



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tânia Cristina Marques Costa

Relatórios de Estágio sob a orientação da Professora Doutora Ana Miguel Matos e da Dra. Maria do Carmo Moço e Monografia intitulada “Diagnóstico e Terapêutica da Distrofia Muscular de Duchenne” sob a orientação do Professor Doutor Sérgio Simões referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tânia Cristina Marques Costa

Relatórios de Estágio sob a orientação da Professora Doutora Ana Miguel Matos e da Dra. Maria do Carmo Moço e Monografia intitulada “Diagnóstico e Terapêutica da Distrofia Muscular de Duchenne” sob a orientação do Professor Doutor Sérgio Simões referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2023

Eu, Tânia Cristina Marques Costa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2018294705, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Diagnóstico e Terapêutica da Distrofia Muscular de Duchenne” apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 8 de setembro de 2023.

Tânia Cristina Marques Costa

(Tânia Cristina Marques Costa)

Agradecimentos

Aos meus pais, por acreditarem e me apoiarem em todos os meus sonhos.

Ao meu irmão Pedro e à Neuza, por me fazerem rir quando devia estudar.

Ao Gabriel, por ser o abraço que dá cor aos dias.

Às minhas amigas de sempre, Telma e Vera, por, mesmo estando longe, estarem perto.

Às amigas que Coimbra me deu, Bea, Naida e Sara, por darem um brilho especial a Coimbra.

À Professora Doutora Ana Miguel Matos e a toda a equipa do LACUC, pela forma doce com que me receberam e ensinaram.

À Dra. Maria do Carmo e a toda equipa da Farmácia Moço, pela boa disposição, simpatia e ensinamentos.

Ao Professor Doutor Sérgio Simões, pela dedicação e orientação ao longo da escrita da monografia.

A Coimbra, a cidade dos estudantes, por cinco anos maravilhosos.

A todos, obrigada.

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Análises Clínicas

Lista de Abreviaturas	7
Lista de Figuras	8
1. Nota Introdutória	9
2. Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra	9
3. Análise SWOT	10
3.1 Pontos Fortes (Strengths)	10
3.1.1 Acompanhamento contínuo e autonomia gradual.....	10
3.1.2 Sistema informático Appolo®.....	10
3.1.3 Passagem por todas as valências	11
3.2 Pontos Fracos (Weaknesses)	12
3.2.1 Reduzido número de utentes	12
3.2.2 Duração do estágio.....	12
3.3 Oportunidades (Opportunities)	12
3.3.1 Aplicação e consolidação de conhecimentos teóricos	12
3.3.2 Aprofundamento da componente laboratorial.....	13
3.3.3 Elaboração de trabalhos extra.....	13
3.4 Ameaças (Threats)	13
3.4.1 Localização do laboratório.....	13
3.4.2 Lacunas na formação académica	14
4. Casos Práticos	14
5. Considerações Finais	18
6. Referências Bibliográficas	19
Anexos	20

Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	27
Lista de Figuras	28
Lista de Tabelas	28
1. Nota Introdutória	29
2. Farmácia Moço	29
3. Análise SWOT	29
3.1 Pontos Fortes (Strengths)	30
3.1.1 Equipa, acompanhamento contínuo e autonomia gradual.....	30
3.1.2 Sistema informático Sifarma 2000® e Novo Sifarma®.....	30
3.1.3 Contacto com todos os tipos de prescrições	31
3.1.4 Formação contínua.....	31
3.1.5 Serviços farmacêuticos.....	31
3.1.6 Diversidade de funções executadas	33
3.2 Pontos Fracos (Weaknesses)	33
3.2.1 Receitas manuais e regimes de comparticipação	33
3.3 Oportunidades (Opportunities)	34
3.3.1 Aplicação e consolidação de conhecimentos.....	34
3.3.2 Aquisição de novos conhecimentos.....	35
3.3.3 Rastreio cardiovascular e de intolerância à lactose.....	35

3.4 Ameaças (<i>Threats</i>)	36
3.4.1 Lacunas na formação acadêmica	36
3.4.2 Inexperiência e insegurança no aconselhamento	37
3.4.3 Associação da designação comercial à Denominação Comum Internacional	37
3.4.4 Medicamentos esgotados e alterações frequentes do PVP e do design	37
4. Casos Práticos	38
5. Considerações Finais	40
6. Referências Bibliográficas	41
 Parte III – Diagnóstico e Terapêutica da Distrofia Muscular de Duchenne	
Lista de Abreviaturas	43
Lista de Figuras	44
Lista de Tabelas	44
1. Introdução	47
1.1 Epidemiologia	47
1.2 Manifestações Clínicas	47
1.3 Etiologia	48
1.4 Patogênese	49
1.5 Genética	49
1.6 Herança genética	49
2. Diagnóstico	50
2.1 Diagnóstico pré-concepcional	50
2.1.1 Mutação herdada	51
2.1.2 Mutação espontânea	52
2.1.3 Opções a considerar	52
2.2 Diagnóstico pré-natal	53
2.2.1 Opções a considerar	53
2.3 Diagnóstico pós-natal	54
2.3.1 Teste do pezinho	54
2.3.2 Teste de creatina cinase	54
2.3.3 Teste da bochechinha	54
2.3.4 Biópsia muscular	55
3. Cuidados multidisciplinares	56
3.1 Cuidados respiratórios	56
3.2 Cuidados cardíacos	56
3.3 Cuidados ortopédicos	56
3.4 Cuidados gastrointestinais	57
3.5 Cuidados neurológicos	57
4. Terapêutica	57
4.1 Glucocorticosteroides	57
4.2 <i>Readthrough</i> do códon de terminação prematuro	58
4.3 Exão <i>skipping</i>	59
4.4 Terapia gênica	60
4.4.1 Reparação de genes	61
4.4.2 Adição de genes	62
5. Considerações Finais	63
6. Referências Bibliográficas	64

PARTE I

Relatório de Estágio em Análises Clínicas

Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra

The logo for lacuc (Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra) features the lowercase letters 'lacuc' in a bold, sans-serif font. The letters are filled with a horizontal color gradient: 'l' is green, 'a' is teal, 'c' is blue, 'u' is purple, and 'c' is dark purple.

Sob a orientação da Professora Doutora Ana Miguel Matos

Lista de Abreviaturas

COVID-19: Doença por Coronavírus 2019 (do inglês, *Coronavirus Disease-2019*)

CPSE: ChromID CPS Elite

DSTs: Doenças Sexualmente Transmissíveis

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

LACUC: Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Rh: Rhesus

RPR: Teste rápido de reagina plasmática (do inglês, *Rapid Plasm Reagin*)

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratória Aguda Grave-Coronavírus-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2*)

SWOT: Pontos fortes, Pontos fracos, Oportunidades e Ameaças (do inglês, *Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*)

UC: Universidade de Coimbra

Lista de Figuras

Figura 1 – Análise SWOT (<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>).....	10
Figura 2 – Controlo positivo com reagentes A (esquerda) e B (direita)	20
Figura 3 – Controlo positivo com reagente A (imagem microscópica)	20
Figura 4 – Controlo positivo com reagente B (imagem microscópica).....	20
Figura 5 – Controlo negativo com reagentes A (esquerda) e B (direita).....	21
Figura 6 – Controlo negativo com reagente A (imagem microscópica).....	21
Figura 7 – Controlo negativo com reagente B (imagem microscópica)	21
Figura 8 – Utente com reagentes A (esquerda) e B (direita).....	22
Figura 9 – Utente com reagente A (imagem microscópica).....	22
Figura 10 – Utente com reagente B (imagem microscópica).....	22
Figura 11 – Colónias grandes, azuis e mucosas no meio CPSE.....	23
Figura 12 – Resultado do API 20E.....	23
Figura 13 – Leitura do API 20E.....	23
Figura 14 – Resultado do ATB UR EU.....	24
Figura 15 – Leitura do ATB UR EU	24
Figura 16 – Diluições RPR.....	25

I. Nota Introdutória

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) compreende a realização de estágio curricular no quinto, e último, ano. Além do estágio em Farmácia Comunitária, que por ser fundamental é obrigatório, é dada ao aluno a oportunidade de contactar com outra área do seu interesse. A meu ver, a possibilidade de experienciar outra saída profissional é uma mais-valia, dando ao aluno uma perceção real do quotidiano dos profissionais da área e tendo um papel importante na sua preparação como futuro farmacêutico.

Assim, uma vez que a minha candidatura ao MICF se deveu em parte à curiosidade e expectativa pelas Análises Clínicas, decidi realizar estágio no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), entre os dias 09 de janeiro e 31 de março de 2023, sob a orientação da Professora Doutora Ana Miguel Matos.

O seguinte relatório inclui uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) relativa ao estágio desenvolvido no LACUC, bem como alguns casos clínicos com os quais me deparei no laboratório ao longo destes três meses.

2. Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra

O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra iniciou a sua atividade em outubro de 1983 na Faculdade de Farmácia, tendo sido transferido para o piso 2 do antigo edifício da Faculdade de Medicina, localizado no Pólo I da Universidade de Coimbra (UC), durante a época pandémica de COVID-19, onde se mantém atualmente. ¹

O LACUC não só dispõe a toda a comunidade todas as valências das análises clínicas (química clínica, imunologia, hematologia e microbiologia) como ainda apoia a investigação e a formação académica. A equipa multidisciplinar é constituída por Farmacêuticos Especialistas em Análises Clínicas, Técnicos Superiores de Saúde e Assistentes Técnicas que se encontram no laboratório de segunda a sexta entre as 8.30h e as 18h. Durante este horário é possível realizar a colheita de sangue venoso e recolha de outras amostras biológicas, desde urina e fezes a exsudados das mucosas (nasal, faríngea, uretral, vaginal), que auxiliam o rastreio, diagnóstico e monitorização clínica. ¹

3. Análise SWOT

A análise SWOT apresentada reflete a minha experiência enquanto estagiária no LACUC, proporcionando uma visão geral sobre os Pontos Fortes (*Strenghts*) e Fracos (*Weaknesses*), as Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) destes três meses de estágio. A análise pode ser efetuada tanto a nível interno, com o intuito de desenvolver os pontos fortes e minimizar os pontos fracos inerentes ao estágio, quanto a nível externo, visando explorar as oportunidades e atenuar as ameaças exteriores ao estágio.

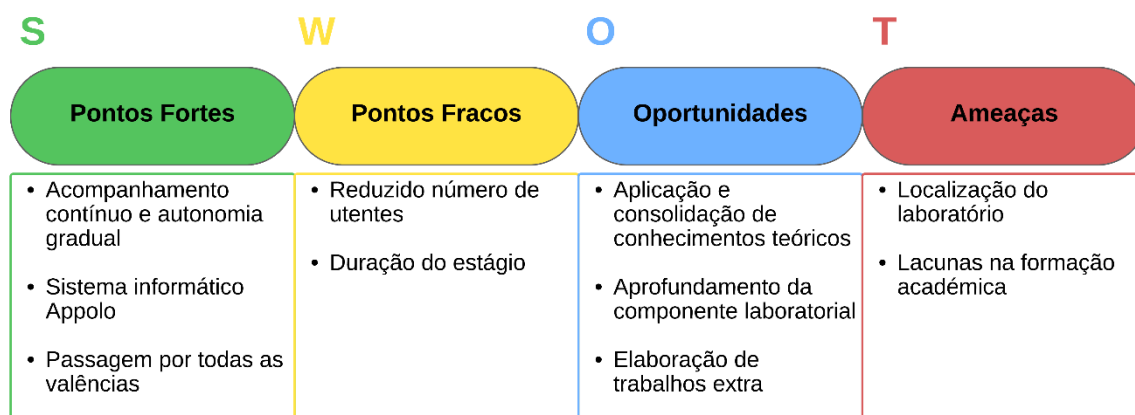


Figura I – Análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*)

3.1 Pontos Fortes (*Strenghts*)

3.1.1 Acompanhamento contínuo e autonomia gradual

Desde o primeiro dia do meu estágio que me senti acolhida e integrada na equipa do LACUC, uma equipa dinâmica e dedicada. Sempre sob supervisão de um elemento da equipa, fui incentivada a realizar as tarefas de forma cada vez mais autónoma, relembrando, aprendendo e aperfeiçoando as diferentes técnicas. O ambiente de constante atenção e entreajuda na equipa permitiram-me ainda ter a confiança para pedir ajuda, esclarecer dúvidas que iam surgindo não só na prática, mas também na observação e a não ter receio de errar.

Enquanto estagiária, tenho a certeza que a equipa com que partilhei o laboratório nestes três meses teve um papel inquestionável no meu desenvolvimento profissional, mas também pessoal.

3.1.2 Sistema informático Appolo®

O sistema informático Appolo® é uma ferramenta utilizada diariamente no LACUC em todas as fases das análises clínicas. A fase pré-analítica compreende o registo dos utentes e a

inscrição das análises no sistema, a fase analítica a introdução dos resultados e a pós-analítica a validação biopatológica dos mesmos.

Ao ser uma ferramenta intuitiva possibilitou uma fácil compreensão do sistema e das suas funcionalidades e, por consequência, um manuseamento rápido e eficiente do programa. Assim, considero que ter tido a possibilidade de conhecer este sistema, que era desconhecido por mim até então, será uma mais-valia se futuramente contactar com o mesmo ou semelhantes.

3.1.3 Passagem por todas as valências

As análises clínicas compreendem três fases, tendo ao longo do meu estágio no LACUC oportunidade de contactar maioritariamente com duas delas, a fase pré-analítica e a fase analítica. A terceira e última fase consiste na análise crítica dos resultados, onde se avalia a necessidade de repetição das análises ou, por exemplo, da realização de esfregaços sanguíneos, e na validação biopatológica dos mesmos, apenas efetuada pelas doutoras especialistas em análises clínicas.

As primeiras semanas do meu estágio incidiram na fase pré-analítica, nomeadamente no atendimento e registo dos utentes no sistema Appolo. Porém, tive oportunidade de assistir à colheita de sangue, onde compreendi que fazer as perguntas certas ao utente pode possibilitar um melhor entendimento dos resultados obtidos na fase analítica. Assim, iniciar o estágio nesta fase permitiu-me contactar com os utentes, mas também relembrar as diferenças entre os tubos e seus anticoagulantes e assistir à colheita de sangue em locais que não o braço, por exemplo sangue das orelhas para um estudo da Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física.

A maioria do meu estágio sucedeu-se na fase analítica, onde tive possibilidade de contactar com todas as valências (hematologia, microbiologia, imunologia e bioquímica), através da realização de hemogramas, esfregaços de sangue, uro e coproculturas, leitura de tiras de Combur, observação de sedimentos urinários, diagnóstico de infeções virais (por exemplo HIV, VHC, VHB), determinação de parâmetros bioquímicos, entre outros, e com a biologia molecular, mediante realização de testes COVID-19 e pesquisa de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs).

Assim, considero essencial a passagem pela fase pré-analítica e analítica para um estágio completo e uma perceção geral de todo o processo que engloba as análises clínicas.

3.2 Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1 Reduzido número de utentes

Devido à pandemia de COVID-19 houve a necessidade do LACUC transferir as instalações, do polo III para o polo I da Universidade de Coimbra, e centrar a sua atenção na realização de testes de rastreio, diagnóstico e monitorização da infeção pelo SARS-CoV-2. Após tempos instáveis, os números da infeção desceram e, em outubro de 2022, o laboratório reabriu todas as valências das análises clínicas, já anteriormente realizadas no polo III. ²

Assim, estando apenas há cinco meses em total funcionamento, o número de utentes é ainda reduzido, com conseqüente baixo número de colheitas e amostras e existência de momentos de menor trabalho. Porém, os “tempos mortos” são preenchidos com a realização de tarefas práticas, por exemplo a realização de esfregaços sanguíneos ou de fórmulas leucocitárias, de modo a aproveitar o tempo livre para aprimorar a prática laboratorial.

3.2.2 Duração do estágio

O estágio no LACUC teve uma duração de três meses e, embora tenha tido oportunidade de experienciar todas as valências, reconheço que não foi tempo suficiente para desenvolver a autonomia necessária em todas elas. Apesar de ter tirado o máximo partido do estágio, considero que uma duração superior teria sido benéfica para consolidar novos conceitos teóricos e aperfeiçoar a prática laboratorial.

A título de exemplo, embora compreenda tanto o fundamento teórico como o protocolo prático na determinação do tempo de protrombina, no método da coagulação sanguínea, não tive prática suficiente para realizar a técnica autonomamente.

