



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2011/2012

Lúcia Elisa Gonçalves Guedes

Distrofia Muscular de Duchenne: Estratégias Terapêuticas

março, 2012

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Lúcia Elisa Gonçalves Guedes
Distrofia Muscular de Duchenne: Estratégias Terapêuticas

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Neurologia

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Dr. Pedro Miguel Paredes de Abreu**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
Arquivos de Medicina**

março, 2012

FMUP

Eu, Lúcia Elisa Gonçalves Guedes, abaixo assinado, nº mecanográfico 060801060, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 21/03/2012

Assinatura: Lúcia Elisa Gonçalves Guedes

Nome: Lúcia Elisa Gonçalves Guedes

Endereço eletrónico: med06060@med.up.pt **Telefone ou Telemóvel:** 933905030

Número do Bilhete de Identidade: 13444925

Título da Monografia: Distrofia Muscular de Duchenne: Estratégias Terapêuticas

Orientador: Dr. Pedro Miguel Paredes de Abreu

Ano de conclusão: 2012

Designação da área do projeto: Neurologia

É autorizada a reprodução integral desta Monografia para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projetos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 21/03/2012

Assinatura: Lúcia Elisa Gonçalves Guedes

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	10
Palavras-chave	10
ABSTRACT	11
Key-words	11
INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	12
METODOLOGIA	12
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	13
Patofisiologia e Genética	13
Manifestações Clínicas	14
Diagnóstico	14
Estratégias terapêuticas atuais na prática clínica	15
Glucocorticoides	15
Novas Estratégias Terapêuticas	16
Terapia Génica	16
a) Vetores Virais	17
b) Vetores Plasmídicos	18
c) Skipping de Exões	19
d) Correção do Gene	21
Terapia Celular	21
a) Células Estaminais Embrionárias	21
b) Células Estaminais Adultas	22
b1) Mesoangioblastos	22
b2) Células CD133+ Derivadas do Músculo ou Sangue	22
b3) Células Satélite	23
b4) Células Estaminais Mesenquimatosas	23

Terapia Farmacológica _____	23
a) Leitura dos Codões Stop _____	23
b) Compensação da Ausência da Distrofina _____	24
c) Estimuladores do Crescimento e Regeneração Musculares _____	25
CONCLUSÃO _____	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	27
ANEXOS _____	44
ARQUIVOS DE MEDICINA - Instruções aos Autores _____	45
APÊNDICES _____	51
Glossário _____	52
Distrofia Muscular de Duchenne - Revisão de Casos Seguidos na Consulta de Pediatria do Centro Hospitalar São João _____	53
Introdução _____	53
Métodos _____	53
Caracterização dos doentes _____	53
Discussão _____	54
Conclusão _____	55

Lista de Siglas e Abreviaturas

2'OMe: *2'-O-methyl-phosphorothioate*

AON: *Antisense oligonucleotide*

BMD: *Becker Muscular Dystrophy*

cDNA: *complementary DNA*

CK: *Creatine Kinase*

DMD: *Duchenne Muscular Dystrophy*

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

Kb: *Kapabases*

kDa: *kiloDalton*

Mb: *Megabases*

mRNA: *messenger Ribonucleic Acid*

PMO: *Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer*

pPMO: *peptide PMO*

rAAV: *recombinant Adenoassociated virus*

Lista de Tabelas

Tabela 1- Estratégias terapêuticas em utilização na prática clínica para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne;

Tabela 2- Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne.

Lista de Figuras

Figura 1 – Distrofina e complexo de ligação à distrofina.

Figura 2 - Comparação da distrofina completa com as suas versões truncadas funcionais.

Figura 3 – Comparação da tradução do RNA mensageiro (mRNA) em indivíduo normal, com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e com utilização de *skipping* de exões.

Distrofia Muscular de Duchenne: Estratégias Terapêuticas

Distrofia Muscular Duchenne: Tratamento

Autor

Lúcia Guedes, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Para correspondência contactar:

Telefone: 225513604

Endereço de correio eletrónico: med06060@med.up.pt

Endereço: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Departamento de Neurologia.

Alameda Professor Hernâni Monteiro. 4200-319 Porto

Agradecimentos

Ao Dr. Pedro Abreu pela colaboração fundamental na redação do texto, revisão crítica do seu conteúdo intelectual e aprovação da versão final e por todo o tempo e disponibilidade despendidos.

À Dr.^a Sara França pela colaboração na execução da série de doentes com diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne apresentada.

Ao Dr. Miguel Leão, Dr.^a Esmeralda Rodrigues e Departamento de Genética do Hospital de São João pela colaboração na obtenção de listagem de doentes com o referido diagnóstico, seguidos na consulta de Pediatria desse hospital.

Contagem de palavras

Resumo: 220 palavras

Abstract: 204 palavras

Texto principal: 4.524 palavras

Resumo

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), uma miopatia recessiva ligada ao cromossoma X, é a distrofia muscular mais comum na infância. Esta doença caracteriza-se por uma grave e progressiva perda da força muscular, resultando em perda da deambulação durante a primeira década de vida e morte na segunda ou terceira décadas de vida.

Esta monografia tem por objetivos rever as características gerais da DMD e abordar as estratégias terapêuticas atualmente utilizadas na prática clínica e, particularmente, as estratégias terapêuticas presentemente em investigação, referindo os resultados obtidos com cada uma delas.

Devido à ausência de tratamento curativo para esta doença, o tratamento utilizado atualmente tem por base uma abordagem multidisciplinar com o objetivo de atrasar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida destes doentes.

As abordagens terapêuticas que têm sido investigadas nos últimos anos, algumas das quais já em fase de ensaio clínico, incluem terapia génica utilizando vetores virais e não virais, terapia celular e terapia farmacológica. Destas estratégias, a que atingiu estádios mais avançados com resultados bastante satisfatórios foi o *skipping* de exões. Também a terapia génica utilizando a forma recombinante do vírus adenoassociado, a terapia celular recorrendo a mesoangioblastos e a leitura de codões stop têm-se revelado alternativas promissoras. Provavelmente o melhor tratamento para esta patologia passará pela combinação de várias destas promissoras terapêuticas recentemente estudadas.

Palavras-chave

Distrofia muscular de Duchenne; terapia génica; terapia celular; terapia farmacológica; *skipping* de exões; leitura de codões stop.

Abstract

Duchenne's muscular dystrophy (DMD), an X-linked recessive myopathy, is the most common muscular dystrophy in childhood. This disease is characterized by a severe and progressive muscle weakness, leading to loss of ambulation during first decade of life and death in the second or third decade of life.

This monograph aims to review the general characteristics of DMD and address the therapeutic strategies currently used in clinical practice and, particularly, the therapeutic strategies currently under investigation, referring the results obtained with each strategy.

Due to the absence of curative treatment for this disease, the current treatment is based on a multidisciplinary approach in order to delay the disease progression and improve quality of life of the ill subjects.

Therapeutic approaches that have been investigated in recent years, some of which are already in clinical trial, include gene therapy using viral and nonviral vectors, cell therapy and pharmacological therapy. The strategy which reached the most advanced stages with satisfactory results was the skipping of exons. On the other hand, gene therapy using recombinant adenoassociated virus, cell therapy using mesoangioblasts and stop codon read-through have proved to be promising alternatives. Probably the best treatment for this condition will be a combination of these promising therapies recently studied.

Key-words

Duchenne's muscular dystrophy; gene therapy; cell therapy; pharmacological therapy; exon skipping; read-through strategies.

Introdução

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), uma miopatia recessiva ligada ao cromossoma X, é a distrofia muscular mais comum na infância.⁽¹⁾ Esta doença caracteriza-se por uma grave e progressiva perda da força muscular, resultando em perda da deambulação durante a primeira década de vida e morte na segunda ou terceira décadas de vida.^(2,3) Afeta cerca de 1/3.500 recém-nascidos masculinos e apresenta uma prevalência mundial estimada em 1/30.000.⁽²⁾

Atualmente não existe tratamento efetivo para esta doença.⁽⁴⁾ No entanto, o padrão dos cuidados prestados tem melhorado, permitindo o prolongamento da sobrevida e melhoria da qualidade de vida. Contudo, estas intervenções são apenas sintomáticas, estando ainda longe do adequado.⁽²⁾

Nos últimos anos, muita investigação tem sido realizada de modo a encontrar possíveis tratamentos para esta doença, nomeadamente terapia génica, celular e farmacológica, sendo os resultados obtidos promissores.

Objetivos

Os objetivos desta monografia são rever as características gerais da DMD nomeadamente patofisiologia e genética, manifestações clínicas e diagnóstico, expor as terapêuticas atualmente utilizadas na prática clínica e, particularmente, as estratégias terapêuticas presentemente em investigação, referindo os resultados obtidos com cada uma delas.

Metodologia

Na pesquisa realizada para este trabalho foram incluídos artigos de revisão, publicados entre janeiro de 2006 e outubro de 2011, escritos em português ou inglês, pesquisados na base de dados PUBMED pelos termos “Duchenne Muscular Dystrophy treatment”, “Duchenne Muscular Dystrophy therapy” e “Duchenne Muscular Dystrophy management”. Contactaram-se, por *e-mail*, os autores de alguns trabalhos que foram encontrados na pesquisa mas não estavam disponíveis *online*. Os artigos obtidos foram pré-selecionados pelo título e, de seguida,

foram lidos na íntegra e selecionados segundo a relevância apresentada. Foram ainda incluídos estudos clínicos em humanos publicados recentemente.

No final incluíram-se como referências bibliográficas 25 artigos.

Distrofia Muscular de Duchenne

Patofisiologia e Genética

A Distrofia Muscular de Duchenne é causada por mutações no gene *dmd* das quais resulta deficiência da proteína distrofina.

A distrofina, uma proteína em forma de bastonete de 427 kDa, possui quatro domínios (Figura 1) e é essencial para proteger o sarcolema do stress gerado pelas contrações musculares repetidas, tendo também funções no controlo de moléculas de sinalização intracelular.^(5,6) A ausência de distrofina condiciona a não agregação do complexo de ligação à distrofina, levando a fragilidade do sarcolema, conduzindo a entrada de cálcio na célula e lesão focal ou difusa da fibra muscular. Com os ciclos repetidos de degeneração-regeneração induzidos pela atividade do músculo, a população de células progenitoras (células satélite) esgota-se e o músculo vai sendo progressivamente substituído por tecido conjuntivo e adiposo.⁽⁷⁾

O gene *dmd* localiza-se no braço curto do cromossoma X (Xp21.2) e possui 79 exões.^(2,8) A maioria das alterações que ocorrem neste gene são deleções (65-72% dos casos de DMD) que ocorrem com maior frequência em regiões *hotspot* (exões 45-53), duplicações de um ou mais exões (7%), e mutações pontuais, pequenas deleções ou inserções (20%). A maior parte dessas alterações correspondem a mutações *nonsense*, *frame-shift* ou em locais de *splicing*.⁽¹⁾ Aproximadamente um terço destas mutações ocorre *de novo*.⁽⁵⁾

Geralmente, mutações *in-frame* resultam em formas truncadas mas parcialmente funcionais da proteína, originando habitualmente a forma mais ligeira da doença, a Distrofia Muscular de Becker (BMD). Por outro lado, mutações *frame-shift* resultam na ausência completa da proteína, originando a forma mais grave da doença, a DMD.⁽⁸⁾ A gravidade da doença não se relaciona simplesmente com a extensão da deleção ou duplicação, mas depende também do local da proteína afetado.⁽⁹⁾

Manifestações Clínicas

A evolução clínica da DMD é grave e progressiva, embora o fenótipo e progressão da doença possam variar e alterar com o tempo.⁽⁸⁾

Esta doença manifesta-se dos três aos cinco anos de idade por alterações motoras: marcha bamboleante, dificuldades em correr, saltar e levantar-se do chão (sinal de Gower), quedas frequentes e pseudohipertrofia dos músculos da região gemelar. Menos frequentemente, os doentes apresentam-se com atraso do desenvolvimento da linguagem ou global, ou incidentalmente com elevação dos níveis de creatina cínase (CK) ou transaminases plasmáticas. Com a progressão da doença, os pacientes tornam-se incapazes de deambular, ficando dependentes de cadeira de rodas aos 11-12 anos.^(1,10)

