisão Sistemática X Revisão Narrativa. **Acta paulista de enfermagem**, São Paulo, v.20, n.2, p.v-vi, jun. 2007. DOI: 10.1590/S0103-21002007000200001.

RUGOWSKA, A.; STAROSTA, A.; KONIECZNY, P. Epigenetic modifications in muscle regeneration and progression of Duchenne muscular dystrophy. **Clinical epigenetic**, v.13, n.13, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01001-z>.

RYCKE, M.; BERCKMOES, V. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. **GENES**, Bélgica, v.11, n.8, p.871, jul. 2020. DOI:10.3390/genes11080871.

SCIORIO, R.; TRAMONTANO, L.; CATT, J. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. **Gynecological Endocrinology**, Reino Unido, v.36, n.1, p.6-11, jan. 2020. DOI: 10.1080/09513590.2019.1641194.

SHIEH, P. B. Emerging Strategies in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. **Neurotherapeutics**, Los Angeles, v.15, n.4, p.840-848, out. 2018. DOI: [doi:10.1007/s13311-018-00687-z](https://doi.org/10.1007/s13311-018-00687-z).

SULLIVAN-PYKE, C.; DPKRAS, A. Preimplantation Genetic Screening and Preimplantation Genetic Diagnosis. **Obstetrics and Gynecology Clinics North America**, Philadelphia, v.45, n.1, p.113-125, mar. 2018. DOI: 10.1016/j.ogc.2017.10.009.

UNICAMP (Universidade estadual de Campinas). **Distrofia muscular de Duchenne**, 2021. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/taduchenne.html>. Acesso em: 28 jun. 2021.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. **Paediatric Child Health**, Australia, v.51, n.8, p.759-764, jan. 2015. DOI: [doi:10.1111/jpc.12868](https://doi.org/10.1111/jpc.12868).

ZATZ, M. A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. **Ciência saúde coletiva**, São Paulo, v.7, n.1, pg.85-99, jul. 2002. DOI: 10.1590/S1413-81232002000100008.