3.3 Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1 Aplicação e consolidação de conhecimentos teóricos

A realização deste estágio foi fundamental para aplicar e consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do meu percurso académico no MICEF, nomeadamente nas unidades curriculares: Microbiologia Geral, Bacteriologia, Parasitologia, Virologia, Bioquímica Hematologia e Imunologia.

A adaptação da minha formação base à prática laboratorial quotidiana permitiu-me conjugar a vertente teórica com a realidade profissional e compreender alguns conceitos teóricos até então um pouco incompreendidos. Além disso, a aquisição de novos

conhecimentos noutras áreas, por exemplo Micologia, na qual tive oportunidade de realizar o teste da blastese, constituiu um ponto de valorização adicional na minha formação.

3.3.2 Aprofundamento da componente laboratorial

O plano curricular do MICF abrange diversas unidades curriculares de forte componente prática, entre as quais unidades muito direcionadas para as análises clínicas. Assim, a realização diária e quase exclusiva de tarefas laboratoriais permitiu-me recordar e colocar em prática os conhecimentos adquiridos nas aulas prático-laboratoriais do MICF.

Ao longo destes três meses houve espaço para aperfeiçoar antigas competências, uma vez que algumas técnicas executadas apenas uma ou duas vezes durante o meu percurso académico foram efetuadas inúmeras vezes num só dia de estágio, por exemplo a leitura de tiras de Combur e a observação de sedimentos urinários, mas também para desenvolver novas aptidões técnicas, por exemplo a realização de coproculturas.

3.3.3 Elaboração de trabalhos extra

No decurso do meu estágio foi dada a todas as estagiárias a oportunidade de redigir e apresentar trabalhos sobre diversos temas, mas que estivessem, de certa forma, relacionados à área das análises clínicas.

Na minha perspetiva, estes trabalhos foram de grande relevância uma vez que me permitiram aprofundar e consolidar conhecimentos, mas também aprimorar algumas competências técnicas (*hard skills*), através da elaboração de materiais digitais de acompanhamento às apresentações orais, e pessoais (*soft skills*), por exemplo melhoria da minha capacidade de comunicação verbal. Além disso, a possibilidade de receber *feedback* de todas as colaboradoras do laboratório, tal como de assistir às apresentações das outras estagiárias, proporcionaram um ambiente de constante aprendizagem e pensamento crítico.

3.4 Ameaças (*Threats*)

3.4.1 Localização do laboratório

O LACUC localiza-se no polo I da Universidade de Coimbra, no ponto central da comunidade académica, porém, o número de estudantes que recorre a este serviço é reduzido. Uma possível causa poderá ser a falta de divulgação junto dos mesmos. Assim, uma solução poderia passar pela divulgação do laboratório pelos núcleos de estudantes das

respetivas faculdades, por exemplo através de publicações nas redes sociais, o que potenciará a divulgação do laboratório já feita pelos e-mails enviados pela UC.

O facto de o laboratório estar inserido no meio da comunidade académica, torna-o, muitas vezes, despercebido à restante população. Além disso, o difícil estacionamento devido ao elevado movimento e confusão nesta zona é para muitos um fator decisivo na escolha do local a realizar análises. Assim, uma forma de aumentar o número de utentes fora da comunidade académica a utilizar o serviço do LACUC poderia passar pela abertura de postos de colheita em diversas zonas de Coimbra e posterior transporte para o laboratório.

A pouca adesão por parte dos estudantes, tal como o desconhecimento e o difícil acesso da restante comunidade a este serviço, resultaram num reduzido número de amostras diárias, que se traduziram num baixo fluxo de trabalho.

3.4.2 Lacunas na formação académica

Apesar de considerar o plano curricular do MICF muito completo e abrangente para as diversas saídas profissionais, reconheço que, devido à variedade do ramo farmacêutico, os conteúdos lecionados para algumas áreas nem sempre são suficientes.

No que toca à área das análises clínicas o plano é bem delineado, porém senti falta de uma maior atenção na área da Micologia, abordada brevemente em Microbiologia Geral. No entanto, compreendo a incapacidade por parte da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra de fornecer uma abordagem mais específica de todas as possíveis áreas, o que me incentivou a procurar novos conceitos e explicações para os conteúdos não abordados ou pouco compreendidos até então.

A formação em análises clínicas pode ser complementada com a realização do Mestrado em Análises Clínicas na FFUC, o qual compreende cadeiras não lecionadas no MICF como Interpretação de Dados Laboratoriais, Gestão de Qualidade Laboratorial, Genética Molecular Humana, Micologia Clínica, entre outros. ³

4. Casos Práticos

Caso Prático I

No dia 23 de fevereiro de 2023, um utente do sexo masculino dirigiu-se ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra para realizar algumas análises, entre as quais a determinação do grupo sanguíneo.

Como é prática em todos os indivíduos Rhesus (Rh) negativos, foi realizado o teste do D fraco ou do DU a partir de uma amostra de sangue total com o intuito de inferir a presença de expressão do antígeno D à superfície dos eritrócitos, mesmo que de forma reduzida.

De maneira a haver um controlo positivo e um controlo negativo utilizou-se parte do sangue total de dois indivíduos do sexo feminino de grupo sanguíneo conhecido. Além disso, para cada indivíduo foram realizadas duas determinações utilizando dois reagentes diferentes, o da casa comercial A e o da casa comercial B. Tanto o reagente A como o reagente B possuem anticorpos anti-D que reconhecem o antígeno D à superfície das hemácias, porém, pesquisam diferentes epítomos do antígeno.

Como esperado, o controlo positivo apresentou um resultado positivo, evidenciado pela presença de aglutinação eritrocitária, tanto usando o reagente A como o reagente B. O controlo negativo estava ausente de aglutinação e, portanto, negativo, para ambos os reagentes (Anexo I, Figura I-6).

O utente obteve resultados não coincidentes com o uso dos diferentes reagentes. O uso do reagente A indicou um resultado positivo, com presença de aglutinação eritrocitária, o que não aconteceu com o reagente B, que continuava a atribuir um resultado negativo, sem aglutinação (Anexo I, Figura 7-9). Este resultado sugere a presença do epítomo pesquisado pelo reagente A e, como tal, a existência do antígeno D.

Deste caso clínico conclui-se que o utente é Rhesus positivo, o que coincidia com o registado no seu cartão de dador de sangue, e poder-se-á afirmar que é essencial o uso de ambos os reagentes, A e B, de forma a obter um resultado o mais fiável possível e a evitar falsos negativos.

Caso Prático 2

No dia 27 de fevereiro de 2023, uma utente de sexo feminino A dirigiu-se ao LACUC com uma requisição para exame bacteriológico de urina. Para este tipo de exame a utente foi informada de alguns cuidados a ter na colheita, como a necessidade de higienização e recolha do jato intermédio, de forma a aumentar a assepsia da amostra.

Este exame resumiu-se a três etapas. A primeira consistiu em semear a cultura no meio ChromID® CPS® Elite (CPSE). O meio escolhido foi o CPSE pois, além de não seletivo, permite uma identificação presuntiva da espécie ou género bacteriano presente, tendo por base a presença de substratos cromogénicos que mudam de cor quando atuados por determinadas enzimas. Dentro das bactérias mais frequentes nas infeções urinárias temos as estirpes

produtoras de β -glucuronidase e/ou β -galactosidase de *Escherichia coli* a colorir num tom vermelho a bordeaux e as estirpes produtoras de desaminase do grupo PMP (*Proteus*, *Morganella*, *Providencia*) a colorir num tom castanho difuso. Das estirpes produtoras de β -glucosidase podemos ter uma coloração num tom turquesa se *Enterococcus* ou num tom azul a verde se pertencente ao grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*).⁴

A placa contendo o meio encontrava-se à temperatura ambiente e a amostra foi bem homogeneizada antes de se realizar a sementeira junto ao bico, de modo a trabalhar em ambiente assético. A inoculação da amostra de urina foi realizada de acordo com as indicações do fabricante, seguida de uma incubação a 37°C durante 24 horas.

A segunda etapa consistiu na leitura da tira de Combur após imersão da mesma na urina, retirando o excesso e aguardando 1 minuto. A leitura permitiu a determinação de 10 parâmetros: bilirrubina, urobilinogénio, cetonas, glicose, proteínas, hemoglobina, nitritos, pH, densidade e leucócitos. De todos estes é de destacar a elevada presença de glicose, justificada com a história clínica de diabetes e função renal comprometida, e a presença de nitritos. A glicose na urina é passível de facilitar o maior desenvolvimento de bactérias.

A terceira etapa consistiu na observação do sedimento urinário ao microscópio após centrifugação da urina por 15 minutos e rejeição do sobrenadante, deixando apenas 1 mililitro. A análise microscópica permitiu a contagem de células epiteliais, leucócitos e eritrócitos em dez quadrantes, com respetiva média e arredondamento, e ainda a deteção de outros parâmetros, por exemplo bactérias, cristais. A utente tinha presente um elevado número de leucócitos e bactérias, o que era concordante com uma possível infeção urinária.

Após 24 horas a urocultura evidenciava um crescimento 10^7 de colónias grandes, azuis e mucosas (Anexo II, Figura 10), sugestivas do grupo KESC, pelo que se realizou a técnica de Gram de forma a identificar qual o API e o ATB mais indicados. Esta técnica consiste na realização de um esfregaço junto ao bico, utilizando soro fisiológico e colónias bacterianas retiradas do meio CPSE, e posterior coloração. A coloração inicia-se com Violeta de Genciana a colorir de roxo todas as bactérias, seguida do mordente Solutio de Lugol. O Álcool-Acetona retira o roxo das Gram negativas e, após lavagem com água destilada, a Fucsina de Ziehl cora de rosa as bactérias Gram negativas. Após nova lavagem com água destilada e secagem da lâmina observou-se ao microscópio a presença de bacilos Gram negativos, tendo sido escolhido o antibiograma ATB UR EU. Porém foi ainda necessário realizar o teste da oxidase para deteção da presença de citocromo oxidase e distinção entre *Pseudomonas spp* e

enterobactérias. Um resultado negativo no teste da oxidase indicou enterobactérias, tendo sido escolhido o API 20 E para identificação da bactéria em causa.

O API 20 E é um sistema de identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos. A galeria contém 20 microtubos sob os quais é inoculada a suspensão bacteriana e, após incubação de 24 horas, lida a mudança de cor. A leitura de todos os microtubos origina um código indicativo da espécie bacteriana presente, tendo o código 5215773 identificado *Klebsiella pneumoniae spp* (Anexo II, Figura 11-12).^{5,6}

O antibiograma ATB UR EU é uma técnica para determinação da sensibilidade de *Enterobacterales* aos antibióticos. A galeria de 16 pares de cúpulas possui antibióticos distintos testados com uma ou duas concentrações, porém o primeiro par está ausente de antibiótico, funcionando como controlo de crescimento positivo. A galeria é inoculada com a suspensão bacteriana e, após incubação de 24 horas, lida a turvação. Uma estirpe sensível ao antibiótico não apresenta crescimento, pelo que a cúpula se encontra límpida, porém uma cúpula turva indica resistência. Quando concentrações distintas para o mesmo antibiótico apresentam diferentes aspetos, a estirpe é intermédia. A leitura da galeria indicou uma estirpe resistente à ampicilina e à ticarcilina (Anexo II, Figura 13-14).

Por fim realizou-se uma suspensão da *Klebsiella pneumoniae spp* em tripticase de soja com o intuito de guardar na biblioteca bacteriana do laboratório.

Caso Prático 3

No dia 18 de janeiro de 2023, um utente de sexo masculino B dirigiu-se ao LACUC para realizar análises, entre as quais o *Rapid Plasm Reagin* (RPR). Esta técnica manual é usada para identificar pacientes portadores de sífilis, uma doença sexualmente transmissível causada pela bactéria *Treponema pallidum*.

Treponema pallidum é uma bactéria intracelular que provoca lise das células com libertação de cardiolipina e consequente produção de reaginas pelo organismo. O RPR é um teste de aglutinação entre o antigénio cardiolipina e o soro do utente. O resultado é positivo quando há presença de reaginas no soro, porém as reaginas são anticorpos não específicos desta bactéria, pelo que este resultado tem de ser confirmado com um teste mais específico.

Após RPR positivo têm de ser feitas diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e subsequente RPR de cada uma. Uma diluição 1:2 consiste em 100ul de soro do utente + 100ul de soro fisiológico, enquanto uma diluição 1:4 consiste em 100ul da solução 1:2 + 100ul de soro fisiológico, e assim por diante. O utente B obteve o resultado reativo até à diluição 1:16

(Anexo III, Figura 15). É de notar que um título de RPR de 1:16 pode ser falso positivo, podendo dever-se a uma infeção, por exemplo de HIV (o utente tinha prescrição para análise da mesma e o resultado foi negativo). Não tendo o histórico do utente, não era possível saber se o mesmo estava diagnosticado para sífilis, e apenas a monitorizar o tratamento, ou não diagnosticado, sendo necessário um teste confirmatório para a última situação.

Mais tarde, dia 20 de janeiro de 2023, o utente regressou ao LACUC com uma prescrição para *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test*, um teste de imunofluorescência indireta para anticorpos específicos para o *Treponema pallidum* utilizado para confirmar o diagnóstico de sífilis. A amostra foi enviada para um laboratório exterior e o resultado da mesma foi positivo, com título 1:80.

5. Considerações Finais

Dada a abrangência do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, a importância de realizar estágio noutra área, além de Farmácia Comunitária, é inquestionável, tendo sido gratificante aplicar a formação teórica adquirida nos últimos anos, consolidar a prática e adquirir uma perceção mais autêntica do que são as Análises Clínicas.

Durante estes três meses pude conhecer um pouco do que é a realidade profissional, podendo afirmar que foi uma experiência enriquecedora tanto a nível profissional como pessoal e não tendo dúvidas do seu contributo para o meu futuro profissional.

Termino apenas com um agradecimento ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, à Professora Doutora Ana Miguel Matos e a toda a equipa pela oportunidade, acompanhamento e boa disposição.

6. Referências Bibliográficas

1. Quem somos. Accessed March 31, 2023. <https://www.uc.pt/lacuc/quem-somos/>
2. Universidade de Coimbra inaugura espaço do Laboratório de Análises Clínicas. Accessed March 31, 2023. <https://noticias.uc.pt/artigos/universidade-de-coimbra-inaugura-espaco-do-laboratorio-de-analises-clinicas/>
3. Mestrado em Análises Clínicas - FFUC - Cursos - Universidade de Coimbra. Accessed March 31, 2023. https://apps.uc.pt/courses/PT/programme/1352/2023-2024?id_branch=19401#branch-19401
4. Guide R. chromID® CPS® Elite.
5. Gama de galerias API® | bioMérieux Portugal. Accessed March 31, 2023. <https://www.biomerieux.pt/produto/gama-de-galerias-apir>
6. bioMérieux Industry. Api® / Id 32. 2011;33(0).