A nível respiratório, em todos os doentes, ocorre doença pulmonar restritiva, condicionando insuficiência respiratória crónica, sendo esta a sua principal causa de morte. Um terço dos doentes apresenta também síndrome da apneia do sono.⁽¹⁾

Após os dez anos de idade, tornam-se clinicamente evidentes alterações do ritmo e condução cardíacas e cardiomiopatia dilatada, esta última representando a segunda causa de morte por DMD (10-40% das mortes).^(1,11)

Estes doentes apresentam ainda escoliose, fraturas de ossos longos e osteoporose e, aproximadamente 30% apresentam também alterações intelectuais e/ou cognitivas não progressivas.^(1,12) Dificuldades em alimentar-se e perda de peso são complicações comuns em estádios tardios.⁽⁶⁾

A ausência de tratamento implica que a maioria destes doentes acabem por morrer devido a insuficiência respiratória ou cardiomiopatia, no final da adolescência ou quando adultos jovens.⁽⁶⁾

Diagnóstico

A suspeita de DMD deve ser levantada perante uma criança do género masculino incapaz de andar aos 16-18 meses de idade, ou que apresente pseudohipertrofia dos músculos da região

gemelar, marcha bamboleante ou sinal de Gower antes dos cinco anos de idade, ou que manifeste atraso global do desenvolvimento, independentemente da história familiar.^(6,13)

Perante esta suspeita deve realizar-se doseamento da CK plasmática (que se encontra aumentada, frequentemente 50 a 200 vezes), e biópsia de músculo, com pesquisa de distrofina através de técnicas de imunohistoquímica e *imunoblotting*.^(1,6,13) Após confirmação do diagnóstico por biópsia, o teste genético é mandatório. Quando este é negativo, o gene *dmd* deve ser totalmente sequenciado.⁽¹³⁾

Nos casos em que o grau de suspeita de DMD é elevado ou existe história familiar, o teste genético deve ser realizado antes da biópsia e, caso seja positivo, a biópsia torna-se desnecessária.⁽¹³⁾

Estratégias terapêuticas atuais na prática clínica

Na ausência de tratamento curativo, as intervenções terapêuticas atualmente utilizadas na DMD, habitualmente integradas numa abordagem multidisciplinar, têm como objetivo atrasar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida.⁽⁸⁾ Na tabela 1 apresentam-se resumidamente alguns dos tratamentos utilizados atualmente. Nesta secção será exposta apenas a intervenção farmacológica que teve maior impacto no tratamento destes doentes.

Glucocorticoides

A única classe de fármacos que tem mostrado efeitos positivos consistentes na melhoria da força muscular na DMD são os glucocorticoides (prednisona, prednisolona e deflazacort).⁽¹⁴⁾

Têm sido levantadas várias hipóteses, contudo, o mecanismo de ação destes fármacos ainda não foi claramente identificado.⁽¹⁵⁾ Estudos utilizando doses diárias de prednisona (0,75 mg/Kg) ou de deflazacort (0,9 mg/Kg), mostraram que estes prolongam a deambulação durante dois a três anos, preservam a função respiratória e reduzem a incidência de escoliose e cardiomiopatia em doentes que toleraram a terapêutica a longo prazo.⁽⁶⁾

As principais desvantagens desta terapêutica são os seus efeitos adversos nomeadamente, a curto prazo, aumento de peso, aparência cushingoide, alterações do comportamento e

diminuição da massa óssea e, a longo prazo, fraturas vertebrais, supressão do crescimento linear ósseo e cataratas.^(1,13,15)

Os glucocorticoides devem ser administrados nos estádios precoces da doença (preferencialmente pelos quatro a seis anos de idade) e acompanhados de prevenção e monitorização atenta dos efeitos adversos.⁽⁶⁾

Novas Estratégias Terapêuticas

Embora as intervenções utilizadas atualmente tenham permitido uma melhoria importante da sobrevida e da qualidade de vida destes doentes, nenhuma delas é dirigida à causa primária desta doença.⁽⁵⁾ Na tabela 2 resumem-se as novas estratégias terapêuticas que têm sido experimentadas nos últimos anos, as suas vantagens e desvantagens.

Terapia Génica

Dado que a DMD é causada por mutações num único gene, o objetivo desta terapia é introduzir nas células distróficas uma cópia funcional do gene *dmd* (transgene), ou reparar o gene previamente existente, de forma a recuperar a produção de distrofina funcional, e em quantidade suficiente, para alterar o fenótipo distrófico.⁽⁹⁾

Esta terapia tem sido subdividida consoante a utilização ou não de vetores virais para a transfeção do transgene. O subgrupo que não utiliza vetores virais inclui: vetores plasmídicos de ácido desoxirribonucleico (DNA), *skipping* de exões e correção do gene.⁽³⁾

A quantidade mínima de distrofina necessária para induzir estabilidade funcional do músculo não é conhecida, contudo estudos têm mostrado que a expressão de aproximadamente 20% dos níveis endógenos normais é suficiente.⁽⁵⁾

As maiores dificuldades encontradas no desenvolvimento da terapia génica são: a necessidade de atingir diferentes músculos (em particular o diafragma e coração), a otimização da via de administração, a necessidade de uma expressão mais prolongada do transgene, a possível ocorrência de resposta imune ou de fibrose e a prevenção de lesões *versus* substituição/reparação das fibras musculares necróticas.⁽¹⁶⁾

a) Vetores Virais

Vetores derivados de adenovírus estão entre os vetores mais utilizados para a terapia génica, contudo têm sido evidenciadas reações imunes importantes contra eles e o transgene.^(7,9) Assim, sucessivas modificações têm sido introduzidas nestes vetores, permitindo obter vetores adenovíricos “eviscerados” com capacidade de carga de 35 Kb (permitindo o transporte do DNA complementar – cDNA- do gene *dmd*, que possui 14 Kb) e que mantêm a capacidade para infectar células quiescentes e não quiescentes com elevada eficácia (incluindo músculo esquelético e cardíaco). Porém são dependentes de vírus adjuvantes durante a produção do vetor, dada a sua dimensão, são menos aptos a transpor a parede dos vasos e o transgene introduzido dificilmente se integra no genoma da célula hospedeira, carecendo, por isso, de administrações repetidas e em doses elevadas, o que pode ser problemático devido ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra o vetor e transgene.^(7,9)

Os vetores lentivíricos têm a capacidade de integrar, de forma estável, transgenes no genoma de células quiescentes e não quiescentes mas, embora pouco frequentemente, essa integração pode conduzir a mutagénese. Estes vetores apresentam baixa propensão para ativar uma resposta imune do hospedeiro, no entanto esta poderá ocorrer, dificultando a expressão generalizada do transgene em tecidos *in vivo*.^(4,9) Dado permitirem a expressão permanente do novo gene na célula, estes vetores são úteis para a transdução *ex vivo* de células autólogas com o gene *dmd*, permitindo uma posterior expansão e transplante das mesmas para o paciente.^(4,9)

Atualmente, o vetor vírico de escolha para a aplicação desta terapia na DMD é a forma recombinante do vírus adenoassociado (rAAV), que tem a capacidade de infectar células com capacidade replicativa ou quiescentes, permitindo a expressão persistente do transgene por vários anos (dois a sete).^(5,7,9) O facto de possuir pequenas dimensões facilita a saída destes vetores do interior dos vasos, porém diminui a sua capacidade de carga (inferior a 5 Kb). Para ultrapassar esta limitação, e baseado em observações clínicas de pacientes com grandes deleções apresentando manifestações ligeiras, criaram-se genes que codificam versões truncadas da distrofina, chamadas mini e microdistrofinas (Figura 2). Estudos em animais têm demonstrado

que estas são eficazes na prevenção do desenvolvimento de distrofia e no tratamento de distrofia já estabelecida.^(5,7,9)

Os vetores rAAV têm sido vastamente utilizados já que pareciam não evocar resposta imunológica em vários estudos. Contudo, com a utilização deste vetor em animais de maior porte (nomeadamente cães) identificou-se a ocorrência de resposta imune celular, embora ligeira, que pode ser bloqueada pela instituição de imunossupressão transitória.⁽⁹⁾

Pelo facto de o transgene não ser integrado no genoma, este vai sendo perdido durante a renovação celular, necessitando de ser readministrado. Por este facto e devido à possibilidade de resposta inflamatória, não deverá ser possível a utilização repetida do mesmo serótipo, pelo que se terá que recorrer à administração de diferentes serótipos em cada sessão terapêutica.⁽⁵⁾

Embora se tenham revelado eficazes na prevenção e tratamento desta distrofia, as mini e microdistrofinas não repõem na totalidade as funções da distrofina, nomeadamente no que se refere às funções de sinalização intracelular. Por isso, e também como forma de ultrapassar as dificuldades em relação à diminuta capacidade de carga de alguns vetores, desenvolveram-se duas estratégias (vetores de *trans-splicing* e vetores de recombinação ou sobreposição) com o objetivo de prover a célula de um gene que codifica a distrofina completa. Estas estratégias têm por base a administração à célula de dois vetores, cada um contendo um fragmento de cDNA. Utilizando a maquinaria da célula hospedeira, esses fragmentos são depois ligados originando o cDNA completo do gene.⁽⁹⁾

b) Vetores Plasmídicos

Uma forma mais simples de proceder à transferência de genes por vetor seria utilizando DNA plasmídico que, adicionalmente, acarreta a possibilidade de aplicação a todos os doentes com DMD, independentemente da mutação.^(3,5) Porém, os vetores plasmídicos são ineficientes na transferência do gene e, a administração intramuscular desses, não beneficia da complexação com partículas carregadas como, por exemplo, lípidos. O adjuvante que tem permitido uma maior expressão do gene transportado pelo plasmídeo é a electroporação, mas esta tem resultado em lesão muscular significativa.^(3,5)

c) *Skipping de Exões*

A descoberta da existência de fibras distrofina-positivas (fibras revertidas) em, pelo menos, 50% dos doentes com DMD indicou a presença de mecanismos intrínsecos de *splicing* alternativo que podem, embora de forma errática e pouco eficiente, restaurar com sucesso a expressão de distrofina em miócitos isolados. Isto, associado ao facto de se ter demonstrado que várias famílias com BMD apresentam manifestações ligeiras e esperança de vida igual ou próxima à da população em geral, conduziu à tentativa de, artificialmente, aumentar a quantidade de fibras revertidas com objetivos terapêuticos.

Assim, criaram-se oligonucleotídeos *antisense* (AONs - sequências de 20 a 30 nucleotídeos homólogos do exão alvo ou próximo dele) que se ligam ao local alvo do gene *dmd* impedindo a normal formação do spliceossoma, resultando em remoção dessa zona do pré-ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) (Figura 3). Como resultado, obtém-se uma distrofina internamente truncada cuja funcionalidade depende da função da zona excluída, convertendo-se um fenótipo grave de DMD num fenótipo ligeiro de BMD.⁽³⁾ Atualmente, as configurações de AONs mais testadas são o 2'-O-metil fosforotioato (2'OMe) e o morfolino-fosforodiamidato (PMO).⁽⁹⁾

Após a obtenção de resultados animadores em estudos em animais, realizaram-se ensaios clínicos de AONs em humanos. Inicialmente testou-se a administração intramuscular destes compostos mas, embora os resultados tenham sido bastante animadores, essa via não é viável dado que o tecido muscular corresponde a uma percentagem significativa do peso corporal, tornando-se essencial a administração por via sistémica.^(17,18)

Seguiu-se então a realização de ensaios clínicos de fase I/II testando outras vias de administração em humanos. Num deles foram testadas, via injeções subcutâneas abdominais, cinco doses semanais de 0,5-6 mg/kg de PRO051 (AON cujo alvo é o exão 51) seguidas de injeções semanais de 6 mg/kg durante 12 semanas. Este tratamento foi bem tolerado em todas as doses e induziu *skipping* específico e detetável do exão 51 nas doses de 2,0 mg/kg ou superiores. Expressão de nova distrofina foi observada em aproximadamente 60 a 100% das fibras musculares em 10 dos 12 pacientes, as quais aumentaram, de forma dose-dependente,

para mais de 15,6% da expressão no músculo saudável. Ocorreu ainda uma melhoria modesta no teste da caminhada durante seis minutos.⁽¹⁹⁾

Num outro estudo testou-se o AVI-4658 (AON também direcionado ao exão 51) em doses semanais de 0,5-20 mg/kg por via intravenosa, durante 12 semanas. Este composto foi bem tolerado em todas as doses, induziu o *skipping* do exão 51 e expressão de nova distrofina de forma dose-dependente, em todos os doentes que receberam doses iguais ou superiores a 2 mg/kg. Dos sete indivíduos que responderam ao tratamento, a distrofina aumentou de 8,9 para 16,4% do normal. Os três doentes com a melhor resposta ao tratamento apresentaram 21, 15 e 55% de fibras distrofina-positivas após o tratamento. Mostrou-se também a reposição no sarcolema do α -dístroglicano e da síntase neuronal do óxido nítrico.⁽²⁰⁾

Nos vários estudos realizados verificou-se que, embora se atingissem valores elevados de *skipping* nos músculos esqueléticos, estes eram bastante mais reduzidos no coração. Tal facto é explicado pela diferente estrutura e patologia do músculo cardíaco, que é constituído por cardiomiócitos isolados e cuja permeabilidade membranar não é tão alterada. Esta dificuldade pode ser ultrapassada recorrendo-se a doses mais elevadas do AON ou pela conjugação de peptídeos aos PMOs (pPMO) de forma a facilitar a sua entrada na célula. Com a utilização de pPMOs obteve-se *skipping* mais eficiente, incluindo no músculo cardíaco, com doses mais baixas de composto, permitindo ainda melhoria fenotípica. Contudo, falta avaliar a existência de toxicidade e/ou resposta imune contra os conjugados.⁽²⁾

Embora promissor, o *skipping* de exões apresenta várias limitações. Uma delas é o facto de ser específica para a mutação, implicando a documentação da mesma em cada doente. Contudo, dado que as mutações ocorrem mais frequentemente em *hotspots*, vários pacientes com mutações próximas podem beneficiar do mesmo AON, nomeadamente o *skipping* do exão 51 (presente em 19% dos doentes com deleções, aproximadamente 13% do total de doentes).⁽¹⁶⁾ Outra limitação está relacionada com o facto de apenas ser eficaz quando ainda há tecido muscular presente, o que implica que o tratamento seja iniciado em fases precoces. Adicionalmente os AONs possuem baixa semivida, necessitando de readministrações frequentes que podem dar origem a efeitos adversos.⁽¹⁶⁾

De modo a ultrapassar a limitação da semivida e administrações repetidas, têm sido desenvolvidas técnicas de ministrar os AONs à célula via vetores víricos, integrados nos genes das ribonucleoproteínas nucleares U1 e U7. Contudo, estas apresentam as limitações já referidas para os vetores víricos. Outra alternativa será a transfeção desses genes *ex vivo* em células autólogas pluripotentes, que seriam posteriormente transplantadas no doente. No entanto, a eficácia do transplante de células estaminais é ainda muito baixa.⁽²⁾

d) Correção do Gene

Esta técnica tem por base a criação de incompatibilidade de uma base nucleotídica entre um vetor oligonucleotídeo e a sequência do genoma, de forma que os mecanismos endógenos de reparação do DNA alterem essa base no DNA genómico.⁽³⁾

Estudos utilizando oligonucleotídeos quiméricos de RNA-DNA e oligodesoxinucleotídeos demonstraram que estes compostos são eficazes na correção a nível do genoma e mRNA e recuperação da expressão da distrofina em modelos animais.^(3,5)

Contudo, esta abordagem tem que ser individualizada a cada caso. Além disso, a eficácia demonstrada foi baixa (1 a 5%) e apenas um de dois alelos é corrigido por estes vetores, podendo ocorrer, com igual probabilidade, incompatibilidade entre as duas cadeias de DNA resultando em rejeição ou aceitação da correção introduzida no genoma.^(3,5)

Terapia Celular

Esta terapia tem por base o transplante de células estaminais com o objetivo de que, estas ou as suas descendentes, transportando o gene normal da distrofina, se integrem no músculo distrófico, proliferem e se diferenciem para formar novas fibras musculares, ou se fundam com as já existentes, recuperando a produção de distrofina.⁽⁷⁾

a) Células Estaminais Embrionárias

Estas células têm sido utilizadas como terapia celular devido à sua capacidade ilimitada de autorrenovação e de diferenciação em todos os tipos de células adultas (pluripotência). Contudo, este procedimento levanta preocupações a nível ético e moral.⁽²¹⁾

b) Células Estaminais Adultas

Células estaminais adultas são células intrínsecas a vários tecidos capazes de preservar, originar ou substituir células terminalmente diferenciadas do respetivo tecido. Estas células apresentam várias limitações, como restrição no tipo de células em que se podem diferenciar, nem todas possuem aptidão para transpor a parede dos vasos, não exibem crescimento e divisão indefinidas e são de difícil isolamento e manutenção em laboratório.⁽²¹⁾

b1) Mesoangioblastos

Mesoangioblastos são células estaminais derivadas de vasos sanguíneos capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo células musculares esqueléticas e cardíacas. Dada a sua capacidade de transpor a barreira vascular, a eficácia destas células, administradas por via intra-arterial, foi testada em modelos animais, designadamente o cão, tendo-se obtido expressão de distrofina em mais de 70% das fibras musculares, cuja força de contração estava normal, ocorrendo melhoria da mobilidade. Neste estudo não foram descritos efeitos adversos relacionados com este tratamento.^(7,8)

Dada a capacidade de restaurar, de forma parcial mas significativa, a estrutura e função musculares, a administração intra-arterial de mesoangioblastos tem-se tornado um dos mais promissores protocolos para terapia celular na distrofia muscular.⁽²¹⁾

b2) Células CD133+ Derivadas do Músculo ou Sangue

Células expressando o antígeno de células estaminais CD133, isoladas a partir do sangue e de músculo esquelético, mostraram-se capazes de originar fibras distrofina-positivas em estudos em ratinho. A segurança deste método foi avaliada através de injeção intramuscular de células CD133+ derivadas de músculo, tendo-se mostrado que este procedimento é seguro e viável.⁽²²⁾ Nos estudos realizados, verificou-se que as células CD133+ derivadas de músculo são mais eficientes na melhoria da morfologia e recuperação da função do músculo esquelético, que as derivadas do sangue.^(8,21)

b3) Células Satélite

As células satélite são células progenitoras que se localizam entre a membrana basal e o sarcolema das fibras musculares. Estas células têm sido as mais estudadas devido à sua capacidade de diferenciação em mioblastos esqueléticos, ativando subsequentemente a diferenciação miogénica, originando novas fibras musculares.^(9,21)

Quando transplantadas em ratinho, as células satélite mostraram-se responsáveis pela regeneração de fibras musculares maduras, restauração da expressão de distrofina, redução da inflamação e fibrose musculares e melhoria da função muscular fisiológica. Contudo, o crescimento *in vitro* de células satélite recém-isoladas reduziu significativamente o seu potencial miogénico *in vivo*.⁽²¹⁾

b4) Células Estaminais Mesenquimatosas

Células estaminais mesenquimatosas foram convencionalmente definidas como células não hematopoiéticas, aderentes, que expressam marcadores como CD90, CD105 e CD73 e que são negativas para CD14, CD34 e CD45.⁽²²⁾

Estas células possuem capacidade de diferenciação em vários tecidos, havendo alguma evidência no sentido da diferenciação seletiva em tecidos lesados. Além disso pensa-se que estas células têm a capacidade de regular respostas inflamatórias associadas a processos biológicos. Assim, os efeitos terapêuticos deste tipo de células devem-se à sua diferenciação em células do tecido lesado, à produção de fatores parácrinos que inibem a apoptose e à estimulação da proliferação de células endógenas e/ou ativação de células estaminais tecidulares residentes no local da lesão.⁽²²⁾

Contudo, a maioria dos estudos realizados com estas células não demonstraram uma melhoria significativa da força muscular contráctil.⁽²²⁾

Terapia Farmacológica

a) *Leitura dos Codões Stop*

Aproximadamente 10 a 15% dos casos de DMD são devidos a mutações *nonsense* que causam o término prematuro da tradução do mRNA, resultando numa proteína truncada ou

ausente.⁽¹³⁾ Com esta estratégia pretende-se induzir alterações conformacionais no mRNA, permitindo que o ribossoma insira um aminoácido nos codões stop prematuros durante a tradução, resultando na produção de distrofina completas. Esta abordagem afeta seletivamente os codões stop prematuros dado que a conformação geométrica do mRNA nesse local é diferente da existente no terminal 3' do gene.⁽²³⁾

Um ensaio clínico publicado recentemente, em que se administrou gentamicina na dose de 7,5 mg/kg/dia a quatro *cohorts* de doentes, no grupo dos doentes tratados durante 14 dias, os níveis plasmáticos de CK diminuíram 50% e no grupo dos que foram tratados durante seis meses, os níveis de distrofina subiram significativamente (com os valores máximos atingindo 13 a 15% do normal) acompanhado por diminuição dos níveis de CK.^(23,24) Contudo, a gentamicina é um antibiótico de largo espectro que pode causar nefro e ototoxicidade, distúrbios gastrointestinais e resistências bacterianas.^(2,5)

O composto PTC124 é um composto administrado por via oral, que se tem mostrado eficaz na recuperação da expressão de distrofina em estudos em animais e células distróficas humanas, tendo prosseguido para ensaios em humanos.⁽¹⁴⁾ Num ensaio clínico completado recentemente não foram observadas diferenças entre o grupo placebo e o de alta dose e verificou-se melhoria da função entre o grupo placebo e o de baixa dose, embora não significativa. Admite-se que neste estudo o PTC124 em baixa dose induziu a produção de distrofina mas não em níveis suficientes para causar diferenças na função muscular. A análise de outros parâmetros ainda está pendente.⁽²⁾

As limitações associadas a esta intervenção são o facto de ser aplicável a uma pequena percentagem de doentes e a possibilidade teórica de perda da fidelidade resultando em supressão da leitura de todos os codões stop (incluindo os fisiológicos).⁽¹⁴⁾

b) Compensação da Ausência da Distrofina

A utrofina é uma proteína semelhante à distrofina cuja expressão aumenta na ausência desta última, contudo não é suficiente para compensar funcionalmente a sua perda e prevenir a progressão da distrofia muscular.⁽⁸⁾ Assim, estratégias com vista a amplificar o *upregulation*

endógeno da utrofina são atrativas para o tratamento da DMD, dado que beneficiam todos os doentes independentemente da mutação específica que apresentam, e podem ser administrados por via sistémica já que a superexpressão de utrofina noutros tecidos não parece causar efeitos deletérios.⁽⁴⁾

A molécula BMN195 foi uma das testadas com este objetivo e a que obteve resultados mais promissores. Esta mostrou-se capaz de aumentar a produção de utrofina em modelos animais, no entanto, num ensaio clínico de fase I não foi possível obter concentrações plasmáticas eficazes devido a baixa biodisponibilidade.⁽⁴⁾