Anexos

Anexo I

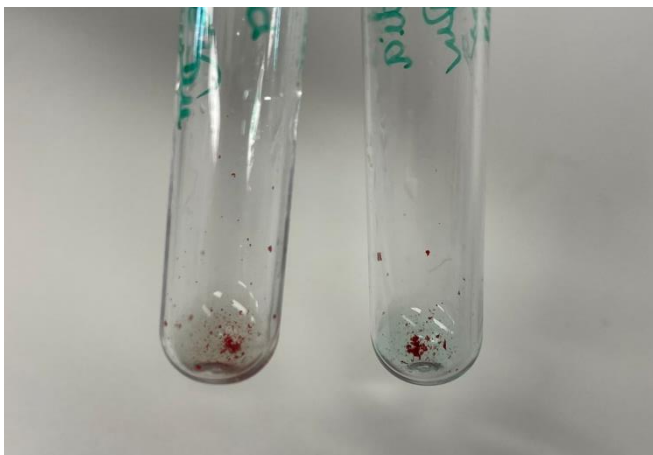


Figura 2 – Controlo positivo com reagentes A (esquerda) e B (direita)

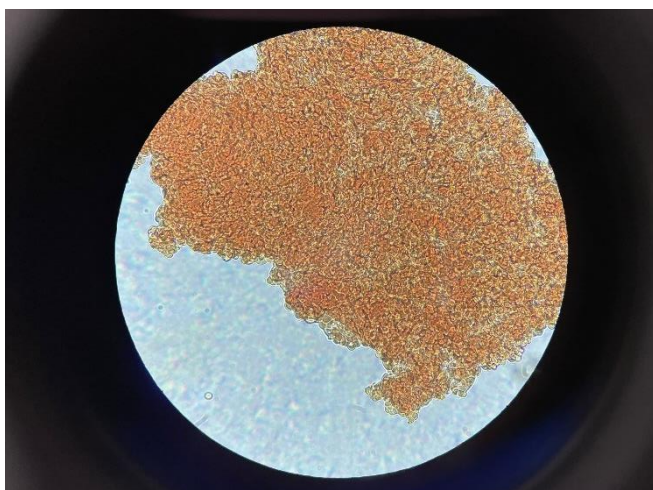


Figura 3 – Controlo positivo com reagente A (imagem microscópica)

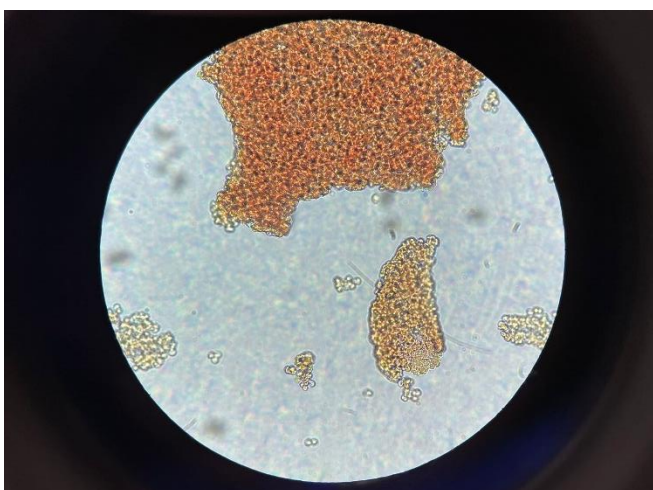


Figura 4 – Controlo positivo com reagente B (imagem microscópica)

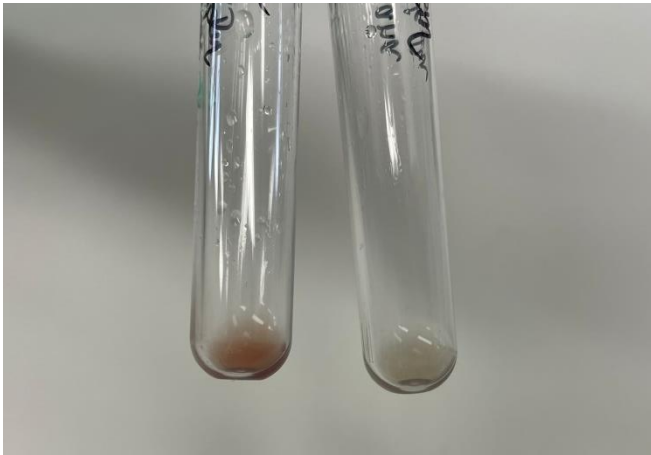


Figura 5 – Controlo negativo com reagentes A (esquerda) e B (direita)

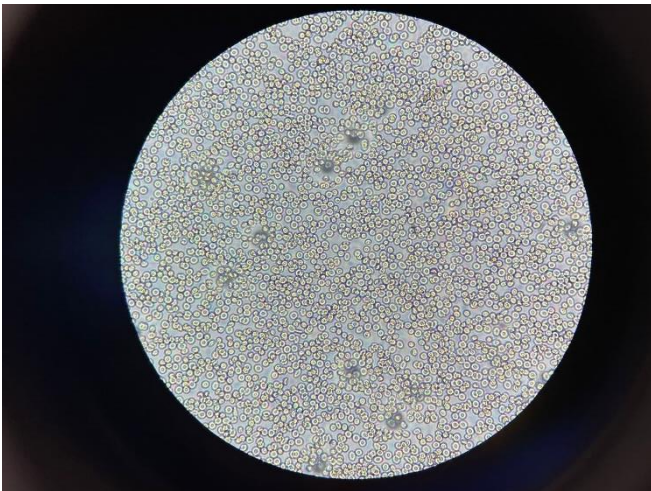


Figura 6 – Controlo negativo com reagente A (imagem microscópica)



Figura 7 – Controlo negativo com reagente B (imagem microscópica)

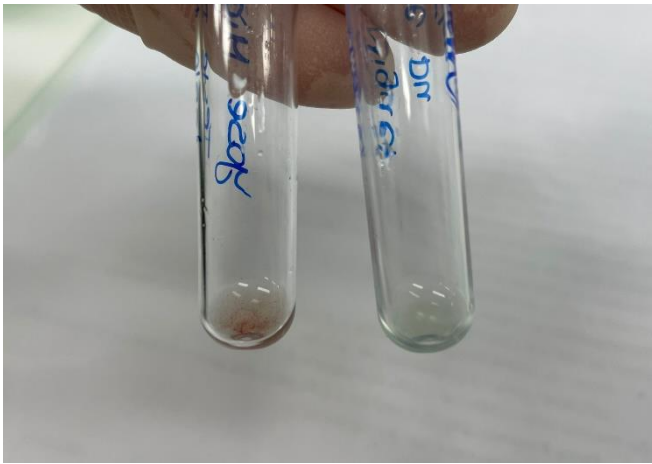


Figura 8 – Utente com reagentes A (esquerda) e B (direita)

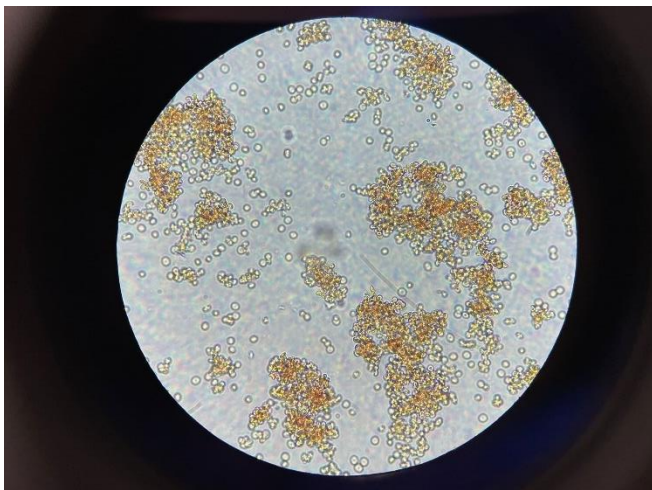


Figura 9 – Utente com reagente A (imagem microscópica)

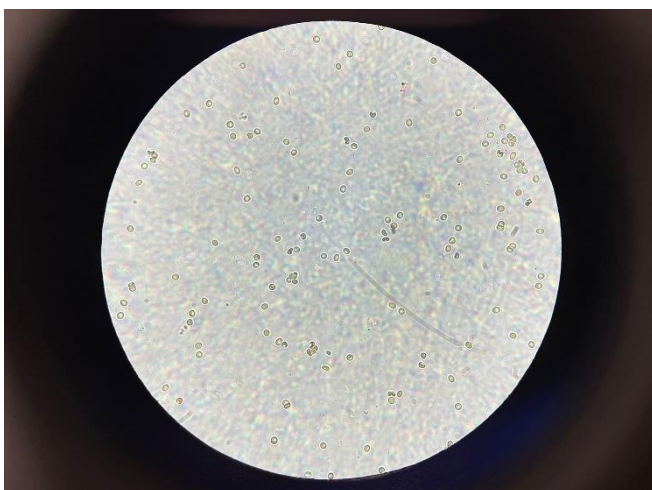


Figura 10 – Utente com reagente B (imagem microscópica)

Anexo II

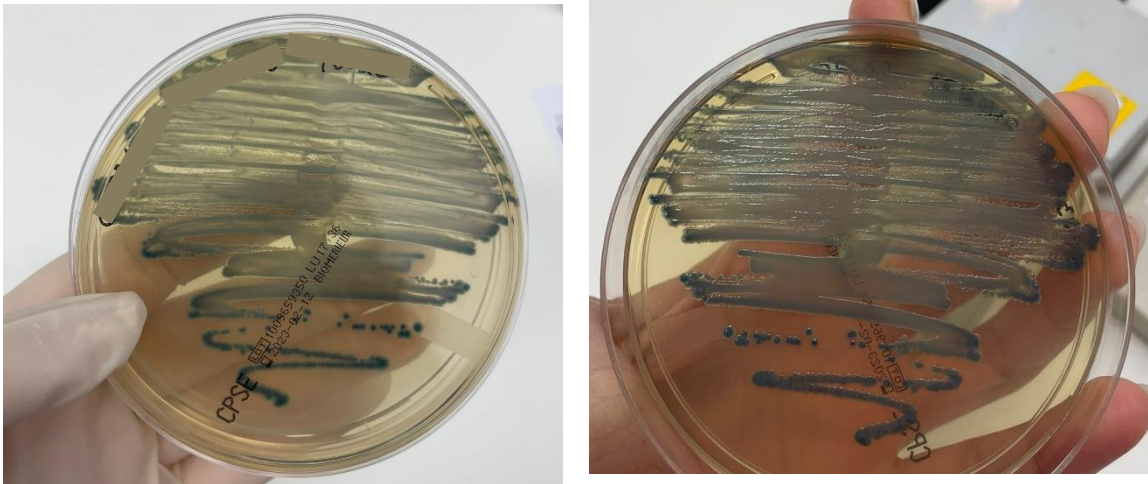


Figura 11 – Colónias grandes, azuis e mucosas no meio CPSE



Figura 12 – Resultado do API 20E

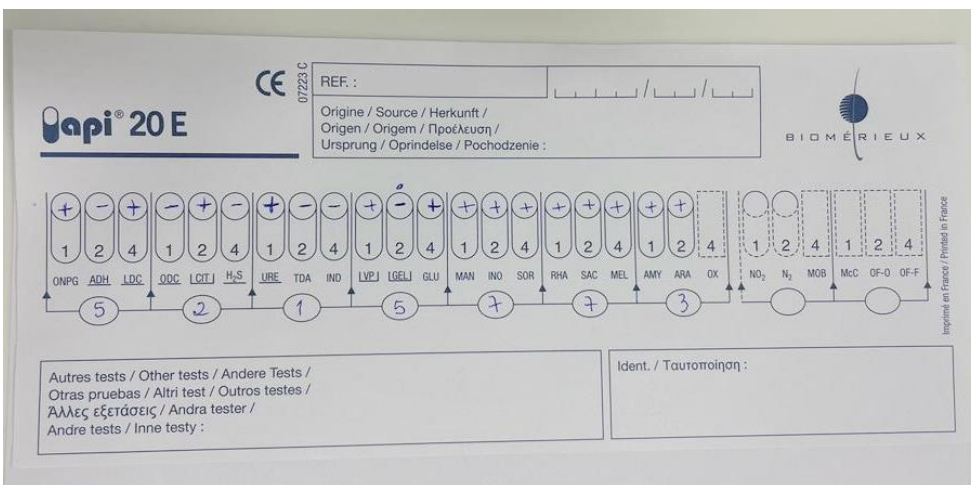


Figura 13 – Leitura do API 20E



Figura 14 – Resultado do ATB UR EU

ATB™ UR EU (08) 15020A - xi - 201002

FICHE DE RESULTATS / RESULT SHEET / ERGEBNISBLATT / HOJA DE RESULTADOS /
 SCHEDE PER LA REGISTRAZIONE DEI RISULTATI / FICHA DE RESULTADOS /
 ΦΥΛΛΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / KARTA WYNIKÓW

ATB UR EU (08) REF 14 338

Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση /
 Pochodzenie

	c	C	R / I / S	c C mg/l
0	●	●		
AMP	●	○	R	8
AMC	○	○	S	8/2
TIC	●	○	R	8
PIC	○	○	S	8
TZP	○	○	S	8/4 - 16/4
CFT	○	○	S	8
CFM	○	○	S	1
CXT	○	○	S	8
CX32	○	○	S	32
CAZ	○	○	S	1 - 8
CTX	○	○	S	1
CXO	○	○	S	4
FEP	○	○	S	1 - 8
IMI	○	○	S	2
GEN	○	○	S	2
TOB	○	○	S	2
AKN	○	○	S	8
NALF	○	○	S	8
NALI	○	○	S	16
NOR	○	○	S	0.5
OFL	○	○	S	0.5
CIP	○	○	S	0.5 - 1
LVX	○	○	S	1
FOS	○	○	S	32
TSU	○	○	S	2/38
FUR	○	○	S	64

Note / Anmerkung / Nota / Σημείωση / Uwagi:

Figura 15 – Leitura do ATB UR EU

Anexo III

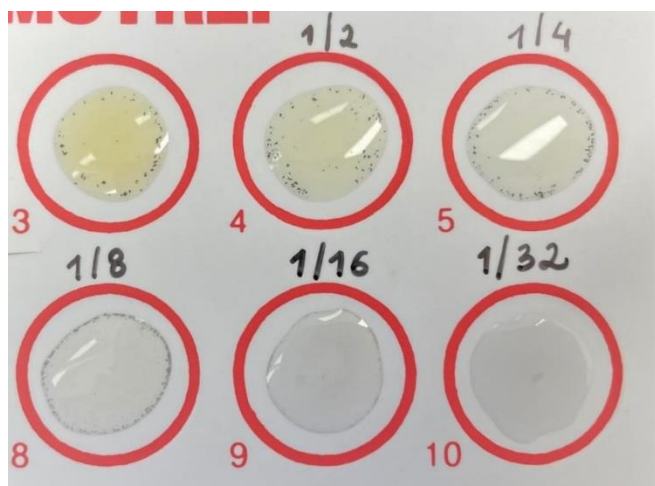


Figura 16 – Diluições RPR

PARTE II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Moço



Sob a orientação da Dra. Maria do Carmo Moço

Lista de Abreviaturas

CPBESA: Centro Paroquial de Bem-Estar Social de Almalaguês

DCI: Denominação Comum Internacional

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MAPA: Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM: Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MNSRM-EF: Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de dispensa Exclusiva em Farmácia

PIM: Preparação Individualizada de Medicação

PVP: Preço de Venda ao Público

SNS: Serviço Nacional de Saúde

SWOT: Pontos fortes, Pontos fracos, Oportunidades e Ameaças (do inglês, *Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*)

UC: Universidade de Coimbra

Lista de Figuras

Figura 1 – Análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*).....30

Figura 2 – Mapa de bem-estar cardiovascular da Apoteca Natura®36

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Resultados rastreio de intolerância à lactose39

1. Nota Introdutória

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) compreende várias etapas na formação farmacêutica, incluindo a realização de estágio curricular em farmácia comunitária.

O estágio é uma parte fundamental da nossa formação enquanto futuros farmacêuticos, pois proporciona uma compreensão do quotidiano da farmácia comunitária e possibilita a aplicação em contextos reais de todo o conhecimento adquirido nos últimos 5 anos.

Assim, foi-me dada a oportunidade de realizar estágio na Farmácia Moço, sob orientação da Dra. Maria do Carmo Moço, num ambiente de profissionalismo e simpatia.

O seguinte relatório consiste numa análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) referente ao estágio desenvolvido na Farmácia Moço, seguida de alguns casos clínicos observados durante o mesmo.

2. Farmácia Moço

A Farmácia Moço teve início em Almalaguês, antes de ser realocada para a Avenida Fernando Namora, em Coimbra, em 2012, onde se mantém atualmente. O facto da farmácia estar localizada numa zona de muito movimento explica a diversidade de utentes com diferentes idades, doenças e necessidades que a frequentam.

A equipa é constituída pela Diretora Técnica, seis Farmacêuticos e um Técnico Superior de Saúde. A farmácia está aberta ao postigo de segunda a sexta entre as 09h e as 21h30, aos sábados das 09h às 20h, aos feriados das 09h às 19h e ainda de 20 em 20 dias durante 24h, de forma a assegurar um serviço permanente.

3. Análise SWOT

A análise SWOT apresentada representa a minha experiência enquanto estagiária na Farmácia Moço, tendo sido realizada a dois níveis, interno e externo, e avaliando 4 parâmetros. Os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*) foram avaliados internamente, enquanto as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) externamente.



Figura 17 – Análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*)

3.1 Pontos Fortes (*Strengths*)

3.1.1 Equipa, acompanhamento contínuo e autonomia gradual

Desde o meu primeiro dia de estágio que me deparei com um ambiente de constante boa disposição e simpatia, profissionalismo e ética tanto para com os utentes bem como entre colegas e estagiários.