Outra alternativa tem passado pela administração de microutrifinas às células musculares por meio de vetores, nomeadamente vetores plasmídicos e rAAVs. Esta alternativa apresenta as vantagens e desvantagens anteriormente descritas para a introdução do gene *dmd* por esta via, contudo, acresce a vantagem de introduzir uma proteína já expressa na célula e, portanto, menor risco de desenvolvimento de resposta imune contra o transgene.⁽⁴⁾

c) Estimuladores do Crescimento e Regeneração Musculares

O fator de crescimento insulina-*like* tipo 1 (IGF-1) promove a regeneração muscular através da estimulação da proliferação e diferenciação das células progenitoras. Adicionalmente promove a síntese proteica e inibe a sua degradação pelo bloqueio da transcrição de ligases da ubiquitina. Assim, o IGF-1 foi testado em modelos animais com DMD tendo-se verificado uma melhoria na massa e força musculares, diminuição da fibrose, da suscetibilidade à contração e da necrose no músculo. Embora estes resultados tenham sido animadores, ainda não foram realizados ensaios clínicos em humanos.⁽¹⁴⁾

A miostatina é um regulador endógeno negativo do crescimento muscular e o bloqueio da sua ação, com consequente desinibição das células progenitoras, parece ser uma possível via para aumentar a regeneração muscular.⁽¹⁴⁾ Várias abordagens têm sido consideradas para reduzir a função da miostatina, das quais a que obteve resultados mais promissores foi a sua inibição direta através de anticorpos monoclonais (MYO-029). Um ensaio clínico de fase II, em que se administrou MYO-029 a doentes com várias distrofias musculares, mostrou que este fármaco

não está associado a efeitos adversos graves a curto prazo e conduziu à melhoria das propriedades contráteis de fibras musculares isoladas em quatro dos cinco pacientes que receberam este tratamento.^(14,16) Alguns estudos têm aumentado a expressão de inibidores da miostatina (como por exemplo a folistatina) de modo a bloquear a sua ação, através da utilização de rAAVs e plasmídeos. Estes demonstraram melhoria na massa e força musculares.⁽¹⁴⁾

Embora os resultados obtidos com estas intervenções tenham sido animadores, deve ter-se em conta que estas não são dirigidas à correção do mecanismo patofisiológico da doença, devendo ser consideradas terapias adjuvantes de tratamentos ditos “curativos”.⁽¹⁴⁾

Conclusão

A Distrofia Muscular de Duchenne é uma patologia devastadora que atinge indivíduos em fase muito precoce, afetando consideravelmente a sua qualidade de vida e encurtando de forma drástica a sua sobrevida.

As várias abordagens terapêuticas utilizadas atualmente, integradas numa rede de cuidados multidisciplinares, têm permitido que estes doentes atinjam a idade adulta, mantendo uma qualidade de vida aceitável. Contudo, esses tratamentos estão longe de serem os mais adequados, sendo necessária a procura ativa de uma cura.

Das estratégias estudadas nos últimos anos, a que atingiu estádios mais avançados com resultados bastante satisfatórios foi o *skipping* de exões. Também a terapia génica utilizando rAAVs, a terapia celular recorrendo a mesoangioblastos e a leitura de codões stop têm-se revelado alternativas promissoras, embora todas elas se encontrem em fases demasiado precoces para serem implementadas na prática clínica. Provavelmente o melhor tratamento para esta patologia passará pela combinação de várias destas promissoras terapêuticas recentemente estudadas.

Espera-se que a investigação nesta área continue para que seja possível obter-se uma cura para a DMD ou, alternativamente, se consiga proporcionar a estes doentes uma sobrevida e qualidade de vida aproximadas às da população saudável.

Referências Bibliográficas

- ⁽¹⁾ Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *Neurol India*. 2008 Jul Sep;56(3):236-47.
- ⁽²⁾ Aartsma-Rus A, den Dunnen JT, van Ommen GJ. New insights in gene-derived therapy: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Dec; 1214:199-212.
- ⁽³⁾ Rando TA. Non-viral gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Feb; 1772(2):263-71.
- ⁽⁴⁾ Goyenvalle A, Seto JT, Davies KE, Chamberlain J. Therapeutic approaches to muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2011 Apr 15;20(R1): R69-78. Epub 2011 Mar 24.
- ⁽⁵⁾ Wells DJ. Therapeutic restoration of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil*. 2006;27(5-7):387-98. Epub 2006 Jul 28.
- ⁽⁶⁾ Manzur AY, Muntoni F. Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Jul;80(7):706-14.
- ⁽⁷⁾ Cossu G, Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol Med*. 2007 Dec;13(12):520-6. Epub 2007 Nov 5.
- ⁽⁸⁾ Wang Z, Chamberlain JS, Tapscott SJ, Storb R. Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. *ILAR J*. 2009;50(2):187-98.
- ⁽⁹⁾ Muir LA, Chamberlain JS. Emerging strategies for cell and gene therapy of the muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Jun 25;11:e18.
- ⁽¹⁰⁾ Wilton SD, Fletcher S. Exon skipping and Duchenne muscular dystrophy: hope, hype and how feasible?. *Neurol India*. 2008 Jul-Sep;56(3):254-62.
- ⁽¹¹⁾ Wood MJ, Gait MJ, Yin H. RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease. *Brain*. 2010 Apr;133(Pt 4):957-72. Epub 2010 Feb 11.
- ⁽¹²⁾ Bushby K et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol*. 2010 Feb;9(2):177-89. Epub 2009 Nov 27.

- ⁽¹³⁾ Bushby K et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 2010 Jan;9(1):77-93. Epub 2009 Nov 27.
- ⁽¹⁴⁾ Wagner KR. Approaching a new age in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Neurotherapeutics*. 2008 Oct;5(4):583-91.
- ⁽¹⁵⁾ Angelini C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve*. 2007 Oct;36(4):424-35.
- ⁽¹⁶⁾ Trollet C, Athanasopoulos T, Popplewell L, Malerba A, Dickson G. Gene therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Jul;9(7):849-66.
- ⁽¹⁷⁾ van Deutekom JC, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*. 2007 Dec 27;357(26):2677-86.
- ⁽¹⁸⁾ Kinali M, et al. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol*. 2009 Oct;8(10):918-28. Epub 2009 Aug 25.
- ⁽¹⁹⁾ Goemans NM, et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 2011 Apr 21;364(16):1513-22. Epub 2011 Mar 23.
- ⁽²⁰⁾ Cirak S, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet*. 2011 Aug 13;378(9791):595-605. Epub 2011 Jul 23.
- ⁽²¹⁾ Meregalli M, Farini A, Parolini D, Maciotta S, Torrente Y. Stem cell therapies to treat muscular dystrophy: progress to date. *BioDrugs*. 2010 Aug 1;24(4):237-47. doi: 10.2165/11534300-000000000-00000.
- ⁽²²⁾ Ichim TE, et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol*. 2010;260(2):75-82.
- ⁽²³⁾ Finkel RS. Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *J Child Neurol*. 2010 Sep;25(9):1158-64. Epub 2010 Jun 2.

⁽²⁴⁾ Malik V, et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2010 Jun;67(6):771-80.

⁽²⁵⁾ Wagner KR, Lechtzin N, Judge DP. Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Feb;1772(2):229-37. Epub 2006 Jul 8.

Tabela 1- Estratégias terapêuticas em utilização na prática clínica para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Intervenção	Esquema	Resultados	Observações
Terapia Farmacológica	Glucocorticoides	0,75mg/kg Prednisolona 0,9mg/kg Deflazacort diariamente	de Prolongamento ou deambulação em 2 a 3 anos; de Preservação da função respiratória e redução da incidência de escoliose e de cardiomiopatia, a longo prazo.	da estádios precoces da doença.
Suporte Respiratório	Ventilação não-invasiva por pressão positiva (<i>Bilevel Positive Airway Pressure- BiPAP</i>)	Inicialmente, durante a noite, sendo depois alargado quando surge hipoventilação diurna.	Tratamento de hipoventilação noturna; Aumento da sobrevida média até aos 25 ou 30 anos de idade.	
	Manobras de tosse assistida; Imunização antipneumocócica; Vacina anti- <i>influenza</i> anual.		Prevenção de infecções respiratórias	

Tabela 1- Estratégias terapêuticas em utilização na prática clínica para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Intervenção	Esquema	Resultados	Observações
Suporte Cardíaco	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ou antagonistas dos recetores de angiotensina) e Bloqueadores β .	Igual ao da população em geral.	Normalização ou melhoria da disfunção ventricular esquerda com diminuição dos sintomas e melhoria da sobrevida.	Deve ser iniciado precocemente devido ao facto de o miocárdio estar afetado muito antes de causar sintomas.
Tratamento de Complicações Ortopédicas	Técnicas de fisioterapia		Prevenção ou minimização de contracturas articulares; Promoção da deambulação.	

Tabela 1- Estratégias terapêuticas em utilização na prática clínica para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Intervenção	Esquema	Resultados	Observações
	Ortóteses		<p>Prolongamento da marcha durante 18 meses a 2 anos;</p> <p>Diminuição da incidência de escoliose;</p> <p>Conforto para o paciente;</p> <p>Alinhamento articular correto.</p>	Devem ser utilizadas antes da perda da deambulação.
	<p>Prolongamento da deambulação;</p> <p>Glucocorticoide.</p>		<p>Atraso do desenvolvimento e diminuição da gravidade da escoliose.</p>	
	Artrodese	<p>Realizada quando a escoliose está instalada.</p>	<p>Alinhamento da coluna vertebral;</p> <p>Prevenção do agravamento da deformidade;</p> <p>Tratamento da dor causada por</p>	

Tabela 1- Estratégias terapêuticas em utilização na prática clínica para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Intervenção	Esquema	Resultados	Observações
			fraturas de vértebras osteoporóticas; Diminuição da taxa de declínio respiratório.	
	Monitorização dos níveis de vitamina D; Ponderar utilização de suplementos de vitamina D e cálcio.		Minimização da perda de massa óssea tendo em vista a prevenção de fraturas.	
Tratamento de Complicações Gastrointestinais	Monitorização peso corporal; Aconselhamento dietético; Gastrostomia (quando alimentação oral já não é possível);		Manutenção de estado nutricional adequado.	

Tabela 1- Estratégias terapêuticas em utilização na prática clínica para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Intervenção	Esquema	Resultados	Observações
	Inibidores da bomba de prótons ou antagonistas dos recetores H2, associados ou não a pró-cinéticos, sucralfato ou antiácidos.		Tratamento de refluxo gastroesofágico e esofagite.	
	Laxantes, emolientes, enemas; Hidratação e dieta adequadas.		Tratamento de obstipação.	
Tratamento de Alterações Urinárias	Fármacos anticolinérgicos e/ou saco coletor urinário.		Minimização dos sintomas de urgência urinária e da dificuldade em manter a continência diurna e/ou noturna.	

Tabela 1- Estratégias terapêuticas em utilização na prática clínica para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Intervenção	Esquema	Resultados	Observações
Intervenção a nível Psicológico	Iguais às utilizadas para a população em geral (Terapia da fala, apoio psicológico e, caso necessário, utilização de antidepressivos, preferencialmente os inibidores da recaptção da serotonina).			Manifestam-se como depressão, ansiedade, alterações do ajustamento emocional, comportamento argumentativo/ de oposição e temperamento explosivo.
Tratamento da Dor	Fisioterapia; Correção postural; Ortóteses; Aperfeiçoamento da cadeira de rodas e da cama do doente;			

Tabela 1- Estratégias terapêuticas em utilização na prática clínica para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Intervenção	Esquema	Resultados	Observações
	Tratamento farmacológico (por exemplo, relaxantes musculares, analgésicos e anti-inflamatórios).			

A elaboração desta tabela teve como base as referências bibliográficas ⁽⁶⁾, ⁽¹²⁾, ⁽¹³⁾ e ⁽²⁵⁾.

Tabela 2- Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Estratégia	Ação	Vantagens	Desvantagens
Terapia Génica	Adenovírus	Funcionam como veículos para transferir o gene da carga. distrofina ou minidistrofina aos músculos afetados.	Elevada capacidade de	Moderadamente imunogénicos; Pouco tropismo para o músculo esquelético; Possível resposta imune contra o transgene.
	Lentivírus		Transdução permanente; Útil para a modificação <i>ex vivo</i> de células.	Risco de mutagénese insercional; Possível resposta imune contra o transgene.
	Vírus adenoassociado		Elevado tropismo para o músculo estriado; Administração sistémica eficaz; Baixa imunogenicidade.	Baixa capacidade de carga; Possível resposta imune contra o transgene.

Tabela 2- Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Estratégia	Ação	Vantagens	Desvantagens
	Plasmídeos de DNA	Administração de DNA transportando a distrofina completa, diretamente no músculo.	Simples; Relativa facilidade / custo de síntese; Transporte de distrofina completa.	Toxicidade potencial; Eficácia de transfeção baixa; Possível resposta imune contra o transgene.
	Oligonucleotídeos <i>antissense</i>	Indução do <i>skipping</i> de exões originando distrofinas truncadas mas parcialmente funcionais.	Pouca imunogenicidade; Administração sistêmica eficaz.	Terapia personalizada; Potencial tóxico dos peptídeos conjugados.
	Oligonucleotídeos quiméricos de RNA-DNA / Oligodesoxinucleotídeos	Correção do gene	Correção permanente do gene; Produção de distrofina completa.	Terapia individualizada; Baixa eficácia.

Tabela 2- Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Estratégia	Ação	Vantagens	Desvantagens
Terapia Celular	Células embrionárias	estaminais Transplante de células com o objetivo de repopular o músculo com células contendo o gene da distrofina.	Autorrenovação ilimitada; Pluripotentes. Não levantam questões éticas e morais.	Questões éticas e morais; Risco de rejeição quando alogénicas. Menor capacidade de diferenciação; Isolamento e manutenção em laboratório difíceis; Risco de rejeição quando alogénicas.
	Células estaminais adultas			
Terapia Farmacológica	Gentamicina/ PTC124	Leitura dos codões stop originando distrofinas completas.	Administração sistémica; Produção de distrofina completa.	Não aplicável a todos os doentes; Possibilidade de perda da seletividade para os codões stop prematuros.
	<i>Upregulation</i> da utrofina	Substituição da distrofina pelo seu homólogo, utrofina, recuperando-se as suas funções.	Aplicável a todos os doentes; Sem risco de reação imune contra o transgene.	Estudos em estádios muito iniciais.

Tabela 2- Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne

Tipo	Estratégia	Ação	Vantagens	Desvantagens
	IGF-1 /inibidores da miostatina	Estimulação do crescimento e regeneração musculares.	Aplicável a todos os doentes; Possível aplicação a outras distrofias.	Não corrige a deficiência de base.

A elaboração desta tabela teve como base as referências bibliográficas ^{(2), (3), (4), (5), (7), (9), (14), (16), (21), (22)} e ⁽²³⁾.

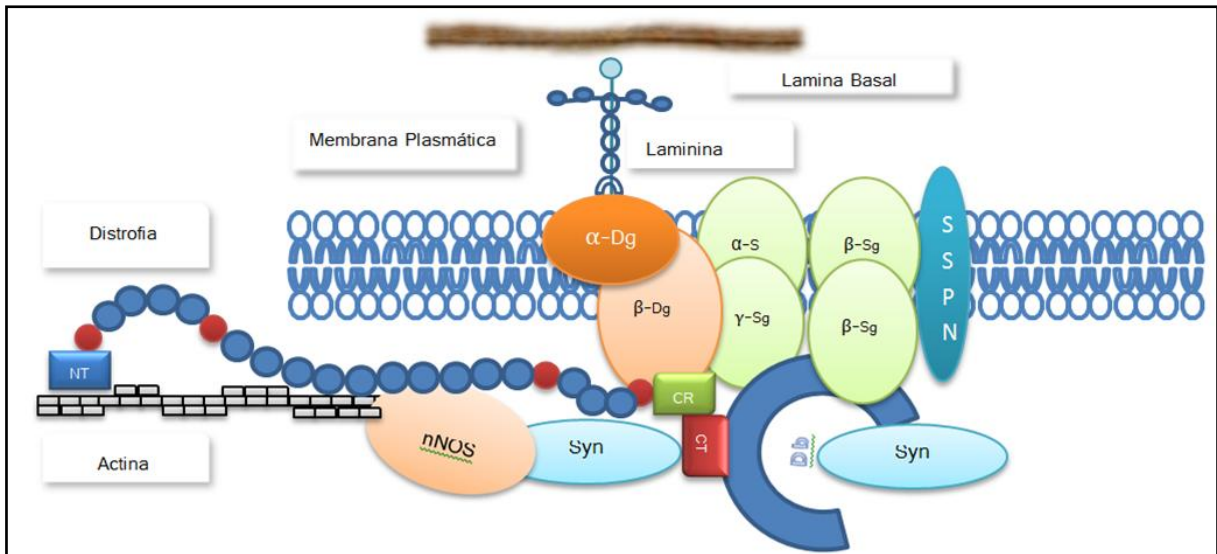


Figura 1 – Distrofina e complexo de ligação à distrofina. A distrofina possui quatro domínios: um domínio amino-terminal (NT), que liga à actina do citosqueleto; um grande domínio em forma de bastonete, constituído por 24 repetições espectrina-like e quatro regiões flexíveis e elásticas; um domínio rico em cisteína (CR), que liga a uma de uma série de glicoproteínas associadas (complexo de ligação à distrofina), o β -distroglicano (β -Dg), que por sua vez se liga ao α -distroglicano (α -Dg) e, através dele à matriz extracelular, via laminina. Por fim, a distrofina tem o domínio carboxi-terminal (CT) que se liga a proteínas internas, nomeadamente a forma neuronal da síntese do óxido nítrico (nNOS).⁽⁵⁾

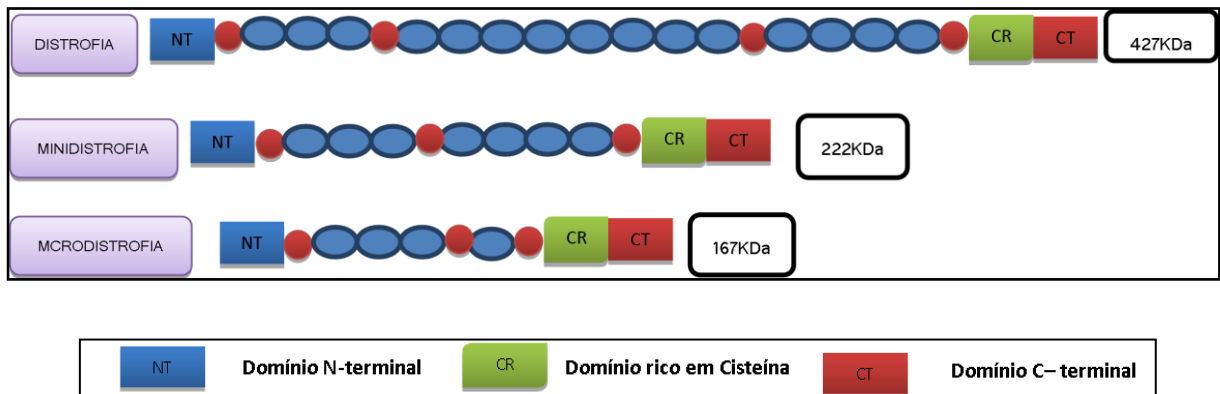


Figura 2 - Comparação da distrofina completa com as suas versões truncadas funcionais.

Distrofina: proteína completa, de 427 kDa, possui quatro domínios: domínio amino-terminal (NT), domínio em forma de bastonete, constituído por 24 repetições *espectrina-like* e quatro regiões flexíveis e elásticas, domínio rico em cisteína (CR), domínio carboxi-terminal (CT). Minidistrofina e microdistrofina: versões truncadas funcionais da distrofina que carecem da maior parte do domínio em forma de bastonete (possuindo apenas quatro ou cinco repetições *espectrina-like*) e partes do domínio N e C-terminal. A diferença entre as duas é determinada pelo número de repetições *espectrina-like*. Estas versões da distrofina foram criadas com o objetivo de ultrapassar a limitada capacidade de carga de alguns vetores utilizados na terapia génica, uma vez que mantêm as principais funções da distrofina mas possuem tamanho mais reduzido (222 kDa e 167 kDa, respetivamente).^(5,9)

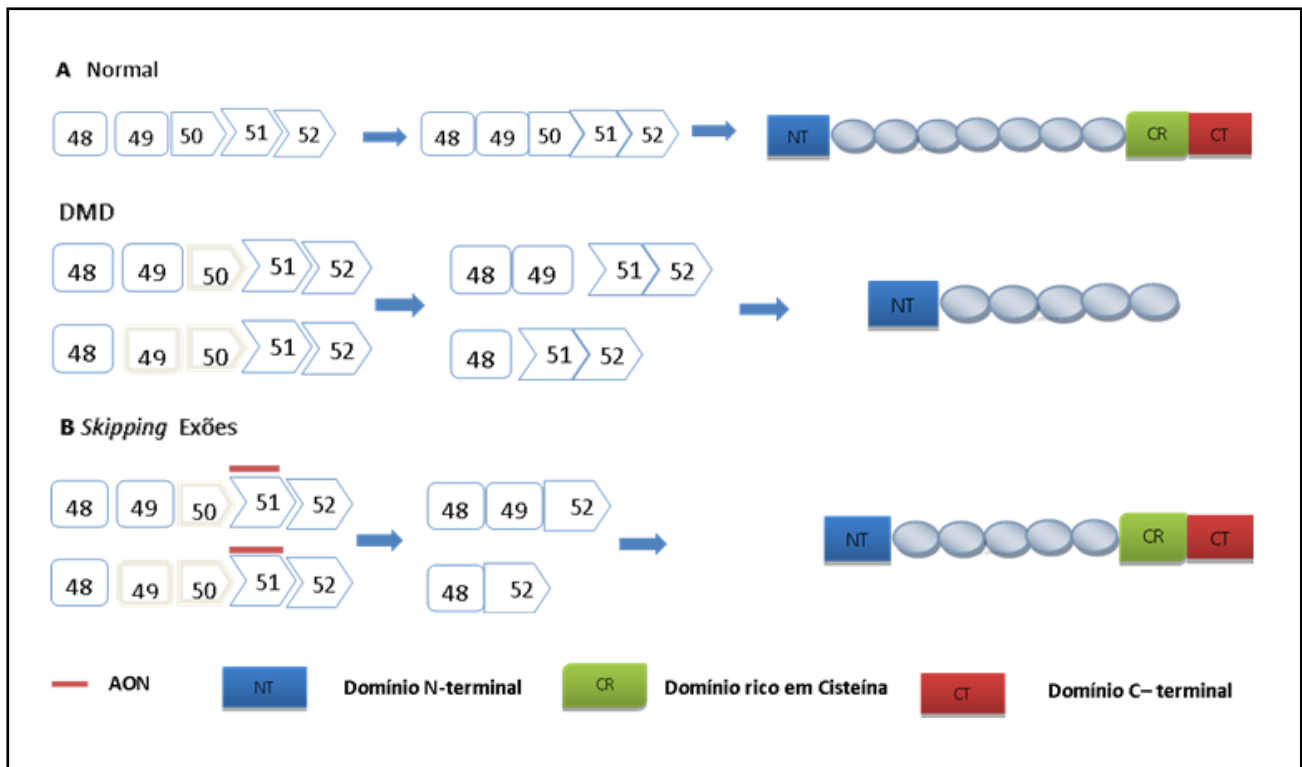


Figura 3 – Comparação da transcrição do gene *dmd* em indivíduo normal, com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e com utilização de *skipping* de exões. A: No indivíduo normal a transcrição do gene *dmd* processa-se de forma adequada originando distrofina completa e funcional. No indivíduo com DMD portador de deleção, por exemplo no exão 50 ou exões 49-50, a leitura do gene é interrompida no local da deleção originando proteínas truncadas e não funcionais. B: Com a utilização de oligonucleotídeos *antisense* (AON), que possuem sequência homóloga ao DNA do exão alvo ou próximo dele, permitindo que se liguem ao local alvo impedindo a normal formação do spliceossoma, consegue-se ultrapassar a zona do gene alterada, obtendo-se uma distrofina internamente truncada mas funcional.^(3,11)

Anexos

ARQUIVOS DE MEDICINA - Instruções aos Autores

Estas instruções seguem os “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals “ (disponível em URL: www.icmje.org).