Esta equipa jovem e dinâmica acompanhou-me em cada passo do meu estágio, orientando-me em cada tarefa, incentivando-me a realizá-las de forma cada vez mais autónoma e esclarecendo quaisquer dúvidas que iam surgindo.

Enquanto estagiária, tenho a certeza de que cada um dos elementos da equipa tem um impacto positivo na vida dos utentes, tal como teve um papel inquestionável no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

3.1.2 Sistema informático Sifarma 2000[®] e Novo Sifarma[®]

No decorrer do estágio, tive a oportunidade de trabalhar com o sistema informático Sifarma[®] (Sifarma 2000[®] e o novo módulo de atendimento do Sifarma[®]), uma ferramenta de uso diário na maioria das farmácias comunitárias.

A constante utilização das várias funcionalidades do sistema, desde as tarefas de *backoffice* até o atendimento ao balcão, permitiu um manuseamento rápido e eficiente do programa, tornando esse conhecimento uma mais-valia para o futuro.

3.1.3 Contacto com todos os tipos de prescrições

Apesar do aumento evidente das prescrições eletrónicas desmaterializadas, também conhecidas como receitas sem papel, tive a oportunidade de contactar com as prescrições eletrónicas materializadas e prescrições manuais.

Mediante a realização de atendimentos, constatei que as receitas manuais são suscetíveis de gerar não apenas um maior tempo de dispensa, como também um maior número de erros aquando da mesma. No entanto, considero este contacto essencial, uma vez que me permitiu conhecer não só o processo envolvendo este tipo de prescrições, como alguns regimes de participação.

3.1.4 Formação contínua

Enquanto farmacêuticos, é essencial procurarmos constantemente a aquisição e atualização de conhecimentos, tornando essencial uma formação contínua diária.

A Farmácia Moço deu-me a oportunidade de assistir a diversas formações, entre as quais Bioderma®, Cantabria Labs®, Nestlé®, PharmaNord®, Tena®, Uriage®, que me permitiram consolidar conhecimentos quanto a alguns produtos já conhecidos e aprender acerca de produtos estranhos até então.

3.1.5 Serviços farmacêuticos

A farmácia é frequentemente o primeiro local que os utentes procuram para esclarecer quaisquer dúvidas relacionadas ao seu estado de saúde e bem-estar, pelo que tem sido essencial a evolução da profissão farmacêutica no sentido de aumentar e diversificar os serviços prestados pela farmácia.

A Farmácia Moço disponibiliza ao utente uma série de serviços, incluindo a determinação de parâmetros bioquímicos (glicémia, colesterol total e triglicéridos); medição da pressão arterial (três medições com a indicação final da média, Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial (MAPA)); medições de peso; realização de pensos e administração de injetáveis; recolha de radiografias; recolha de medicamentos (Valormed); entrega de medicação ao domicílio, preparação de manipulados e Preparação Individualizada de Medicação (PIM).

Quanto à MAPA, em algumas pessoas a diminuição da pressão arterial não é suficiente durante as horas de repouso noturno, o que resulta num maior risco cardiovascular e pelo que é fundamental medir a sua pressão arterial ao longo de um período de 48h.

Dado que alguns destes serviços podem ser solicitados a qualquer momento do atendimento, considero ter sido essencial a formação prática recebida.

3.1.5.1 Manipulados

Um medicamento manipulado é definido como “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”, com o intuito de responder às necessidades específicas de um utente.¹

Durante o meu estágio na Farmácia Moço, tive a possibilidade de assistir e contribuir para a preparação de alguns manipulados, dentro dos quais uma pomada de enxofre a 7%, para tratamento da sarna ou escabiose humana causada pelo ácaro parasita *Sarcoptes scabiei*, e algumas soluções alcoólicas de ácido bórico à saturação, com ação antisséptica a nível auricular. Para tal, consultou-se o Formulário Galénico Português e deu-se início ao preenchimento da ficha de preparação. Após verificação do bom estado do material de laboratório e das matérias-primas, efetuaram-se os cálculos prévios e procedeu-se à preparação do manipulado. De seguida, verificaram-se as características organolépticas, fez-se o acondicionamento e a rotulagem, e calculou-se o Preço de Venda ao Público (PVP).

Assim, foi-me possível recordar e colocar em prática os conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica.

3.1.5.2 Preparação Individualizada de Medicação

A PIM é um serviço no qual o farmacêutico, seguindo sempre a terapêutica instituída pelo médico, organiza a medicação para toma oral do utente num sistema específico composto por vários compartimentos e que se encontra selado de forma hermética.² Esta abordagem procura garantir o uso correto, seguro e efetivo do medicamento, diminuir os erros e aumentar a adesão terapêutica, especialmente em utentes idosos polimedicados.

A Farmácia Moço realiza a PIM para o Centro Paroquial de Bem-Estar Social de Almalaguês (CPBESA), preparando semanalmente a medicação para todos os utentes do lar e alguns do centro de dia. Além disso, este serviço está igualmente disponível para os utentes que, após visita à farmácia, apresentam dificuldades em cumprir o regime terapêutico.

Desta forma, pude observar o funcionamento da PIM e visualizar o aspeto físico de diversos medicamentos, o que se mostrou útil para identificar a medicação habitual de utentes que nem sempre se conseguem recordar do nome do medicamento, apenas da cor e do formato da embalagem ou do comprimido.

3.1.6 Diversidade de funções executadas

O estágio foi realizado de forma gradual, dividindo-se em três fases distintas e iniciando-se pelas tarefas de *backoffice*. A receção de encomendas, devolução de produtos a fornecedores e arrumação dos produtos por ordem alfabética e prazos de validade, seguindo a regra do *first in, first out*, foram algumas das tarefas realizadas. Durante esta fase, pude explorar o sistema, nomeadamente as fichas dos produtos e a sua informação científica, mas também familiarizar-me com a organização da farmácia e com a localização de todos os produtos.

A segunda fase do estágio foi assinalada pela preparação de pedidos para entrega ao domicílio, o que não só me permitiu aprimorar o processo de atendimento no Sifarma 2000®, como iniciar a interação com os utentes. Os pedidos para entrega ao domicílio são realizados tanto para o centro de dia de Almalaguês como para qualquer utente que necessite, por exemplo utentes mais fragilizados ou incapazes de se deslocarem.

O atendimento ao balcão constituiu a última fase do estágio. Numa fase inicial um colega esteve presente de modo a proporcionar um maior à vontade e confiança, mas também garantir um atendimento correto e completo. Com o passar do tempo foi-me dada maior autonomia, porém pude contar com o apoio de cada colega para esclarecer quaisquer dúvidas.

Deste modo, considero que a estratificação do meu estágio permitiu um desenvolvimento gradual e uma aquisição progressiva dos conhecimentos necessários à fase seguinte.

3.2 Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1 Receitas manuais e regimes de participação

Embora cada vez menos comuns, as receitas manuais ainda são utilizadas em 4 situações excecionais: falências informáticas, inadaptação do prescritor, prescrição no domicílio e quarenta receitas manuais por mês.³ Estas receitas requerem mais tempo no atendimento, pois é necessário verificar se estão aptas para a dispensa, e também porque a caligrafia do

prescritor pode dificultar a leitura. Assim, é necessário redobrar a atenção para evitar a dispensa incorreta dos medicamentos.

Além da comparticipação do Serviço Nacional de Saúde (SNS), o utente pode ainda beneficiar de regimes de comparticipação adicionais. Cada um destes regimes é introduzido no sistema mediante um código, porém, devido ao grande número de regimes existentes, esse processo foi de difícil memorização.

No entanto, à medida que a dispensa deste tipo de receitas, manuais e/ou com regimes de comparticipação, se tornou mais frequente, o atendimento foi ficando mais fácil e menos demorado.

3.3 Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1 Aplicação e consolidação de conhecimentos

Este estágio permitiu-me, principalmente durante o atendimento, aplicar e consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do MICEF, especialmente nas unidades curriculares: Farmacologia Geral, Farmacoterapia, Farmácia Clínica, Indicação Farmacêutica, Serviços Farmacêuticos Clínicos, Dermofarmácia e Cosmética, Preparações de Uso Veterinário, Plantas Medicinais.

Dentre essas áreas, considero que a Dermocosmética, o Uso Veterinário e a Fitoterapia foram aquelas onde senti mais dificuldade. No entanto, os colegas mostraram-se sempre disponíveis em explicar cada produto de cada linear. Além disso, a Farmácia Moço é uma das farmácias Apoteca Natura[®], uma rede de farmácias que não apenas dispõe de uma variedade de produtos naturais, entre eles alguns dispositivos médicos, como disponibiliza formação contínua a profissionais de saúde e promove a realização de rastreios sazonais.⁴ Por conseguinte, a constante presença da vertente fitoterapêutica resultou num maior contacto com a mesma e numa maior diversidade de opções de aconselhamento em terapêuticas naturais, preferidas por alguns utentes.

Assim, a adaptação da vertente teórica à prática diária permitiu-me conjugar a minha formação académica com a realidade profissional.

3.3.2 Aquisição de novos conhecimentos

Além da aplicação e consolidação, também a aquisição de novos conhecimentos noutras áreas, como Ortopedia e Compressão elástica, representou uma mais-valia na minha formação.

Quanto à Compressão elástica, a Farmácia Moço dispõe de uma grande variedade de meias de compressão da marca Sigvaris®, com inúmeras opções de malha e graus de compressão. Estas meias estão disponíveis para ambos os sexos em diversas cores, como cor de pele ou cor preta, em modelos de pé aberto ou de pé fechado, e de diferentes comprimentos: até ao joelho (AD), até à raiz da coxa (AG) ou collants (AT). As meias de compressão são usadas com o intuito de prevenir ou aliviar diversos problemas, como má circulação, varizes, inchaço, entre outros. Consistindo numa compressão regressiva, exercem maior pressão no tornozelo e menor no gêmeo ou coxa, pelo que é essencial a medição das pernas pelo farmacêutico para determinar o tamanho correto e o tipo de malha e grau de compressão mais adequado para cada utente e situação.

Tendo tido oportunidade de fazer estas medições, foi-me ensinada a forma correta de calçar as meias e os cuidados necessários a ter, tais como a lavagem com sabão neutro e a secagem da meia na horizontal, nunca em exposição direta ao calor.

3.3.3 Rastreio cardiovascular e de intolerância à lactose

No decurso do meu estágio, foi-me dada a oportunidade de participar na realização de rastreios cardiovasculares promovidos pela Apoteca Natura®, além de organizar e realizar rastreios de intolerância à lactose, apoiados pela Tecnimed.

A realização do rastreio cardiovascular teve o intuito de sensibilizar as pessoas para os riscos associados às doenças cardiovasculares e incentivar a prevenção por meio da identificação de possíveis fatores de risco, de natureza pessoal ou relacionados ao estilo de vida. Este rastreio consistiu na medição de parâmetros como o perímetro abdominal, a pressão arterial e o colesterol total, juntamente com algumas perguntas sobre a atividade física laboral e nos tempos livres, o tabagismo, a frequência do consumo de frutas ou legumes, entre outros.

Após a introdução dos dados no sistema, obtinha-se um mapa de bem-estar cardiovascular e algumas recomendações. Dando como exemplo o seguinte mapa, a escala varia de 0 a 4, onde quanto mais elevado for o índice de risco, maior será a zona a vermelho.

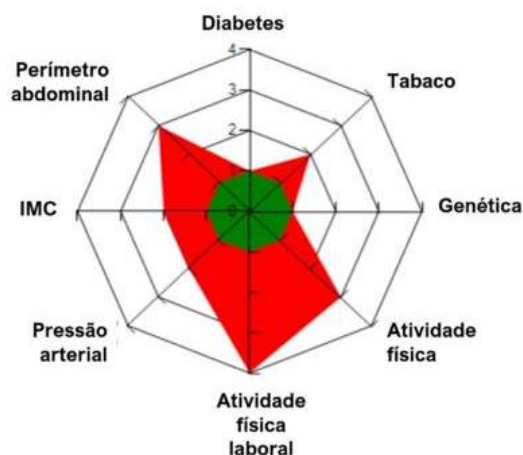


Figura 18 – Mapa de bem-estar cardiovascular da Apoteca Natura®

Neste exemplo concreto, as recomendações incluem a prática de atividade física regular e de uma alimentação equilibrada, para diminuição do excesso de peso, controlo do colesterol, redução do desejo de fumar, entre outros. Para pessoas com pouca atividade física durante as horas laborais, é essencial a prática de exercício físico nos seus tempos livres. Embora não demonstre sintomas perceptíveis, a pressão arterial elevada danifica os vasos sanguíneos com o tempo, agravando o efeito de outros fatores, como o tabagismo. As substâncias tóxicas do tabaco também aumentam a pressão arterial, lesionando os vasos sanguíneos e tornando-os mais suscetíveis à deposição de gordura. Assim, o controlo da pressão arterial, tal como a cessão tabágica são fundamentais.⁵

Relativamente ao rastreio de intolerância à lactose, será descrito no caso prático 3.

No meu ponto de vista, estes rastreios não só foram benéficos para os utentes, como me permitiram aprimorar algumas competências técnicas (*hard skills*), como a determinação da glicemia e do colesterol total e a medição da tensão arterial. Além disso, também contribuíram, nomeadamente os rastreios de intolerância à lactose, para o desenvolvimento de competências pessoais (*soft skills*), dentre as quais o senso de responsabilidade, a capacidade de comunicação e a autonomia.

3.4 Ameaças (*Threats*)

3.4.1 Lacunas na formação académica

O plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas aborda inúmeros temas distintos abrangendo diversas áreas do ramo farmacêutico.

No entanto, em algumas unidades curriculares, os conteúdos lecionados não foram suficientes para um conhecimento e aconselhamento adequados em farmácia comunitária, nomeadamente a nível de produtos de uso veterinário e produtos de higiene oral. Adicionalmente, considero que seria importante incluir unidades curriculares no MICF que abordassem temas como a ortopedia, compressão elástica e produtos oftálmicos.

Contudo, reconheço a impossibilidade do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas em facultar uma abordagem detalhada de todas as áreas, o que me levou não apenas a procurar conhecimentos em novos temas, mas também nos já lecionados.

3.4.2 Inexperiência e insegurança no aconselhamento

O primeiro contacto com os utentes foi assinalado por muito nervosismo e incerteza, nomeadamente durante o aconselhamento de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e de MNSRM de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF), devido à grande diversidade de produtos disponíveis na farmácia e da falta de conhecimento sobre os mesmos.

O contacto diário com estes produtos e a ajuda dos colegas proporcionaram um maior à vontade ao longo dos atendimentos, tornando necessária uma prática e estudo contínuo para responder de forma adequada às diversas situações.

3.4.3 Associação da designação comercial à Denominação Comum Internacional

Ao longo do MICF, o contacto com as designações comerciais dos medicamentos foi limitado, pelo que o tempo que passei no *backoffice* foi muito útil para me familiarizar com algumas marcas e reconhecer os medicamentos pedidos pelos utentes no atendimento, mesmo quando com designações que me eram desconhecidas.

Além disso, a obrigatoriedade de prescrição por Denominação Comum Internacional (DCI) da substância ativa foi também uma grande ajuda, pois facilitou a associação da substância ativa à designação comercial do medicamento.⁶

3.4.4 Medicamentos esgotados e alterações frequentes do PVP e do design

Logo no início do estágio, durante a receção de encomendas, deparei-me com a questão dos medicamentos esgotados. Porém, foi no momento do atendimento que esta questão se tornou mais evidente, já que muitos utentes não conseguiam adquirir os seus medicamentos habituais e recusavam-se a substituí-los pelas opções disponíveis ou, em

algumas situações, não havendo alternativas possíveis. Perante o descontentamento do utente, era difícil explicar que estas faltas eram questões externas à farmácia.

Ao dar entrada de encomendas, deparava-me ainda com alterações no PVP dos medicamentos, sendo necessária a atualização do preço no sistema informático. No entanto, continuava a ser essencial confirmar a alteração do preço durante o atendimento, comparando o preço na embalagem com o do sistema, de modo a evitar erros no valor tanto a faturar como a ser pago pelos utentes. Também nestes casos, os utentes atribuíam culpa à farmácia pela constante alteração dos preços.

A alteração visual das embalagens dos medicamentos é igualmente relevante para alguns utentes, especialmente utentes idosos polimedicados que distinguem a sua medicação pela cor e formato da embalagem. Ocasionalmente, alguns utentes estranhavam tal alteração, solicitando a confirmação por um farmacêutico por eles conhecido.

4. Casos Práticos

Caso Prático 1

No dia 26 de junho de 2023, um utente do sexo masculino A dirigiu-se à Farmácia Moço à procura de algo que aliviasse o pingar constante pelo nariz. Questionei se além do pingar tinha dor de garganta, dor de cabeça, tosse ou febre, ao que respondeu que não. No entanto, referiu a existência de feridas ao redor do nariz devido ao constante assoar.

Apesar do *Allergodil*[®], de princípio ativo azelastina, ter um efeito mais rápido, pode secar um pouco a mucosa⁷. Já o *Vibrocil*[®] anti-histamínico, de princípios ativos maleato de dimetindeno e fenilefrina, tem um efeito mais demorado, mas menos secante⁸. Assim, aconselhei o *Allergodil*[®] juntamente com um *LETIbalm*[®] intranasal, um dispositivo médico de classe I de alto poder hidratante e protetor da mucosa, contendo pantenol, hialuronato de sódio, extrato glicólico de eucalipto, entre outros na sua composição⁹.

Caso Prático 2

No dia 26 de julho de 2023, uma utente do sexo feminino B dirigiu-se à Farmácia Moço à procura de um creme hidratante. Questionei se o creme tinha algum objetivo específico, como cuidado antienvelhecimento, tratamento do acne, rosácea, entre outros, ou se era apenas para hidratação. De seguida, mencionei os três passos essenciais para os cuidados da

pele (limpeza, hidratação e proteção) e constatei que a mesma já utilizava um gel de limpeza da *Cerave*^{®10}, no entanto desconhecia a importância do protetor solar na rotina diária.

Assim, após analisar a pele da senhora e considerar o objetivo pretendido, aconselhei o *age lift* – creme de dia *lift* protetor SPF30 da *Uriage*[®], que já possui alguma proteção solar¹¹. No entanto, ainda forneci algumas amostras de protetor solar SPF50+ para que ela pudesse experimentar e considerar integrar na sua rotina diária.

Caso Prático 3

No dia 30/06 foi realizado na Farmácia Moço o rastreio de intolerância à lactose, um dissacarídeo constituído por glicose e galactose que se encontra no leite e que necessita da enzima lactase, produzida na mucosa intestinal, para ser digerida e absorvida no intestino delgado. Quando há intolerância à lactose, ou seja, quando a enzima lactase não é devidamente produzida ou funcional, a lactose é fermentada no cólon, originando ácidos e gases que causam desconforto e sintomas gastrointestinais.¹²

Para este rastreio foram selecionados utentes que apresentam dor e/ou inchaço abdominal, ruídos intestinais, flatulência, prisão de ventre, diarreia, náuseas e/ou vômitos 30 min a 2 h após o consumo de alimentos com lactose.¹²

O rastreio foi realizado após um período mínimo de 2h de jejum e consistiu na medição da glicémia capilar basal, seguida da ingestão da solução de lactose e novamente medição da glicémia após 10 e 20 min. Uma variação nos níveis de glicémia entre 0 a 20 mg/dl evidencia intolerância à lactose, enquanto um valor superior a 20 mg/dl indica a digestão da lactose, em galactose e glicose, e posterior absorção.

Tabela I – Resultados rastreio de intolerância à lactose

Utente	0 min	10 min	20 min	Varição	Resultado
D	91 mg/dL	111 mg/dL	116 mg/dL	25	Não intolerante
E	105 mg/dL	121 mg/dL	142 mg/dL	37	Não intolerante
F	95 mg/dL	102 mg/dL	122 mg/dL	27	Não intolerante
G	92 mg/dL	92 mg/dL	109 mg/dL	17	Intolerante
H	92 mg/dL	93 mg/dL	92 mg/dL	1	Intolerante
I	87 mg/dL	107 mg/dL	110 mg/dL	23	Não intolerante
J	109 mg/dL	108 mg/dL	130 mg/dL	21	Não intolerante
K	89 mg/dL	104 mg/dL	116 mg/dL	27	Não intolerante
L	91 mg/dL	134 mg/dL	115 mg/dL	43	Não intolerante
M	94 mg/dL	110 mg/dL	116 mg/dL	22	Não intolerante
N	95 mg/dL	102 mg/dL	98 mg/dL	7	Intolerante
O	79 mg/dL	79 mg/dL	84 mg/dL	5	Intolerante

A medição aos 10 min permitiu a inclusão dos utentes com metabolismo mais rápido, que pudessem atingir um pico seguido de uma diminuição até aos 20 min, como foi o caso do utente L. Já a medição aos 20 min possibilitou que os utentes com metabolismo mais lento tivessem tempo de metabolizar a lactose, como é o caso, por exemplo, do utente F. Assim, foi possível reduzir a ocorrência de falsos positivos.

Quatro utentes apresentaram intolerância à lactose (G, H, N, O), tendo sido aconselhadas medidas não farmacológicas aquando presença dos sintomas, por exemplo diarreia e flatulência, como a ingestão de água ou de chás de hortelã-pimenta e camomila, bem como a prática de exercício físico leve. Além disso, aconselhei a substituição diária por produtos sem lactose, juntamente com o uso pontual de *Lisolac*[®].¹²

O *Lisolac*[®] é um suplemento alimentar constituído pela enzima lactase que ajuda na digestão da lactose e na redução dos sintomas associados à sua intolerância, devendo ser tomado em ocasiões pontuais, como bolos em festas e gelados em tardes de verão.¹²

5. Considerações Finais

Dado o inquestionável papel da farmácia comunitária na comunidade, considero a realização de estágio nesta área fundamental, pois permite não só a aplicação da formação teórica adquirida ao longo dos últimos anos à prática quotidiana, como o contacto com os utentes sobre os quais nos dedicámos a estudar.

Assim, durante estes meses, tive a oportunidade de consolidar antigos conhecimentos e adquirir novos, tal como de desenvolver a vertente social e humana.

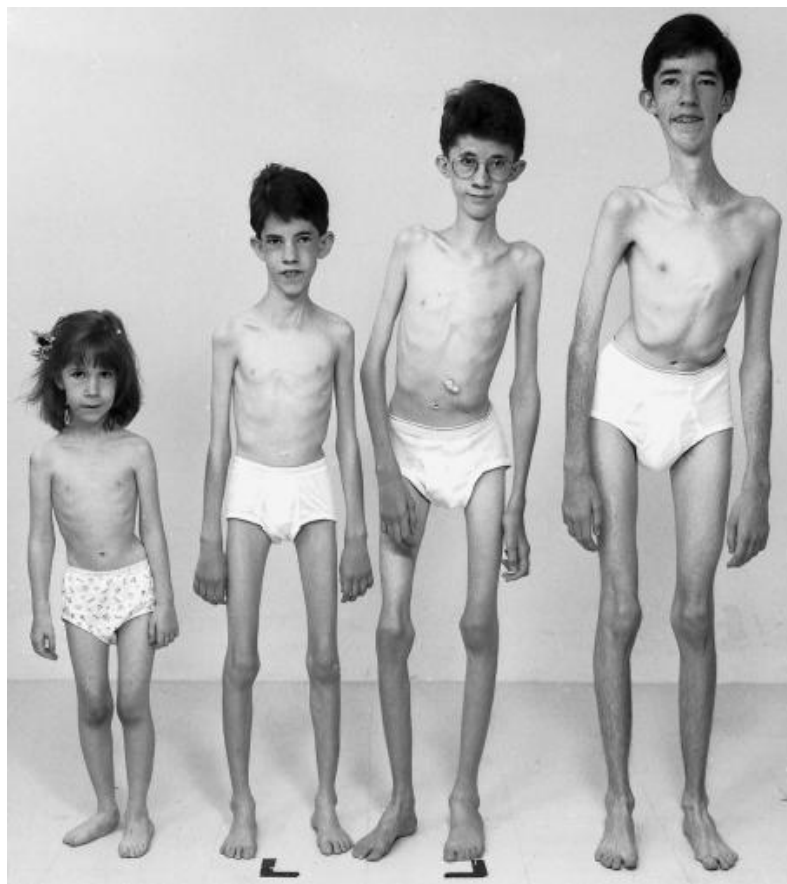
Não poderia terminar sem agradecer à Dra. Maria do Carmo e a toda a equipa, pela simpatia, prontidão em ensinar e disponibilidade em tirar quaisquer dúvidas. Sem dúvida tornaram o fim do meu curso mais bonito e o meu futuro mais promissor.

6. Referências Bibliográficas

1. Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho. *INFARMED - Gabinete Jurídico e Contencioso*. Published online 2004.
2. Norma Geral - Preparação Individualizada da Medicação (PIM). *Ordem dos Farmacêuticos*. Published online 2018.
3. Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde. *Infarmed*.
4. *REGULAMENTO APOTECA NATURA Por Uma Saúde Consciente Para Uma Saúde Consciente*.
5. De Si De Coração C, Espanhola S. *INFORMAÇÃO E CONSELHOS SOBRE SAÚDE CARDIOVASCULAR SIMG SOCIEDAD ITALIANA DE MEDICINA GENERAL Y DE ATENCIÓN PRIMARIA*. www.iss.it
6. Lei n.º 11/2012 de 8 de março. *Diário da República*. Published online 2012.
7. Allergodil spray nasal: alívio rápido da alergia. Accessed August 9, 2023. <https://www.allergodil.pt/pt-pt/produto/spray-nasal>
8. Vibrocil Nebulizador| Vibrocil. Accessed August 9, 2023. <https://www.vibrocil.pt/produtos-vibrocil/vibrocil-nebulizador.html>
9. Reparação - LETIbalm Intranasal Protect | Dermatologia | LETI Pharma. Accessed August 9, 2023. https://www.leti.com/dermatologia/pt/repara%C3%A7%C3%A3o/letibalm-intranasal-protect_1647
10. Creme de Limpeza Facial Hidratante - Pele Sensível Normal | CeraVe. Accessed August 9, 2023. <https://www.cerave.pt/os-nossos-produtos/higiene/creme-de-limpeza-hidratante>
11. AGE LIFT - CREME DE DIA LIFT PROTETOR SPF30 | Uriage. Accessed August 9, 2023. <https://www.uriage.pt/produtos/creme-de-dia-lift-protetor-spf30>
12. LISOLAC — Facilita a digestão da lactose. Accessed August 9, 2023. <https://lisolac.pt/#group2>

PARTE III

Diagnóstico e Terapêutica da Distrofia Muscular de Duchenne



Sob a orientação do Professor Doutor Sérgio Simões

Lista de Abreviaturas

2'OMeP: 2-O-metil-RNA com uma base de fosforotioato

6MWT: Teste de marcha de 6 minutos

AAV: Vírus adeno-associado

AON: Oligonucleótido *antisense*

Array CGH: do inglês, *Array Comparative Genomic Hybridization*

cfDNA: DNA circulante livre de células

cffDNA: DNA fetal circulante

CK: Creatina cinase

CRISPR/Cas9: do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated nuclease 9*

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne

EMA: do inglês, *European Medicines Agency*

FDA: do inglês, *Food and Drug Administration*

iECA: Inibidor da enzima conversora de angiotensina

MLPA: do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NGS: do inglês, *Next Generation Sequencing*

NIPD: Diagnóstico pré-natal não invasivo

nNOS: Sintase de óxido nítrico neuronal

PCR: do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

PMO: Oligómero morfolino de fosforodiamidato

PPMO: Oligómero morfolino de fosforodiamidato conjugado com péptido

RHDO: do inglês, *Relative Haplotype Dosage*

RMD: do inglês, *Relative Mutation Dosage*

XCI: Inativação do cromossoma X

Lista de Figuras

Figura 1 – Proteína distrofina (figura adaptada ²⁰).....	48
Figura 2 – Fluxograma para diagnóstico pós-natal da distrofia muscular de Duchenne (figura adaptada ⁴).....	55
Figura 3 – <i>Readthrough</i> do codão de terminação prematuro. NT, terminal-N; CR, domínio rico em cisteína; CT, terminal-C (figura adaptada ⁴).....	58
Figura 4 – Exão <i>skipping</i> . AON, oligonucleótido <i>antisense</i> ; NT, terminal-N; CR, domínio rico em cisteína; CT, terminal-C (figura adaptada ⁴).....	60
Figura 5 – CRISPR/Cas9. NT, terminal-N; CR, domínio rico em cisteína; CT, terminal-C (figura adaptada ⁴).....	61

Lista de Tabelas

Tabela I – Testes para diagnóstico de mulheres portadoras de mutações no gene da distrofina.....	50
---	----

Resumo

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença muscular degenerativa, onde uma mutação genética resulta na ausência da proteína distrofina. Esta proteína é fundamental para a estrutura e função do músculo, pelo que a sua ausência leva à substituição progressiva das fibras musculares por tecido adiposo e conjuntivo fibroso.

Apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos observados nos últimos anos, ainda não há cura para a DMD. Porém, não deixa de ser essencial diagnosticar precocemente a mutação, seja na fase pré-concepcional, pré-natal ou pós-natal, de modo a disponibilizar o apoio e aconselhamento necessários para a toma de decisões informadas.

A utilização de uma abordagem multidisciplinar, combinada com o uso de terapias que vão desde a desvalorização de codões de terminação prematuros e remoção de exões até à edição ou mesmo adição do gene da distrofina, é ainda fundamental para melhorar a qualidade de vida dos meninos com DMD.

Palavras-chave: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofina, diagnóstico, cuidados multidisciplinares, *readthrough* de codão de terminação, exão *skipping*, CRIPR/Cas9, AAV

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a degenerative muscle disease where a genetic mutation results in the absence of the protein dystrophin. This protein is critical for the structure and function of muscle, so its absence leads to the progressive replacement of muscle fibers by fatty and fibrous connective tissue.

Despite diagnostic and therapeutic advances in recent years, there is still no cure for DMD. However, it is still essential to diagnose the mutation early, whether at the preconception, prenatal or postnatal stage, in order to provide the necessary support and advice for informed decision-making.

The use of a multidisciplinary approach, combined with the use of therapies ranging from readthrough of premature stop codons and removal of exons to editing or even addition of the dystrophin gene, is still key to improving the quality of life of boys with DMD.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy (DMD), dystrophin, diagnosis, multidisciplinary care, stop codon readthrough, exon skipping, CRIPR/Cas9, AAV.