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam investigação original nas diferentes áreas da medicina, favorecendo investigação de qualidade, particularmente a que descreva a realidade nacional.

Os manuscritos são avaliados inicialmente por membros do corpo editorial e a publicação daqueles que forem considerados adequados fica dependente do parecer técnico de pelo menos dois revisores externos. A revisão é feita anonimamente, podendo os revisores propor, por escrito, alterações de conteúdo ou de forma ao(s) autor(es), condicionando a publicação do artigo a sua efetivação.

Todos os artigos solicitados serão submetidos a avaliação externa e seguirão o mesmo processo editorial dos artigos de investigação original.

Apesar dos editores e dos revisores desenvolverem os esforços necessários para assegurar a qualidade técnica e científica dos manuscritos publicados, a responsabilidade final do conteúdo das publicações e dos autores.

Todos os artigos publicados passam a ser propriedade dos ARQUIVOS DE MEDICINA. Uma vez aceites, os manuscritos não podem ser publicados numa forma semelhante noutros locais, em nenhuma língua, sem o consentimento dos ARQUIVOS DE MEDICINA. Apenas serão avaliados manuscritos contendo material original que não estejam ainda publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam a ser submetidos para publicação noutros locais. Esta restrição não se aplica a notas de imprensa ou a resumos publicados no âmbito de reuniões científicas. Quando existem publicações semelhantes a que e submetida ou quando existirem dúvidas relativamente ao cumprimento dos critérios acima mencionados estas devem ser anexadas ao manuscrito em submissão.

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores tem que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

De acordo com uma avaliação efetuada sobre o material apresentado a revista os editores dos ARQUIVOS DE MEDICINA prevêm publicar aproximadamente 30% dos manuscritos submetidos, sendo que cerca de 25% serão provavelmente rejeitados pelos editores no primeiro mês após a receção sem avaliação externa.

TIPOLOGIA DOS ARTIGOS PUBLICADOS NOS ARQUIVOS DE MEDICINA

Artigos de investigação original

Resultados de investigação original, qualitativa ou quantitativa.

O texto deve ser limitado a 2000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 4 tabelas e/ou figuras (total) e até 15 referências.

Todos os artigos de investigação original devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Publicações breves

Resultados preliminares ou achados novos podem ser objeto de publicações breves.

O texto deve ser limitado a 1000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As publicações breves devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Artigos de revisão

Artigos de revisão sobre temas das diferentes áreas da medicina e dirigidos aos profissionais de saúde, particularmente com impacto na sua prática.

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam essencialmente artigos de revisão solicitados pelos editores. Contudo, também serão avaliados artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia, preferencialmente revisões quantitativas (Meta-análise).

O texto deve ser limitado a 5000 palavras, excluindo referências e tabelas, e apresentar um máximo de 5 tabelas e/ou figuras (total). As revisões quantitativas devem ser organizadas em introdução, métodos, resultados e discussão.

As revisões devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada, devendo ser estruturados no caso das revisões quantitativas.

Comentários

Comentários, ensaios, análises críticas ou declarações de posição acerca de tópicos de interesse na área da saúde, designadamente políticas de saúde e educação médica.

O texto deve ser limitado a 900 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

Os comentários não devem apresentar resumos.

Casos clínicos

Os ARQUIVOS DE MEDICINA transcrevem casos publicamente apresentados trimestralmente pelos médicos do Hospital de S. João numa seleção acordada com o corpo editorial da revista. No entanto é bem-vinda a descrição de casos clínicos verdadeiramente exemplares, profundamente estudados e discutidos. O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

Os casos clínicos devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 120 palavras cada.

Séries de casos

Descrições de séries de casos, tanto numa perspetiva de tratamento estatístico como de reflexão sobre uma experiência particular de diagnóstico, tratamento ou prognóstico.

O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As séries de casos devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Cartas ao editor

Comentários sucintos a artigos publicados nos ARQUIVOS DE MEDICINA ou relatando de forma muito objetiva os resultados de observação clínica ou investigação original que não justifiquem um tratamento mais elaborado.

O texto deve ser limitado a 400 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

As cartas ao editor não devem apresentar resumos.

Revisões de livros ou software

Revisões críticas de livros, software ou sítios da internet.

O texto deve ser limitado a 600 palavras, sem tabelas nem figuras, com um máximo de 3 referências, incluindo a do objeto da revisão.

As revisões de livros ou software não devem apresentar resumos.

FORMATAÇÃO DOS MANUSCRITOS

A formatação dos artigos submetidos para publicação nos ARQUIVOS DE MEDICINA deve seguir os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

Todo o manuscrito, incluindo referências, tabelas e legendas de figuras, deve ser redigido a dois espaços, com letra a 11 pontos, e justificado a esquerda.

Aconselha-se a utilização das letras Times, Times New Roman, Courier, Helvetica, Arial, e Symbol para caracteres especiais.

Devem ser numeradas todas as páginas, incluindo a página do título.

Devem ser apresentadas margens com 2,5 cm em todo o manuscrito.

Devem ser inseridas quebras de página entre cada secção.

Não devem ser inseridos cabeçalhos nem rodapés.

Deve ser evitada a utilização não técnica de termos estatísticos como aleatório, normal, significativo, correlação e amostra.

Apenas será efetuada a reprodução de citações, tabelas ou ilustrações de fontes sujeitas a direitos de autor com citação completa da fonte e com autorizações do detentor dos direitos de autor.

Unidades de medida

Devem ser utilizadas as unidades de medida do Sistema Internacional (SI), mas os editores podem solicitar a apresentação de outras unidades não pertencentes ao SI.

Abreviaturas

Devem ser evitados acrónimos e abreviaturas, especialmente no título e nos resumos. Quando for necessária a sua utilização devem ser definidos na primeira vez que são mencionados no texto e também nos resumos e em cada tabela e figura, exceto no caso das unidades de medida.

Nomes de medicamentos

Deve ser utilizada a Designação Comum Internacional (DCI) de fármacos em vez de nomes comerciais de medicamentos. Quando forem utilizadas marcas registadas na investigação, pode ser mencionado o nome do medicamento e o nome do laboratório entre parêntesis.

Página do título

Na primeira página do manuscrito deve constar:

- 1) o título (conciso e descritivo);
- 2) um título abreviado (com um máximo de 40 caracteres, incluindo espaços);
- 3) os nomes dos autores, incluindo o primeiro nome (não incluir graus académicos ou títulos honoríficos);
- 4) a filiação institucional de cada autor no momento em que o trabalho foi realizado;
- 5) o nome e contactos do autor que deverá receber a correspondência, incluindo endereço, telefone, fax e e-mail;
- 6) os agradecimentos, incluindo fontes de financiamento, bolsas de estudo e colaboradores que não cumpram critérios para autoria;
- 7) contagens de palavras separadamente para cada um dos resumos e para o texto principal (não incluindo referências, tabelas ou figuras).

Autoria

Como referido nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", a autoria requer uma contribuição substancial para:

- 1) conceção e desenho do estudo, ou obtenção dos dados, ou análise e interpretação dos dados;
- 2) redação do manuscrito ou revisão crítica do seu conteúdo intelectual;
- 3) aprovação final da versão submetida para publicação.

A obtenção de financiamento, a recolha de dados ou a supervisão geral do grupo de trabalho, por si só, não justificam autoria.

É necessário especificar na carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho. Esta informação será publicada.

Exemplo: José Silva concebeu o estudo e supervisionou todos os aspetos da sua implementação. António Silva colaborou na conceção do estudo e efetuou a análise dos dados. Manuel Silva efetuou a recolha de dados e colaborou na sua análise. Todos os autores contribuíram para a interpretação dos resultados e revisão dos rascunhos do manuscrito.

Nos manuscritos assinados por mais de 6 autores (3 autores no caso das cartas ao editor), tem que ser explicitada a razão de uma autoria tão alargada.

É necessária a aprovação de todos os autores, por escrito, de quaisquer modificações da autoria do artigo após a sua submissão.

Agradecimentos

Devem ser mencionados na secção de agradecimentos os colaboradores que contribuíram substancialmente para o trabalho mas que não cumpram os critérios para autoria, especificando o seu contributo, bem como as fontes de financiamento, incluindo bolsas de estudo.

Resumos

Os resumos de artigos de investigação original, publicações breves, revisões quantitativas e series de casos devem ser estruturados (introdução, métodos, resultados e conclusões) e apresentar conteúdo semelhante ao do manuscrito.

Os resumos de manuscritos não estruturados (revisões não quantitativas e casos clínicos) também não devem ser estruturados.

Nos resumos não devem ser utilizadas referências e as abreviaturas devem ser limitadas ao mínimo.

Palavras-chave

Devem ser indicadas até seis palavras-chave, em português e em inglês, nas páginas dos resumos, preferencialmente em concordância com o Medical Subject Headings (MeSH) utilizado no Index Medicus. Nos manuscritos que não apresentam resumos as palavras-chave devem ser apresentadas no final do manuscrito.

Introdução

Deve mencionar os objetivos do trabalho e a justificação para a sua realização.

Nesta secção apenas devem ser efetuadas as referências indispensáveis para justificar os objetivos do estudo.

Métodos

Nesta secção devem descrever-se:

- 1) a amostra em estudo;
- 2) a localização do estudo no tempo e no espaço;
- 3) os métodos de recolha de dados;
- 4) análise dos dados.

As considerações éticas devem ser efetuadas no final desta secção.

Análise dos dados

Os métodos estatísticos devem ser descritos com o detalhe suficiente para que possa ser possível reproduzir os resultados apresentados.

Sempre que possível deve ser quantificada a imprecisão das estimativas apresentadas, designadamente através da apresentação de intervalos de confiança. Deve evitar-se uma utilização excessiva de testes de hipóteses,

com o uso de valores de p, que não fornecem informação quantitativa importante. Deve ser mencionado o software utilizado na análise dos dados.

Considerações éticas e consentimento informado

Os autores devem assegurar que todas as investigações envolvendo seres humanos foram aprovadas por comissões de ética das instituições em que a investigação tenha sido desenvolvida, de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial (www.wma.net).

Na secção de métodos do manuscrito deve ser mencionada esta aprovação e a obtenção de consentimento informado, quando aplicável.

Resultados

Os resultados devem ser apresentados, no texto, tabelas e figuras, seguindo uma sequência lógica.

Não deve ser fornecida informação em duplicado no texto e nas tabelas ou figuras, bastando descrever as principais observações referidas nas tabelas ou figuras. Independentemente da limitação do número de figuras propostos para cada tipo de artigo, só devem ser apresentados gráficos quando da sua utilização resultarem claros benefícios para a compreensão dos resultados.

Apresentação de dados numéricos

A precisão numérica utilizada na apresentação dos resultados não deve ser superior a permitida pelos instrumentos de avaliação.

Para variáveis quantitativas as medidas apresentadas não deverão ter mais do que uma casa decimal do que os dados brutos.

As proporções devem ser apresentadas com apenas uma casa decimal e no caso de amostras pequenas não devem ser apresentadas casas decimais.

Os valores de estatísticas teste, como t ou f_{02} , e os coeficientes de correlação devem ser apresentados com um máximo de duas casas decimais.

Os valores de p devem ser apresentados com um ou dois algarismos significativos e nunca na forma de $p=NS$, $p<0,05$ ou $p>0,05$, na medida em a informação contida no valor de P pode ser importante. Nos casos em que o valor de p é muito pequeno (inferior a 0,0001), pode apresentar-se como $p<0,0001$.

Tabelas e figuras

As tabelas devem surgir após as referências. As figuras devem surgir após as tabelas.

Devem ser mencionadas no texto todas as tabelas e figuras, numeradas (numeração árabe separadamente para tabelas e figuras) de acordo com a ordem em que são discutidas no texto.