I. Introdução

No século XIX, a distrofia muscular foi identificada como uma condição primária dos músculos, diferenciando-a de doenças nas quais a fraqueza muscular era uma manifestação secundária a doenças neuronais.¹

Inicialmente descrita pelo Dr. Edward Meyron, a distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença muscular degenerativa, nomeada na década de 1860 em homenagem ao Dr. Duchenne de Boulogne.^{2,3} Caracterizada pela perda progressiva e irreversível não apenas do músculo esquelético, mas também da musculatura cardíaca e respiratória,⁴⁻⁶ foi descoberto em 1987, pelo Dr. Eric Hoffman e o Dr. Louis Kunkel, que a DMD resultava de uma mutação genética que levava à ausência da proteína distrofina.²

I.1 Epidemiologia

Estima-se que um em cada 5.000 nascimentos do sexo masculino possua a doença, resultando em mais de 250.000 meninos afetados em todo o mundo.^{7,8}

I.2 Manifestações Clínicas

No momento do nascimento não são observados sinais clínicos da doença. No entanto, por volta dos 3 anos de idade, é perceptível um atraso no início da fala e da marcha e aos 5 anos é comum surgir dificuldade em realizar atividades como correr e saltar.^{5,9,10} Infelizmente, estes sintomas subtis e iniciais resultam muitas vezes em diagnósticos tardios da doença e, aos 12 anos, a maioria dos meninos já necessita de uma cadeira de rodas para se deslocar.^{11,12} Entre os 20 e 40 anos, as complicações cardíacas e respiratórias assumem um papel predominante, sendo a principal causa de morte.^{10,13}

Algumas manifestações características da DMD incluem o andar oscilante, conhecido como andar do tipo anserino, bem como a presença de hiperlordose lombar e escoliose. A fraqueza dos músculos glúteo médio e mínimo está na origem de uma inclinação da pelve aquando posição vertical. Para compensar essa inclinação, a base de suporte é alargada, o que resulta numa marcha característica do tipo anserino. A inclinação anterior da pelve deve-se ainda à fraqueza do glúteo máximo, que é contrabalançada pelo aumento da curvatura lombar, conhecida como lordose lombar.^{5,9}

Além disso, é usual ocorrerem quedas frequentes e dificuldade para se levantar do chão, sendo observado o sinal de Gower positivo. Este sinal consiste em alcançar uma posição

em pé utilizando as mãos e os braços como apoio ao longo das pernas, a fim de compensar a fraqueza muscular nelas presente.^{5,9,14}

É ainda observado, em cerca de 30% dos meninos, algum comprometimento cognitivo, que se manifesta precocemente, mas que não progride ao longo do tempo.^{4,5,15}

1.3 Etiologia

O gene responsável pela distrofia muscular de Duchenne é composto por um total de 79 exões, sendo considerado o maior gene humano.¹⁶ Conhecido como gene da distrofina, é expresso nomeadamente na musculatura esquelética, cardíaca e lisa, mas também em pequenas regiões específicas do sistema nervoso central.^{17,18}

O gene da distrofina possui quatro unidades funcionais. A primeira é o terminal-N, responsável pela ligação à actina, proteína essencial para a função do músculo. De seguida, o domínio central rod que confere flexibilidade durante a contração e o domínio rico em cisteína que liga a distrofina a uma proteína transmembranar, que, por sua vez, se associa a outras proteínas transmembranares, as quais se ligam à laminina, um componente da membrana extracelular. Por fim, o terminal-C faz a ligação da distrofina a duas proteínas intracelulares, responsáveis pela estabilização da sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS).¹⁹⁻²¹

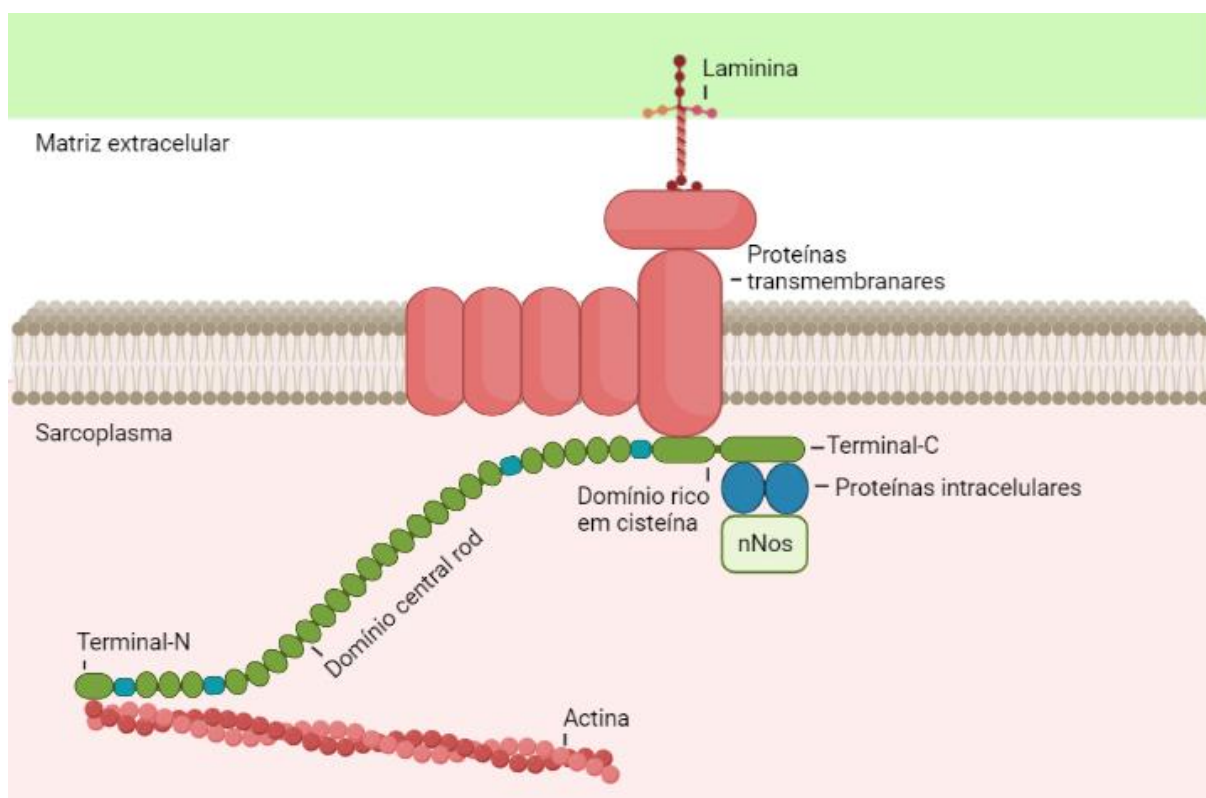


Figura 19 – Proteína distrofina (figura adaptada²⁰)

A proteína distrofina exerce um papel essencial na ligação do citoesqueleto, por meio da actina presente nas fibras musculares, à matriz extracelular, mediante proteínas transmembranares presentes no sarcolema. Esta interação permite a estabilização da membrana durante os processos de contração e relaxamento muscular, garantindo a integridade estrutural das células musculares e a sua capacidade contráctil.⁴

1.4 Patogénese

A inexistência da ligação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular torna as fibras musculares suscetíveis a danos, nomeadamente durante as contrações musculares, onde ocorrem ruturas da membrana celular e libertação de grandes quantidades de creatina cinase para o sangue.⁴ A ausência da proteína distrofina leva ainda à presença de nNOS livre no sarcoplasma, o que ocasiona isquemia por resultado de uma contração dos vasos sanguíneos e consequente falta de perfusão sanguínea dos músculos.^{17,20,22}

Estes danos constantes promovem a substituição gradual das fibras musculares por tecido adiposo e tecido conjuntivo fibroso até perda da função muscular.^{20,23}

1.5 Genética

Na distrofia muscular de Duchenne, as grandes deleções correspondem a 60-70% das mutações que resultam na doença, enquanto as grandes duplicações representam apenas 5-10%. As mutações pontuais, como pequenas deleções ou duplicações, mutações *nonsense* e *missense* correspondem a 25-35% e os rearranjos intrónicos a, aproximadamente, 2%.²⁴⁻²⁶

As grandes deleções e duplicações compreendem um ou mais exões, enquanto as pequenas deleções e duplicações apenas envolvem alguns nucleótidos.²⁶ As deleções e duplicações tendem a ocorrer em regiões específicas do gene, conhecidas como hotspots, sendo um exemplo o intervalo de exões 45-55, onde 47% dos meninos afetados possuem mutações nesta região em particular.^{4,27}

1.6 Herança genética

O facto do gene da distrofina ser recessivo e estar localizado no cromossoma X, no locus Xp21.2, explica a maior incidência da doença nas crianças de sexo masculino.²⁸ As mulheres, por terem dois cromossomas X, podem tornar-se portadoras da mutação ao herdarem um gene defeituoso de um dos pais. No entanto, só manifestam a doença quando ambos os genes estão mutados. Já os homens, que possuem apenas um cromossoma X,

contraem a doença ao herdarem um gene defeituoso, pois não possuem um segundo gene da distrofina para compensar a mutação.²⁹

Para estabelecer um diagnóstico precoce da mutação, é essencial implementar técnicas de diagnóstico tanto na fase pré-concepcional e pré-natal quanto na pós-natal.

2. Diagnóstico

2.1 Diagnóstico pré-concepcional

Uma mulher com histórico familiar de DMD que pretenda engravidar deve realizar alguns testes para determinar se é portadora do gene mutado.

Tabela 2 – Testes para diagnóstico de mulheres portadoras de mutações no gene da distrofina

Teste		Vantagens	Desvantagens
Para detetar grandes deleções ou duplicações: Identificam 65 a 80% das mutações. ^{11,30-32}			
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	Após desnaturar o DNA e efetuar a hibridização e ligação das sondas, dá-se a amplificação seguida da análise dos produtos. A variação na altura do pico da sonda alvo, em relação à sonda de referência, sugere a existência de duplicações ou deleções de exões. ^{33,34}	Rápido e barato. ³⁵	Deleções de um único exão têm de ser confirmadas, a fim de evitar falsos positivos. ^{36,37} Não deteta pequenas mutações, entre elas SNVs (variações num único nucleótido). ^{38,39}
Array CGH (Array Comparative Genomic Hybridization)	Após marcar o DNA do doente e o DNA controlo com fluoróforos distintos, as duas amostras são combinadas e incubadas no microarray, onde co-hibridizam competitivamente com as sondas aí presentes. O microarray é então digitalizado e as intensidades dos pontos são medidas. A intensidade de fluorescência é proporcional ao número de cópias das sequências de DNA do doente e do controlo. ⁴⁰	Possível identificação da localização de algumas alterações intrónicas. ⁴¹	Mais caro e demorado. Não deteta pequenas mutações, entre elas SNVs. ^{38,39}
Caso as técnicas mencionadas anteriormente não detetem a mutação, ou para análise de deleções ou duplicações mais pequenas e mutações nonsense ou missense: Identificam as restantes 20 a 35% das mutações. ^{11,30,31}			
Sequenciação de Sanger	A amostra de DNA é combinada com DNA polimerase e didesoxinucleótidos marcados com fluoróforos distintos. A DNA polimerase irá adicionar nucleótidos à cadeia até a adição de um didesoxi, momento em que a síntese termina. De seguida, é realizada uma eletroforese capilar em gel, onde cada fragmento de DNA é excitado por um laser à medida que atinge o fim do gel, permitindo a deteção do fluoróforo associado. A sequência original de DNA é reconstruída com base nas cores dos fluoróforos registados, um nucleotídeo de cada vez. ⁴²	Possível utilização para confirmar falsos positivos dados pelo MLPA. ³³	Caro e demorado. ³¹

Next Generation Sequencing (NGS)	É necessária a preparação de uma biblioteca a partir da amostra e a geração de clones para amplificar o sinal. De seguida, o processo de sequenciação segue uma abordagem semelhante ao método de Sanger, no qual nucleótidos são adicionados à cadeia até que a sequência seja interrompida por um didesoxi. A emissão de fluorescência é detetada por um aparelho, que compara o genoma da amostra com um genoma de referência, identificando as alterações presentes. ⁴³	Maior custo-efetividade que a sequenciação de Sanger. ³¹ Possível análise de milhões de fragmentos num único teste e de várias amostras num único exame. ^{44,45} Deteta pequenas mutações (mutações pontuais, pequenas deleções e duplicações, mutações intrónicas conhecidas). ^{31,39}	Mais caro que o MLPA ou o array CGH. ³⁷ Não deteta alguns rearranjos complexos e mutações intrónicas profundas. ^{31,39}
---	--	--	--

2.1.1 Mutação herdada

Embora a maioria das mulheres portadoras da mutação seja assintomática, uma pequena parte delas pode manifestar sintomas leves da doença. A manifestação desses sintomas está relacionada com a quantidade de distrofina expressa, a qual pode ser determinada pelo padrão de inativação do cromossoma X (XCI). Diversos estudos evidenciam que as mulheres portadoras assintomáticas e saudáveis apresentam um padrão aleatório de XCI, enquanto as portadoras sintomáticas demonstram uma preferência de inativação do cromossoma X que contém o alelo normal.^{30,46} Assim, além do risco de transmitir a mutação aos filhos, essas mulheres podem apresentar fraqueza muscular e comprometimento cardíaco.⁴⁷

Raramente, algumas mulheres podem ainda apresentar uma distrofinopatia clássica e manifestar a doença como o género masculino. Um exemplo pode ser observado em mulheres com síndrome de Turner, onde há ausência de um cromossoma X e presença da mutação de DMD no outro cromossoma.⁴⁸ Um outro exemplo é a presença de isodissomia uniparental, na qual o par de cromossomas da mulher tem origem num único progenitor. Nesse caso, um dos pais não contribui com nenhum cromossoma, enquanto o outro fornece um cromossoma duplicado que possui o gene defeituoso.^{49,50}

Se o resultado dos testes for positivo para portadora de uma variante patogénica da DMD, a mulher possui 50% de probabilidade de transmissão dessa mesma variante em cada

gravidez, ou seja, há um risco de 50% das crianças do sexo masculino desenvolverem a doença e um risco igual das crianças do sexo feminino serem portadoras.^{20,29}

É de notar que embora estes testes devam ser propostos a todas as mulheres adultas que possam ser portadoras, não são realizados em meninas, a menos que estas apresentem sintomas. No entanto, devem ser sugeridos quando as mesmas atingirem a idade adulta e tiverem a capacidade de tomar as suas próprias decisões.²⁰

2.1.2 Mutação espontânea

Se o resultado for negativo, a mulher não é portadora da variante na sua linha celular somática e a probabilidade de ter um menino com o gene defeituoso é baixa. Isto acontece porque mesmo que o pai seja portador da doença, transmite ao filho um cromossoma Y.²⁹

No entanto, existe a possibilidade desse mesmo menino desenvolver distrofia muscular de Duchenne. Nesse caso, a variante patogénica não está presente no DNA leucocitário da mãe, mas pode estar em alguns dos seus óvulos. Denominado por mosaicismo da linha germinativa ou gonadal, este evento tem um risco de 15% e não é detetável por testes genéticos prévios à fertilização.²⁰

Além disso, ainda que a herança genética represente 2/3 dos casos de DMD, a variante patogénica causadora da doença pode ainda surgir de forma espontânea, através de mutações *de novo*.^{37,51}

2.1.3 Opções a considerar

A identificação da condição de portadora oferece às mulheres que pretendam engravidar diferentes opções. Primeiro, as dúvidas são esclarecidas e os riscos associados são explicados, o que lhes permite tomar decisões de forma informada.

Se a mulher optar por avançar com a gravidez, é dada a possibilidade de realizar diagnóstico pré-natal, porém é de referir que existem opções reprodutivas para mulheres portadoras da mutação. A fertilização *in vitro* com diagnóstico genético pré-implantação é uma alternativa, permitindo a escolha de embriões não afetados antes da sua implantação no útero. Outra opção é o uso de óvulos doados, mesmo para mulheres que não sejam portadoras, porém com histórico familiar ou filhos afetados, devido ao risco de mosaicismo germinativo ou gonadal.^{11,52,53}

2.2 Diagnóstico pré-natal

O DNA circulante livre de células (cfDNA) é constituído por fragmentos de DNA libertados na corrente sanguínea durante a morte e decomposição celular. Na gestação, a maioria do cfDNA é proveniente da mãe, porém uma parte provém de células da placenta que contêm o DNA do feto.⁵⁴ A deteção de DNA fetal circulante (cffDNA) na corrente sanguínea materna permitiu o desenvolvimento de exames de diagnóstico pré-natal não invasivos (NIPD), nos quais apenas é necessária uma amostra de sangue da mãe.⁵⁵

O primeiro passo no diagnóstico pré-natal da distrofia muscular de Duchenne consiste na realização de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) na amostra de sangue materno para identificação de fetos do sexo masculino.^{56,57} Assim, a determinação do sexo fetal em famílias com risco de doenças ligadas ao cromossoma X permite a redução de testes ou tratamentos adicionais desnecessários.^{57,58}

Nos fetos masculinos é então realizada uma biópsia das vilosidades coriônicas ou amniocentese, o que implica certos riscos, entre os quais a possibilidade de aproximadamente 0.1 a 0.3% de ocorrência de um aborto espontâneo.^{58,59}

No entanto, existem duas abordagens que são utilizadas no diagnóstico de outras doenças e evidenciam estudos promissores para o diagnóstico da DMD. Essas abordagens são a *Relative Haplotype Dosage* (RHDO) e *Relative Mutation Dosage* (RMD), as quais estão incluídas no NIPD devido à utilização de cfDNA. A principal diferença entre elas deve-se ao fato de que a RMD envolve a deteção direcionada de uma mutação familiar por meio de sondas familiares específicas, enquanto a RHDO requer a construção prévia de toda a região do possível haplótipo materno e cálculo das proporções associadas a alelos mutantes e *wild-type*.⁶⁰

2.2.1 Opções a considerar

A identificação de fetos do sexo masculino portadores da distrofia permite aos pais receber o apoio e aconselhamento necessários para tomar decisões informadas, que podem ir desde um acompanhamento médico mais frequente e específico antes do parto à opção de interrupção médica da gravidez.⁶⁰

2.3 Diagnóstico pós-natal

2.3.1 Teste do pezinho

Embora todos (ou quase todos) os recém-nascidos realizem o teste do pezinho, que não sendo obrigatório é fundamental, este teste não procura a DMD. No entanto, em alguns países, estão em curso projetos para aumentar a abrangência do teste do pezinho, a fim de rastrear 50 doenças, incluindo a distrofia muscular de Duchenne. Este rastreio será feito por meio de um exame de sangue para medir os níveis da creatina cinase.⁶¹

2.3.2 Teste de creatina cinase

A enzima creatina cinase (CK) encontra-se essencialmente no músculo esquelético, porém também está presente na musculatura cardíaca e no cérebro. Em condições normais, o intervalo de referência para os níveis séricos de CK é de até 250 U/L (unidades por litro). No entanto, níveis de CK superiores a este valor sugerem extravasamento da enzima através da membrana muscular devido a possíveis danos musculares.⁶²

Atualmente, em Portugal, a medição dos níveis de CK não é abrangida pelo teste do pezinho, mas pode ser realizada em uma gota de sangue seco obtida logo após o nascimento de recém-nascidos com histórico familiar de DMD ou em crianças com evidente atraso motor.⁶²⁻⁶⁴

2.3.3 Teste da bochechinha

Outro teste de rastreio é o teste da bochechinha, capaz de detetar até 340 doenças que se manifestam na infância, mesmo antes de quaisquer sinais ou sintomas, incluindo a distrofia muscular de Duchenne.^{65,66} Após colheita de saliva por meio de uma *swab* bucal na parte interna da bochecha do bebé, realiza-se a extração do DNA, seguida de sequenciação por NGS e análise bioinformática para identificar possíveis alterações genéticas que possam indicar a presença de doença.⁶⁷

Este teste já está disponível em Portugal, porém, somente no Hospital Fernando Pessoa, localizado no Grande Porto.⁶⁸

Os exames de rastreio, como o teste do pezinho e o teste da bochechinha, são realizados de forma preventiva, antes do surgimento dos sintomas, enquanto o teste da CK é realizado quando há histórico familiar ou sinais evidentes de atraso motor.⁶⁶ No entanto, é importante ressaltar que nenhum destes exames faz o diagnóstico da distrofia muscular de Duchenne.

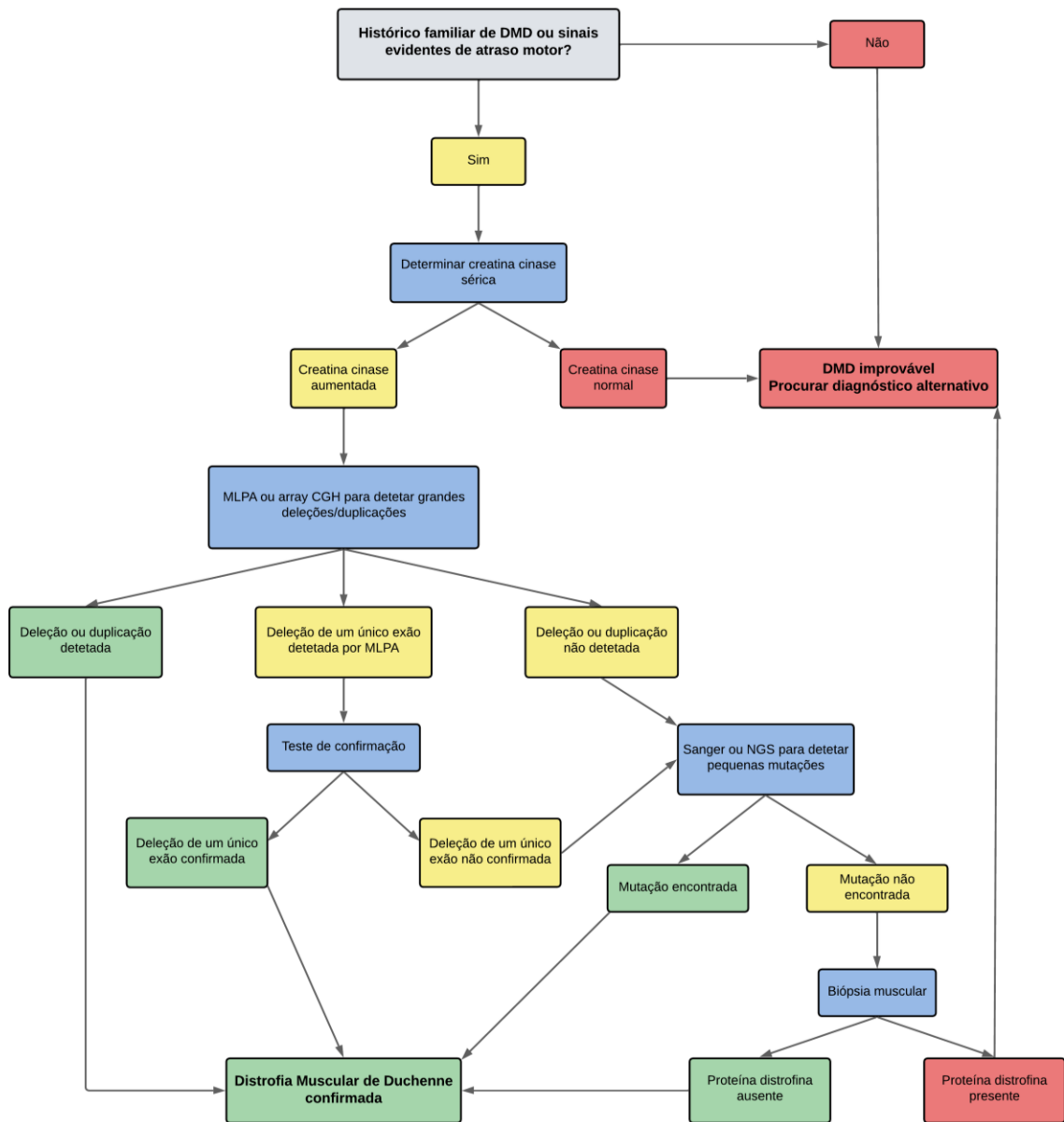


Figura 20 – Fluxograma para diagnóstico pós-natal da distrofia muscular de Duchenne (figura adaptada⁴)

2.3.4 Biópsia muscular

Caso os testes anteriores não identifiquem nenhuma mutação no gene da distrofina, pode ser necessário realizar uma biópsia muscular. Utilizando técnicas como imunohistoquímica ou *western blot*, é possível analisar a expressão da proteína distrofina.^{53,69}

A imunohistoquímica é uma técnica que analisa a presença ou ausência de uma proteína, bem como a sua localização em amostras de tecido. No entanto, ela não nos fornece informações sobre a quantidade real de proteína, apenas nos diz se está presente ou não. Já o *western blot* é uma técnica quantitativa que nos permite aferir a quantidade exata da proteína em questão, neste caso da proteína distrofina.⁷⁰

Apesar dos consideráveis avanços terapêuticos observados nos últimos anos, ainda não há cura para a distrofia muscular de Duchenne. Porém, uma abordagem multidisciplinar aliada ao uso de algumas terapias já aprovadas tem demonstrado capacidade de retardar a progressão dos sintomas e promover melhorias na qualidade de vida dos meninos.¹⁰

3. Cuidados multidisciplinares

3.1 Cuidados respiratórios

As diretrizes recomendam a administração da vacina pneumocócica e a vacinação anual contra *influenza*, assim como a utilização de técnicas de tosse manual ou mecanicamente assistida para remoção de secreções. A utilização de ventilação não invasiva diurna e noturna desempenha um papel essencial no tratamento da hipoventilação, enquanto a traqueostomia é considerada uma opção reservada para casos mais severos.⁷¹

3.2 Cuidados cardíacos

A deficiência de distrofina no coração pode levar ao desenvolvimento de cardiomiopatia, resultando em complicações como insuficiência cardíaca, arritmia e disfunção ventricular esquerda, entre outras. As crianças com doenças cardíacas associadas a DMD podem beneficiar do uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e beta bloqueadores para tratamento dessas condições.⁷¹

3.3 Cuidados ortopédicos

A terapêutica com glucocorticosteroides reduz a incidência de escoliose, porém tem um efeito negativo na mineralização óssea, o que pode resultar no desenvolvimento de osteoporose e aumentar a predisposição a fraturas vertebrais ou de ossos longos.^{4,71,72}

Se estas fraturas forem identificadas, pode-se considerar o tratamento com bifosfonatos intravenosos.⁷¹ Se houver agravamento da escoliose pode ser necessário realizar uma fusão espinhal posterior.⁴

3.4 Cuidados gastrointestinais

A obstipação e a doença do refluxo gastroesofágico são sintomas decorrentes do comprometimento do músculo liso visceral.⁴ O tratamento desta sintomatologia pode envolver o uso diário de laxantes osmóticos para tratar a obstipação, bem como o uso de antagonistas dos recetores H2 da histamina ou inibidores da bomba de prótons para reduzir a produção de ácido gástrico, o qual está na origem do refluxo.⁵³

Quando a disfagia e a dismotilidade esofágica comprometem a ingestão segura e adequada de alimentos, é aconselhada a realização de uma gastrostomia para melhorar o estado nutricional e reduzir o risco de aspiração.^{4,53}

3.5 Cuidados neurológicos

As crianças com distrofia muscular de Duchenne apresentam uma maior incidência de comprometimento cognitivo, perturbação do espectro do autismo, perturbação de hiperatividade e déficit de atenção, ansiedade e depressão em comparação com a população em geral.⁷³ Porém, o tratamento dessas condições é realizado com base nas mesmas diretrizes.⁴

4. Terapêutica

4.1 Glucocorticosteroides

O uso de glucocorticosteroides, como a prednisona e o deflazacorte, é recomendado para a maioria das crianças com distrofia muscular de Duchenne. A idade de início do tratamento pode variar em cada criança, porém esta não deve ser realizada antes dos 2 anos de idade, sendo geralmente iniciada por volta dos 4 a 5 anos.^{4,53}

Embora o mecanismo pelo qual os glucocorticosteroides retardam a progressão da doença em meninos com DMD não esteja totalmente compreendido, pensa-se que diminuem a inflamação e aumentem a massa muscular total.^{4,10}

Assim, o uso de esteroides não só vai prolongar a capacidade de andar em aproximadamente 2 anos, como também preservar a força dos membros superiores, retardar o declínio da função respiratória e cardíaca e reduzir o risco de desenvolvimento ou agravamento de escoliose. Por estas razões, muitos médicos optam por continuar o

tratamento mesmo após perda de marcha.^{20,53,74} No entanto, os glucocorticosteroides aumentam o risco de fraturas vertebrais ou de ossos longos.⁷¹

Entre as diversas abordagens aprovadas ou em estudo, incluem-se o *readthrough*, o exão *skipping* e a terapia génica. Direcionadas a tratar as causas da doença, que vão desde mutações nonsense a grandes mutações e até mesmo a ausência completa do gene, a análise das terapias desenvolvidas e em desenvolvimento permite avaliar os seus resultados na melhoria e tratamento da DMD.

4.2 *Readthrough* do códon de terminação prematuro

Cerca de 10% das mutações do tipo *nonsense* ocorrem devido à presença de um códon de terminação localizado erradamente, o qual interrompe a produção de distrofina prematuramente e origina proteínas truncadas e disfuncionais.^{10,75}

Dois estudos randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo: ensaio de fase IIb (ClinicalTrials.gov ID: NCT00592553)⁷⁶ e ensaio de fase III (ClinicalTrials.gov ID: NCT01826487)⁷⁷ foram realizados com o intuito de avaliar a eficácia do atalurenó (40 mg/kg/dia).^{78,79}

O atalurenó é uma pequena molécula oralmente biodisponível que permite que o ribossoma leia através do códon de terminação, continuando a tradução até a produção da proteína distrofina completa e funcional.⁸⁰⁻⁸²

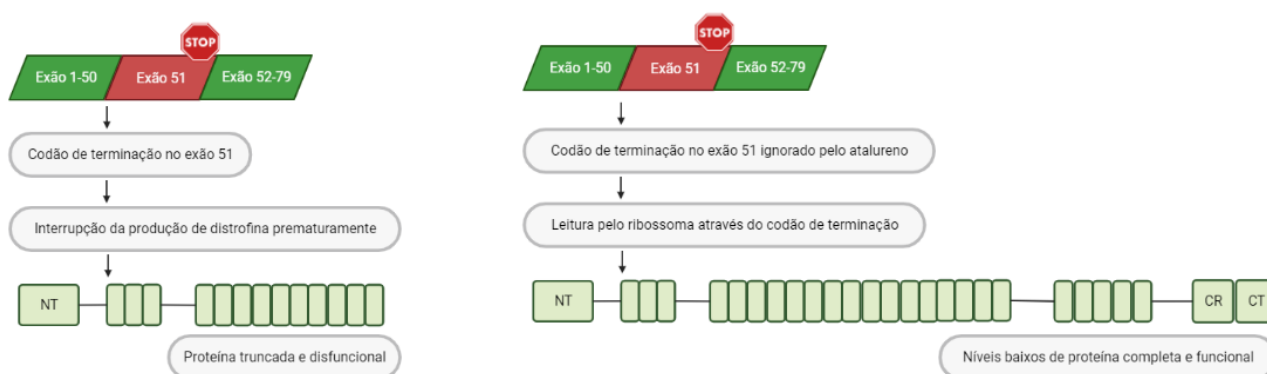


Figura 21 – *Readthrough* do códon de terminação prematuro. NT, terminal-N; CR, domínio rico em cisteína; CT, terminal-C (figura adaptada⁴)

Apesar de não terem atingido o objetivo primário de melhorar a distância percorrida no teste de marcha de 6 minutos (6MWT) ao longo de 48 semanas em comparação com

meninos que receberam tratamento com placebo, esses estudos demonstraram benefícios em alguns *endpoints* secundários, entre eles o atraso da progressão da doença.^{78,79,83}

O Translarna® (ataluren) obteve aprovação condicional em 2014 pela *European Medicines Agency* (EMA) e a sua utilização está autorizada em Portugal desde 2017 para o tratamento da DMD resultante de uma mutação *nonsense* no gene distrofina, em meninos com capacidade de marcha com 5 ou mais anos de idade.^{79,84}

4.3 Exão *skipping*

Um codão consiste numa sequência de três nucleótidos que codifica um aminoácido durante a tradução do mRNA nos ribossomas.⁸⁵ A tradução de um gene é feita codão a codão, porém quando a deleção ou duplicação de nucleótidos não é um múltiplo de 3, há uma perturbação no quadro de leitura original e ocorre uma mutação *out-of-frame*. A sequência nucleotídica do gene após a mutação será lida incorretamente, resultando numa tradução desordenada com a adição de aminoácidos errados ou de um codão de terminação e originando uma proteína truncada e disfuncional.⁸⁶ Se o número de nucleótidos removidos ou adicionados for um múltiplo de 3 ocorre uma mutação *in-frame*, onde um único aminoácido é excluído ou introduzido e os seguintes seguem a sequência nucleotídica normal, originando uma proteína parcialmente funcional.^{4,87,88}

Enquanto as mutações *out-of-frame* originam distrofia muscular de Duchenne, as mutações *in-frame* ocasionam distrofia muscular de Becker (BMD), uma forma de distrofinopatia menos severa e de progressão mais lenta.^{39,87,89}

Assim, a abordagem de exão *skipping* tem como objetivo restabelecer o quadro de leitura de *out-of-frame* para *in-frame*, permitindo a produção de proteínas parcialmente funcionais semelhantes às encontradas na BMD.^{90,91} Para isso, utilizam-se oligonucleótidos antisense (AONs), que consistem em pequenos fragmentos de DNA e/ou RNA alterado, desenhados para se ligarem de forma específica a um exão alvo durante o *splicing* do pré-mRNA e impedirem a sua inclusão no mRNA.^{90,92} Realiza-se uma administração sistêmica semanal de AONs em meninos que apresentem deleções *out-of-frame*, com o intuito de remover um exão adjacente ao local da deleção no pré-mRNA e originar uma mutação *in-frame*.⁴