Cada tabela ou figura deve ser acompanhada de um título e notas explicativas (ex. definições de abreviaturas) de modo a serem compreendidas e interpretadas sem recurso ao texto do manuscrito.

Para as notas explicativas das tabelas ou figuras devem ser utilizados os seguintes símbolos, nesta mesma sequência:

*, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡.

Cada tabela ou figura deve ser apresentada em páginas separadas, juntamente com o título e as notas explicativas.

Nas tabelas devem ser utilizadas apenas linhas horizontais.

As figuras, incluindo gráficos, mapas, ilustrações, fotografias ou outros materiais devem ser criadas em computador ou produzidas profissionalmente.

As figuras devem incluir legendas.

Os símbolos, setas ou letras devem contrastar com o fundo de fotografias ou ilustrações.

A dimensão das figuras é habitualmente reduzida a largura de uma coluna, pelo que as figuras e o texto que as acompanha devem ser facilmente legíveis após redução.

Na primeira submissão do manuscrito não devem ser enviados originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como películas de raios-X. As figuras, criadas em computador ou convertidas em formato eletrónico após digitalização devem ser inseridas no ficheiro do manuscrito.

Uma vez que a impressão final será a preto e branco ou em tons de cinzento, os gráficos não deverão ter cores. Gráficos a três dimensões apenas serão aceites em situações excepcionais.

A resolução de imagens a preto e branco deve ser de pelo menos 1200 dpi e a de imagens com tons de cinzento ou a cores deve ser de pelo menos 300 dpi.

As legendas, símbolos, setas ou letras devem ser inseridas no ficheiro da imagem das fotografias ou ilustrações.

Os custos da publicação das figuras a cores serão suportados pelos autores.

Em caso de aceitação do manuscrito, serão solicitadas as figuras nos formatos mais adequados para a produção da revista.

Discussão

Na discussão não deve ser repetida detalhadamente a informação fornecida na secção dos resultados, mas devem ser

discutidas as limitações do estudo, a relação dos resultados obtidos com o observado noutras investigações e devem ser evidenciados os aspetos inovadores do estudo e as conclusões que deles resultam.

É importante que as conclusões estejam de acordo com os objetivos do estudo, mas devem ser evitadas afirmações e conclusões que não sejam completamente apoiadas pelos resultados da investigação em causa.

Referências

As referências devem ser listadas após o texto principal, numeradas consecutivamente de acordo com a ordem da sua citação. Os números das referências devem ser apresentados entre parêntesis. Não deve ser utilizado software para numeração automática das referências.

Pode ser encontrada nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" uma descrição pormenorizada do formato dos diferentes tipos de referencias, de que se acrescentam alguns exemplos:

1. Artigo

. Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increase risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

2. Artigo com Organização como Autor

. The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing.safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 64:282-4.

3. Artigo publicado em Volume com Suplemento

. Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1:275-82.

4. Artigo publicado em Número com Suplemento

payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

5. Livro

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers;1996.

6. Livro (Editor(s) como Autor(es))

Norman IJ, Redfern SJ, editores. *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone;1996.

7. Livro (Organização como Autor e Editor) Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington: The Institute;1992.

8. Capítulo de Livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. 2nd ed. New York: Raven Press;1995. p. 465-78.

9. Artigo em Formato Eletrónico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Devem ser utilizados os nomes abreviados das publicações, de acordo com o adotado pelo Index Medicus. Uma lista de publicações pode ser obtida em <http://www.nlm.nih.gov>. Deve ser evitada a citação de resumos e comunicações pessoais.

Os autores devem verificar se todas as referências estão de acordo com os documentos originais.

Anexos

Material muito extenso para a publicação com o manuscrito, designadamente tabelas muito extensas ou instrumentos de recolha de dados, poderá ser solicitado aos autores para que seja fornecido a pedido dos interessados.

Conflitos de interesse

Os autores de qualquer manuscrito submetido devem revelar no momento da submissão a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência.

Essa informação será mantida confidencial durante a revisão do manuscrito pelos avaliadores externos e não influenciará a decisão editorial mas será publicada se o artigo for aceite.

Autorizações

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores devem ter em sua posse os seguintes documentos que poderão ser solicitados pelo corpo editorial:

- consentimento informado de cada participante;
- consentimento informado de cada individuo presente em fotografias, mesmo quando forem efetuadas tentativas de ocultar a respetiva identidade;

- transferência de direitos de autor de imagens ou ilustrações;
- autorizações para utilização de material previamente publicado;

- autorizações dos colaboradores mencionados na secção de agradecimentos.

Apêndices

Glossário

Codão stop: sequência de três nucleotídeos no DNA ou mRNA que representa a instrução para o término da transcrição ou tradução, respetivamente.

Electroporação: é um processo no qual, através da aplicação externa de um campo elétrico, se obtém um aumento significativo da condutividade elétrica e permeabilidade da membrana plasmática das células.

Mutação:

- ***in-frame***: mutação que não causa alteração do padrão de leitura em triplete do genoma, podendo contudo levar à síntese de uma proteína anormal.

- ***frame-shift***: mutação genética causada por inserções ou deleções na sequência de DNA, de um número de nucleotídeos não divisível por três. Devido ao facto de a expressão génica por codões ocorrer em tripletos, as inserções ou deleções referidas podem alterar o padrão de leitura, isto é o agrupamento dos codões, resultando numa tradução completamente diferente da original.

- ***missense***: mutação pontual na qual um único nucleotídeo é alterado, resultando num codão que codifica para um aminoácido diferente. A proteína resultante pode ser ou não funcional.

- ***nonsense***: mutação pontual na sequência de DNA que origina um codão stop prematuro, ou um codão *nonsense* no transcrito de mRNA, resultando na produção de uma proteína truncada, incompleta e, geralmente, não funcional.

Mutagénese: criação de alteração na sequência de DNA.

Plasmídeo: pequena molécula de DNA circular que se replica independentemente do genoma.

Skipping: pular

Spliceossoma: grande complexo composto por várias ribonucleoproteínas (entre as quais ribonucleoproteínas nucleares pequenas – snRNPs- U1, U2, U5 e U4/6) responsável por dirigir o processo de *splicing*.

Splicing: processo em que enzimas processadoras do RNA removem todos os intrões no transcrito de RNA (transcrito primário), tornando-o mais curto (transcrito secundário).

Tradução do mRNA: processo pelo qual a sequência de nucleotídeos de uma molécula de RNA mensageiro dirige a incorporação de aminoácidos em proteínas; ocorre no ribossoma.

Transfecção: processo de introdução propositada de material genético em células.

Transgene: gene ou material genético transferido, naturalmente ou por técnicas de engenharia genética, a partir de um organismo para outro.

Distrofia Muscular de Duchenne - Revisão de Casos Seguidos na Consulta de Pediatría do Centro Hospitalar São João

Introdução

No âmbito da tese de mestrado realizada afigurou-se pertinente a realização de uma revisão dos doentes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) seguidos na consulta de Pediatría do Centro Hospitalar São João. Assim, o objetivo desta casuística é descrever as características desses doentes e avaliar a possibilidade de tratamento com estratégias terapêuticas inovadoras.

Métodos

Com a cooperação do Dr. Miguel Leão (Coordenador da Unidade de Neuropediatría), Dr.^a Esmeralda Rodrigues (Unidade de Doenças Hereditárias do Metabolismo do Serviço de Pediatría) e Departamento de Genética do Hospital de São João foi possível obter uma listagem de 11 doentes seguidos por distrofinopatia na consulta de Pediatría desse hospital, nos últimos 12 anos.

Dos 11 doentes referidos, 2 foram excluídos por não possuírem diagnóstico de DMD (diagnosticados com Distrofia Muscular de Becker e α -Distroglicanopatia) e 2 devido ao facto de o processo clínico não estar disponível, resultando na inclusão de 7 doentes.

Caracterização dos doentes

A amostra de doentes avaliada compreendeu crianças do sexo masculino, cuja média de idades é de 8,04 anos, variando entre 2 anos e 6 meses e 14 anos.

Relativamente à razão que motivou a referenciação dos doentes à consulta de Pediatría foi, num dos casos, no contexto de seguimento prévio noutra especialidade por outra patologia, tendo sido, após avaliação inicial pelo pediatra, levantada a suspeita de DMD. Nos restantes indivíduos a suspeita foi levantada e, por consequência foram referenciados, em metade dos casos, por alterações do desenvolvimento motor (nomeadamente hipotonia e fadiga) e nos restantes, por alterações analíticas em exame de rotina ou por outra causa. Em nenhum dos casos existia história familiar. A idade média de diagnóstico foi de 2,86 anos (variando de 17 meses até 5 anos).

Em todos os doentes foi realizada biópsia muscular e estudo genético. Em apenas um dos doentes não foi identificada a mutação específica devido ao facto de, na época em que o teste foi realizado, o método de pesquisa da mutação ser diferente do atual e possuir menor sensibilidade para a deteção destas mutações. Em 5 dos 7 doentes (71,43 %), a mutação identificada foi uma

deleção e todas elas na região *hotspot*. No outro doente identificou-se uma duplicação (14,29 %).

Em relação à evolução clínica, apenas 2 dos 7 doentes (28,57 %) apresentam declínio progressivo da função motora. Os restantes indivíduos mantêm quadro clínico estável, um dos quais (indivíduo F) se encontra a fazer aquisições lentas e progressivas da capacidade motora (de acordo com a idade).

Em todos os doentes em análise, exceto o indivíduo E que não apresenta alterações, estão descritas alterações de desenvolvimento geral nomeadamente cognitivas (défice na abstração, características disléxicas), dificuldade na motricidade grossa e grafomotricidade e sociais (dificuldades de integração social e marginalização) que condicionam a necessidade de apoio a nível de ensino especial, suportes educativos e apoio psicológico e de tarefa.

Quanto ao atingimento de outros órgãos, apenas um doente apresenta doença respiratória e nenhum dos doentes apresenta envolvimento cardíaco.

Relativamente ao tratamento instituído, a fisioterapia faz parte do tratamento de 6 dos 7 doentes e a hidroterapia está incluída no tratamento de 4 doentes. Apenas um dos doentes utiliza ortótese, nomeadamente no tornozelo-pé. Apenas 3 dos 7 doentes estão medicados com corticoterapia, fazendo esquema alternante de prednisolona (os indivíduos D e G, 20 dias *on*/10 dias *off*, e o indivíduo C em períodos alternados de 10 dias).

Os dados recolhidos encontram-se expostos no Quadro 1.

Discussão

Apesar do reduzido número de doentes incluídos nesta revisão, é possível verificar que os resultados estão de acordo com os descritos na literatura, nomeadamente no que se refere à idade de diagnóstico, à forma de apresentação e complicações associadas a esta patologia, ao método de diagnóstico e às alterações genéticas mais comumente encontradas.

Apenas o doente com idade e estágio da doença mais avançados apresenta atingimento do sistema respiratório e nenhum dos doentes incluídos apresenta envolvimento cardíaco. Estes achados estão de acordo com o descrito na literatura, nomeadamente atingimento respiratório na primeira década de vida e envolvimento cardíaco clinicamente evidente após os dez anos de idade, afetando cerca de um terço dos doentes com 14 anos e todos os doentes com 18 anos. Contudo, seria de esperar que um maior número de doentes apresentasse atingimento cardíaco. Tal não se verificou, provavelmente, devido ao tamanho reduzido da amostra e também à idade precoce dos indivíduos.

Nesta revisão é também evidente a importância de tratamentos de reabilitação muscular.

Tem sido descrito que o tratamento com glucocorticoides prolonga a deambulação durante dois a três anos, preserva a função respiratória e reduz a incidência de escoliose e cardiomiopatia em doentes que toleram a terapêutica a longo prazo, e que deve ser instituído nos

estádios precoces da doença (preferencialmente pelos quatro a seis anos de idade). Esta terapêutica tem-se mostrado eficaz nos doentes descritos já que 2 dos 3 pacientes mantêm função muscular estável, e aquele cuja evolução tem sido desfavorável pode ser explicado pelo facto de o tratamento ter sido iniciado tardiamente (por recusa do cuidador), pouco tempo antes da recolha dos dados e quando o doente já se encontrava em fase de declínio.

Tendo em conta que a grande maioria dos doentes descritos nesta revisão apresenta deleção em região *hotspot* do gene *dmd*, podemos inferir que serão possíveis candidatos a terapêuticas genéticas nomeadamente ao *skipping* de exões. Esta técnica consiste na utilização de oligonucleotídeos *antisense* (sequências de 20 a 30 nucleotídeos homólogos do exão alvo ou próximo dele) que se ligam ao local alvo do gene *dmd* impedindo a normal formação do spliceossoma, resultando em remoção dessa zona do pré-ácido ribonucleico mensageiro (pré-mRNA). Como resultado, obtém-se uma distrofina internamente truncada cuja funcionalidade depende da função da zona excluída, convertendo-se um fenótipo grave de DMD num fenótipo ligeiro de distrofia muscular de Becker.

Conclusão

Apesar dos muitos avanços conseguidos nos últimos anos, a evolução clínica dos indivíduos com DMD, tal como a qualidade de vida, continua a ser desfavorável.

Contudo, o envolvimento de equipa multidisciplinar no tratamento destes doentes permite otimizar os recursos existentes de modo a minorar as consequências desta patologia, sendo portanto uma abordagem fundamental.

Tendo em conta que os ensaios clínicos experimentando novas abordagens terapêuticas têm obtido resultados muito promissores, torna-se importante, após a documentação da alteração genética específica, avaliar a possibilidade de inclusão de doentes com esta patologia em estudos clínicos. Por forma a facilitar o seu reconhecimento, é também fundamental que exista uma rede organizada de codificação e referenciação destes doentes.

Quadro 1- Caracterização dos doentes com Distrofia Muscular de Duchenne

Nome	Idade	Idade de		Forma clínica de apresentação	História familiar	Biópsia muscular	Estudo genético	Evolução clínica	Caracterização clínica	Desenvolvimento	Tratamento instituído
		início dos sinais	idade ao diagnóstico								
A	12A	7M	1A + 5M	Referenciado por Oftalmologia, para avaliação por Pediatria, devido a aniridia e cataratas. Na avaliação identificou-se hipertonia membros inferiores, hipertrofia gemelar, ROTs normais. Estudo analítico: TGO 175 U/L, TGP 178 U/L, DHL 519 U/L, CK 3752 U/L, Aldolase 5,88U/L.	Pai com aniridia, cataratas (fez cirurgia) e glaucoma. CK normal. Irmã de 10A foi estudada não se tendo encontrado alterações.	10.05.2000: Músculo de aspeto global moderadamente alterado. Imunohistoquímica com expressão subsarcolémica de Dys 1, 2 e 3 ténue e irregular, o mesmo acontecendo com sarcoglicanos α , β , γ e δ – Distrofia muscular congénita, provavelmente Síndrome Walker-Warburg (a correlacionar com quadro clínico).	09.02.2001: Deleção <i>in-frame</i> nos exões 45-49 do gene da distrofina.	Estável; sem limitação muscular aparente.	- Cirurgia a cataratas aos 7A; - Obesidade desde os 7A; - Desenvolvimento motor normal; - Hipertrofia gemelar, diminuição da força muscular contra resistência, ROTs normais; - Hipovisão; - Sem envolvimento respiratório ou cardíaco.	Dificuldades de aprendizagem devido a desatenção e inquietude.	- Fisioterapia, início de utilização de ortótese tornozelo-pé aos 11A (uso prévio de talas posteriores durante 1 ano); - Hidroterapia; - Iniciou aos 11A Dorzolamida/ Timolol + Latanoprost (1 gota 12/12h).

B	14A	3A + 8M	4A + 1M	Fadiga isolada. Na avaliação clínica identificou-se proeminência bilateral da região gemelar, sinal de Gower +. Realização de estudo analítico que mostrou CK 1532 U/L, Aldolase 128,8 U/L.	Ausente.	26.06.2001: Músculo de aspeto global muito alterado. Imunohistoquímica com expressão de Dys 1, 2 e 3 negativa.	06.09.2002: Não foram detetadas deleções ou duplicações no gene da distrofina. (40% das mutações podem ser subtis e não detetadas pelos métodos utilizados).	Declínio progressivo (agravamento do estado geral)	- Perda de deambulação aos 7A; - Cirurgia para correção de escoliose aos 13A; - Padrão de doença pulmonar restritiva aos 11A, com FVC de 54%; - Deformidade torácica importante, hiporreflexia generalizada, RCP flexores, hálux valgus. Má perfusão periférica; - Obstipação; - Sem envolvimento cardíaco.	- Dificuldades de aprendizagem associadas a défice na abstração, características disléxicas e dificuldade na grafomotricidade - necessita de apoio a nível de ensino especial e suportes educativos (uso de computador e adaptação de formas de avaliação); - Dificuldades de integração social e marginalização - apoio psicológico e de tarefaira.	-Fisioterapia; -Hidroterapia; -BiPAP noturno, Ambu intermitente e Acapella®; imunização anti- <i>influenza</i> ; - Complexo polivitamínico, cálcio (1+ ½) e leite de magnésio. (- Não fez terapêutica com corticoides).
C	7A	9M	2A + 1M	Atraso de desenvolvimento motor (aos 9M não sentava. Aos 12M senta sem apoio, ângulos poplíteos e adutores aumentados). Realiza estudo analítico que	Ausente. Tem 2 irmãos, um dos quais foi investigado (por possível hipotonia proximal global) não tendo sido	16.02.2005: Músculo de aspeto global muito alterado. Imunohistoquímica com expressão de Dys 1, 2 e 3 negativa.	29.12.2005: Estudo de Síndrome de X frágil: negativo. 22.05.2006: Deleção dos exões 48-52 no gene da	Declínio progressivo	- Hiperlordose lombar sem desvios laterais da coluna vertebral evidentes, pseudohipertrofia gemelar, hipotonia de todos os	Ligeiro atraso global do desenvolvimento (locomotricidade grossa e coordenação visuo-motora, nomeadamente na expressão	- Fisioterapia desde 11M; - Hidroterapia; - Terapia ocupacional; - Terapia da fala (suspensa aos 5A); - Proposta de

				mostra TGO 308 U/L, TGP 132 U/L, DHL 1170; CK 19329 U/L.	detetadas alterações.		distrofina.		membros, força muscular 3+ (exceto extensão joelhos 3/3- e dorsiflexão 3/3); - Marcha de base alargada, dificuldade em subir degraus e sentar, sinal de Gower +. - Osteoporose coluna lombar e fémur aos 7A; - Sem envolvimento cardíaco.	grafomotora) – necessidade de apoio de ensino especial.	início de corticoide aos 4A que a mãe recusou até aos 6A – iniciou Prednisolona 0,75 mg/Kg/d em períodos alternados de 10 dias.
D	12A	5A	5A	Alterações de enzimas hepáticas em estudo analítico de rotina: TGP 376 U/L, DHL 3290 U/L, CK 28009 U/L.	Ausente. Mãe rastreada em 25.08.2006; não portadora de alterações somáticas no gene da distrofina. Irmão saudável.	02.11.2005: Músculo de aspeto global muito alterado. Imunohistoquímica com expressão de Dys 1, 2 e 3 negativa.	17.05.2006: Deleção exões 45-54 do gene da distrofina.	Estável.	- Pseudohipertrofia gemelar, sinal de Gower +, força muscular 4+, ROTs mais débeis; - Dificuldade em subir escadas - Obesidade; - DMO diminuída apenas na coluna lombar aos 10A; - Sem envolvimento respiratório ou cardíaco.	-Necessidade de alternativas de avaliação e ocupação (evitar a sobrecarga de escrita ou permitir mais tempo para os testes se necessário); - Isolamento e marginalização social - necessidade de apoio psicológico.	- Fisioterapia; - Hidroterapia; - Inicia corticoterapia aos 7A. Atualmente com Prednisolona 0,57 mg/Kg/d, 20 dias <i>on/10</i> dias <i>off</i> ; - Esomeprazol; - Início aos 10A de Cálcio + Colecalciferol (1/2 por dia).

E	3A + 9M	2A	2A	Alterações de enzimas hepáticas em estudo analítico de rotina: TGO 135 U/L, TGP 180 U/L, DHL 1621 U/L, CK 3072 U/L.	Ausente. Irmão de 8A saudável.	19.08.2010: Músculo de aspeto global muito alterado. Imunohistoquímica com expressão de Dys 1, 2 e 3, sarcoglicanos α , β , γ e δ , merosina e α -dystroglicanos normal – Distrofia muscular indeterminada.	18.10.2010: Deleção dos exões 45-47 do gene da distrofina.	Estável.	- Pseudohipertrofia gemelar, sinal Gower -; - Desenvolvimento motor normal.	- Sem alterações.	- Aos 3A opta-se por não iniciar ainda corticoterapia.
F	2A + 6M	5M	17M	Hipotonia identificada aos 5M e sem controlo cefálico aos 7M. Aos 11M identifica-se hipotonia axial, polegares adutos. Em estudo analítico: CK 11526 U/L, TGO 221 U/L, TGP 216 U/L	Ausente.	21.12.2010: Músculo de aspeto geral moderadamente alterado. Imunohistoquímica com expressão de Dys 1, 2 e 3 ténue e irregular em algumas fibras e ausente nas restantes - DMD vs DMB	21.01.2011: Deleção dos exões 51-55 no gene da distrofina.	Estável (fazer aquisições lentas e progressivas)	- Atraso motor, quedas frequentes, pseudohipertrofia gemelar, ROTs rotulianos + e simétricos; - Asma; - Hipertrofia amigdalina e adenoideia (proposto para cirurgia); - Sem envolvimento cardíaco.	- Atraso global do desenvolvimento.	- Fisioterapia desde os 11M; - Budesonido + Montelukaste (1 por dia). (- opta-se por não iniciar ainda corticoterapia)
G	5A	3A + 7M	4A	Alterações de enzimas hepáticas em estudo analítico (por recorrência ao serviço de urgência por retorragias):	Ausente.	17.02.2011: Músculo de aspeto globalmente muito alterado. Imunohistoquímica com expressão de	18.05.2011: Duplicação nos exões 53-60 do gene da distrofina.	Estável.	- Ligeiro atraso do desenvolvimento, pseudohipertrofia gemelar, sinal de Gower -, marcha	- Imaturidade na psicomotricidade e competências sociais, com tendência para se alhear, com	- Fisioterapia; - Terapia da fala; - Iniciou corticoterapia aos 4A: Prednisolona,

TGO 537 U/L, TGP 759 U/L, DHL 1832 U/L.	Dys 1, 2 e 3 negativa.	autônoma; sobe e desce escadas; - Hipertrofia adenoamigdalina e otite média com efusão (realizou cirurgia aos 5A); - Obstipação; - Sem envolvimento cardíaco e sem osteoporose.	interesses particulares e défice de atenção, agravado por défice auditivo (Síndrome de Asperger em estudo); - Necessita de apoio para estimulação global, principalmente na psicomotricidade e linguagem, apoio de ensino especial e apoio psicológico.	12,5 mg/d, 20 dias <i>on/</i> 10 dias <i>off</i> ; - Sucralfato;
Em 10.02.2011: CK 18298 U/L, DHL 1363 U/L, TGO 386 U/L, TGP 631 U/L.				

Legenda: BiPAP: *Bilevel Positive Airway Pressure*; CK: Creatina cínase; DHL: Desidrogenase láctica; DMB: Distofia Muscular de Becker; DMD: Distrofia Muscular de Duchenne; Dys: Distrofina; RCP: Reflexo calcâneo-plantar; ROTs: Reflexos osteotendinosos; TGO: Transaminase glutâmico-oxalacética, TGP: Transaminase glutâmico-pirúvica.