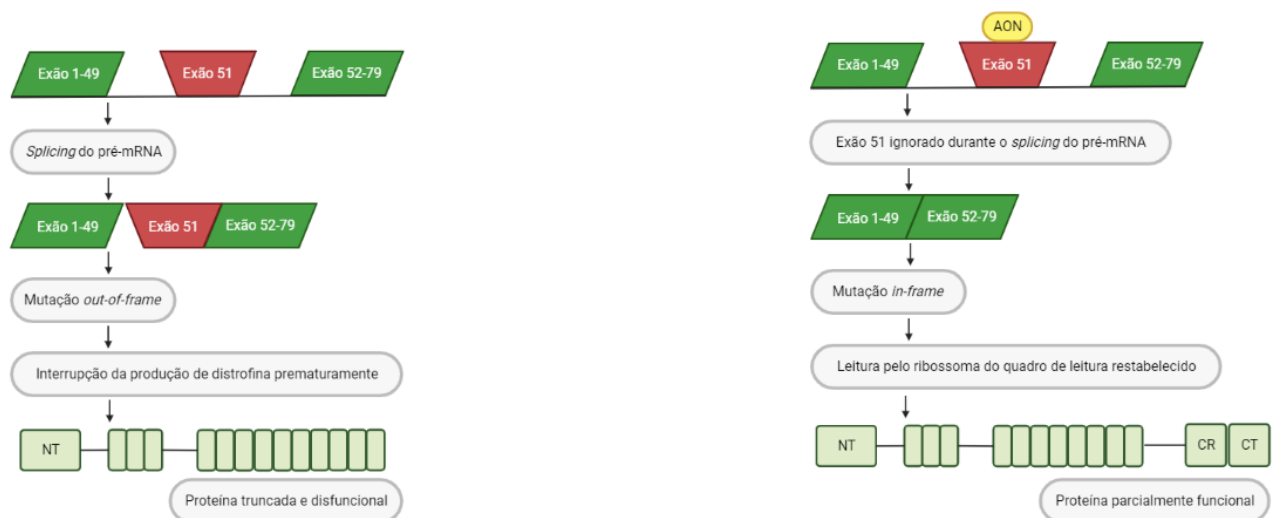


Figura 22 – Exão skipping. AON, oligonucleótido antisense; NT, terminal-N; CR, domínio rico em cisteína; CT, terminal-C (figura adaptada⁴)

Esta abordagem é direcionada à mutação, uma vez que diferentes exões devem ser excluídos consoante o tipo de variante presente. No entanto, devido à prevalência de deleções em hotspots, o desenvolvimento clínico tem sido mais significativo para oligonucleótidos antisense direcionados a exões que são aplicáveis a um maior número de meninos, como o exão 51 (14%), exão 53 (10%), exão 45 (9%), exão 44 (7%) e exão 43 (7%).^{4,75}

Cerca de 70% das mutações da distrofia muscular de Duchenne estão situadas entre os exões 45 e 55 e, atualmente, já há quatro oligonucleótidos antisense aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) com uma aplicabilidade em cerca de 30% dos meninos¹¹: eteplirsen⁹¹⁻⁹³ orientado para o exão 51, golodirsen⁹⁴⁻⁹⁶ e viltolarsen^{97,98} direcionados ao exão 53 e casimersen^{99,100} utilizado para o exão 45. Estes quatro oligonucleótidos antisense pertencem à classe oligómero morfolino de fosfordiamidato (PMO). Ao contrário do DNA, que possui anéis de desoxirribose, e do RNA, que possui anéis de ribose, os PMOs consistem numa estrutura de anéis hexagonais de morfolina unidos por ligações fosfordiamidato, em vez de ligações de ácido fosfórico. Ao possuírem carga neutra, os PMOs reduzem os efeitos *off-target* e as respostas imunológicas.^{39,101}

4.4 Terapia génica

A terapia génica para DMD procura restaurar a proteína distrofina ausente, através da reparação ou da entrega de uma cópia funcional do gene.⁴

4.4.1 Reparação de genes

A abordagem de edição do genoma visa corrigir mutações ao nível do DNA através do uso de sistemas como *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated nuclease 9* (CRISPR/Cas9), para produzir proteínas funcionais.¹⁰²

O CRISPR consiste em RNAs guia de cadeia simples que reconhecem e se ligam a regiões específicas do DNA, direcionando a enzima Cas9 aos locais-alvo da dupla cadeia de DNA a separar.^{4,17} Dentre as diversas estratégias de edição de genes, uma delas envolve o uso de dois RNAs guias para remover um exão completo e restabelecer o quadro de leitura.¹³ Para isso, as regiões separadas têm de ser reparadas pelos sistemas de reparação do DNA.^{4,17}

A reparação pelo sistema de união de extremidades homólogas ocorre nas células em divisão e, ao contrário da recombinação não-homóloga em células que não se dividem, não está sujeita a erros. Uma vez que os tecidos mais comprometidos na DMD são pós-mitóticos, a abordagem de edição do genoma recorre ao uso da recombinação não-homóloga.^{4,17,103,104}



Figura 23 – CRISPR/Cas9. NT, terminal-N; CR, domínio rico em cisteína; CT, terminal-C (figura adaptada⁴)

No caso da DMD, o trabalho de edição de genes ainda se encontra em fase pré-clínica devido à existência de alguns problemas de eficiência, como a entrega do sistema CRISPR/Cas9 in vivo, e preocupações de segurança, como os efeitos *off-target* da atividade Cas9.^{17,105}

4.4.2 Adição de genes

A terapia de adição de genes recorre a vetores virais para incluir uma cópia de cDNA do gene funcional nos tecidos comprometidos. Ainda que a maioria dos vírus não possua um tropismo natural para os músculos, os AAVs são uma exceção, pois podem infectar esses tecidos de forma eficiente, sem apresentar patogenicidade para os seres humanos.^{4,20,106}

Porém, os AAVs possuem um limite de carga inferior ao necessário para alojar o gene completo da distrofina, tendo sido necessário o desenvolvimento das estruturas ‘mini-distrofina’ e ‘micro-distrofina’. Estas estruturas contêm apenas os componentes essenciais do gene distrofina e, apesar de não serem totalmente funcionais, permitem o alojamento do seu cDNA nos vetores AAV.^{4,20}

É de notar que os genes dos AAVs raramente se integram no genoma do hospedeiro, o que pode resultar, com a renovação muscular ao longo do tempo, na perda do transgene da mini ou micro-distrofina.^{4,107} Contudo, há a possibilidade do gene do AAV integrar de forma parcial ou total o genoma no DNA do hospedeiro, o que pode ativar genes oncogénicos, predispondo as crianças ao desenvolvimento de cancro. No entanto, até ao momento, não foram registadas quaisquer preocupações de segurança em termos de genotoxicidade em seres humanos.^{17,108}

Há diversos ensaios clínicos a decorrer, entre eles dois estudos de fase III (ClinicalTrials.gov ID: NCT05096221)¹⁰⁹ e (ClinicalTrials.gov ID: NCT04281485)¹¹⁰. Porém, é de referir que a 22 de Junho de 2023, o medicamento Elevidys® (delandistrogene moxeparvovec-rokl) obteve aprovação acelerada pela FDA, tornando-se a primeira terapia génica a ser aprovada para a DMD.¹¹¹

Um ponto positivo reside no facto da terapia de adição de genes não depender de uma mutação específica, estando disponível para a maioria das crianças com DMD, desde que não tenham anticorpos virais.²⁰ Contudo, 40 a 80% da população humana apresenta anticorpos contra os vírus adeno-associados, devido a alguns serotipos de AAVs serem endémicos nos seres humanos ou como resultado de exposição prévia ao vírus.¹¹²⁻¹¹⁴

Diversos esquemas alternativos de medicamentos imunomoduladores estão a ser analisados com o intuito de suprimir a imunidade dos vírus adeno-associados existente, permitindo não só a administração inicial da terapia génica em indivíduos soropositivos para AAV, bem como a sua readministração.^{17,115,116}

Adicionalmente, estão a ser estudadas estratégias para aumentar a eficiência dos AONs através de modificações químicas, por exemplo PMO conjugado com péptido (PPMO) ou 2-O-metil-RNA com uma base de fosforotioato (2'OMeP), bem como a eficiência dos AONs ou do CRISPR/Cas 9 por meio de AAVs ou nanopartículas lipídicas.^{39,117-119}

5. Considerações Finais

A distrofia muscular de Duchenne tem um impacto negativo tanto nas crianças afetadas como nas suas famílias, razão pela qual é essencial diagnosticar precocemente a presença de mutações genéticas e dar as devidas orientações quanto ao planeamento familiar e à escolha do tratamento adequado.

Os constantes avanços e progressos tecnológicos possibilitam o diagnóstico genético da DMD de forma rápida e eficaz, desde a fase pré-concepcional à pré-natal e pós-natal, por meio de métodos que vão desde o MLPA e o CGH array ao NGS. Além disso, estudos promissores evidenciam o uso de cffDNA no plasma materno para diagnóstico pré-natal não invasivo como uma opção para o teste de diagnóstico da DMD. O mesmo acontece com testes de rastreio pós-natal, como o teste do CK e teste da bochechinha.

Quanto à terapêutica, tanto a abordagem farmacológica como a não farmacológica têm um papel fundamental na melhoria da qualidade de vida, existindo já diversas terapias aprovadas, e estando muitas outras em desenvolvimento. Por exemplo, os estudos que permitiram a aprovação do eteplirsen evidenciaram um aumento da expressão da distrofina, enquanto estudos mais recentes demonstraram um atraso na perda da capacidade de andar e no declínio pulmonar aquando uso prolongado deste medicamento e quando comparado com crianças que receberam o tratamento convencional.^{93,120,121} Assim, mesmo diante os desafios ainda a superar, a aprovação destes medicamentos e constante procura do desenvolvimento de novos é um motivo de esperança.

6. Referências Bibliográficas

1. Angelini C. *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 95. Elsevier; 2009. doi:[https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(08\)02131-3](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(08)02131-3)
2. A Brief History of Duchenne • World Duchenne Awareness Day. Accessed July 11, 2023. <https://www.worldduchenneday.org/history-of-duchenne/>
3. Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan R. *Duchenne Muscular Dystrophy*. Vol 4.; 2015.
4. Duan D, Goemans N, Takeda S, Mercuri E, Aartsma-Rus A. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1). doi:10.1038/s41572-021-00248-3
5. Duchenne muscular dystrophy - About the Disease. National Center for Advancing Translational Sciences. Published 2023. Accessed July 12, 2023. <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/6291/duchenne-muscular-dystrophy>
6. Chamberlain JS, Rando TA. *Duchenne Muscular Dystrophy: Advances in Therapeutics*.; 2006.
7. Ellis JA, Vroom E, Muntoni F. 195th ENMC International Workshop: Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy 14-16th December, 2012, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*. 2013;23(8):682-689. doi:10.1016/j.nmd.2013.05.008
8. What is Duchenne? • World Duchenne Awareness Day. Accessed July 12, 2023. <https://www.worldduchenneday.org/>
9. Caromano F. Características do Portador de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) - Revisão. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*. 1999;3(3):211-218.
10. Reinig AM, Mirzaei S, Berlau DJ. Advances in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: New and Emerging Pharmacotherapies. *Pharmacotherapy*. 2017;37(4):492-499. doi:10.1002/phar.1909
11. Darras BT, Urion DK, Ghosh PS. Dystrophinopathies. *GeneReviews*®. Published online 2022.
12. Mercuri E, Bönnemann CG, Muntoni F. Muscular dystrophies. *www.thelancet.com*. 2019;394. www.thelancet.com
13. Happi Mbakam C, Lamothe G, Tremblay G, Tremblay JP. CRISPR-Cas9 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Neurotherapeutics*. 2022;19(3):931-941. doi:10.1007/s13311-022-01197-9

14. Chang RF, Mubarak SJ. Pathomechanics of gowers' sign: A video analysis of a spectrum of gowers' maneuvers. *Clin Orthop Relat Res.* 2012;470(7):1987-1991. doi:10.1007/s11999-011-2210-6
15. Battini R, Chieffo D, Bulgheroni S, et al. Cognitive profile in Duchenne muscular dystrophy boys without intellectual disability: The role of executive functions. *Neuromuscular Disorders.* 2018;28(2):122-128. doi:10.1016/j.nmd.2017.11.018
16. Van Deutekom JCT, Van Ommen GJB. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(10):774-783. doi:10.1038/nrg1180
17. Elangkovan N, Dickson G. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(s2):S303-S316. doi:10.3233/JND-210678
18. Fairclough RJ, Wood MJ, Davies KE. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: Renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet.* 2013;14(6):373-378. doi:10.1038/nrg3460
19. Douglas AGL, Wood MJA. Splicing therapy for neuromuscular disease. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2013;56:169-185. doi:10.1016/j.mcn.2013.04.005
20. Gieron-Korthals M, Fernandez R. New Developments in Diagnosis, Treatment, and Management of Duchenne Muscular Dystrophy. *Adv Pediatr.* 2020;67:183-196. doi:10.1016/j.yapd.2020.03.002
21. Zhao J, Kodippili K, Yue Y, et al. Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains. *Hum Mol Genet.* 2016;25(17):3647-3653. doi:10.1093/hmg/ddw210
22. Duan D. Micro-Dystrophin Gene Therapy Goes Systemic in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Hum Gene Ther.* 2018;29(7):733-736. doi:10.1089/hum.2018.012
23. Bemasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, et al. Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Dystrophic Patient Muscles Correlates with Fibrosis. *J Neurol.* 1995;232:1137-1144.
24. Hosseini SM, Alizadeh N, Amini A, Mohammadi-Asl J. Do NGS-based techniques represent a first-line testing in suspected Duchenne muscular dystrophy? *Clin Case Rep.* 2022;10(6). doi:10.1002/ccr3.5916
25. Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, et al. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. *J Hum Genet.* 2010;55(6):379-388. doi:10.1038/jhg.2010.49

26. Wang Y, Yang Y, Liu J, et al. Whole dystrophin gene analysis by next-generation sequencing: a comprehensive genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Mol Genet Genomics*. 2014;289(5):1013-1021. doi:10.1007/s00438-014-0847-z
27. Nakamura A, Shiba N, Miyazaki D, et al. Comparison of the phenotypes of patients harboring in-frame deletions starting at exon 45 in the Duchenne muscular dystrophy gene indicates potential for the development of exon skipping therapy. *J Hum Genet*. 2017;62(4):459-463. doi:10.1038/jhg.2016.152
28. Politano L. Read-through approach for stop mutations in Duchenne muscular dystrophy. An update. *Acta Myologica*. 2021;40(1):43-50. doi:10.36185/2532-1900-041
29. Causes/Inheritance - Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) - Diseases - Muscular Dystrophy Association. Accessed July 14, 2023. <https://www.mda.org/disease/duchenne-muscular-dystrophy/causes-inheritance>
30. Zhang K, Yang X, Lin G, Han Y, Li J. Molecular genetic testing and diagnosis strategies for dystrophinopathies in the era of next generation sequencing. *Clinica Chimica Acta*. 2019;491:66-73. doi:10.1016/j.cca.2019.01.014
31. Nerakh G, Ranganath P, Murugan S. Next-Generation Sequencing in a Cohort of Asian Indian Patients with the Duchenne Muscular Dystrophy Phenotype: Diagnostic Yield and Mutation Spectrum. *J Pediatr Genet*. 2021;10(01):023-028. doi:10.1055/s-0040-1713850
32. Bakhshandeh MK, Behroozi S. Next-generation sequencing approach to molecular diagnosis of Iranian patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy: Several novel variants identified. *eNeurologicalSci*. 2023;30. doi:10.1016/j.ensci.2023.100446
33. Cohen G, Shtorch-Asor A, Ben-Shachar S, et al. Large scale population screening for Duchenne muscular dystrophy—Predictable and unpredictable challenges. *Prenat Diagn*. 2022;42(9):1162-1172. doi:10.1002/pd.6201
34. Zhang J, Ma D, Liu G, et al. Genetic analysis of 62 Chinese families with Duchenne muscular dystrophy and strategies of prenatal diagnosis in a single center. *BMC Med Genet*. 2019;20(1). doi:10.1186/s12881-019-0912-x
35. Biswas S, Li R, Hong J, et al. Effective identification of CRISPR/Cas9-induced and naturally occurred mutations in rice using a multiplex ligation-dependent probe amplification-based method. *Theoretical and Applied Genetics*. 2020;133(8):2323-2334. doi:10.1007/s00122-020-03600-5

36. Varga RE, Mumtaz R, Jahic A, et al. MLPA-based evidence for sequence gain: Pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. *Anal Biochem.* 2012;421(2):799-801. doi:10.1016/j.ab.2011.12.002
37. Kong X, Zhong X, Liu L, Cui S, Yang Y, Kong L. Genetic analysis of 1051 Chinese families with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *BMC Med Genet.* 2019;20(1). doi:10.1186/s12881-019-0873-0
38. Royer-Bertrand B, Cisarova K, Superti-Furga A, Niel-Butschi F, Mittaz-Crettol L, Fodstad H. CNV detection from exome sequencing data in routine diagnostics of rare genetic disorders: Opportunities and limitations. *Genes (Basel).* 2021;12(9). doi:10.3390/genes12091427
39. Sun C, Shen L, Zhang Z, Xie X. Therapeutic strategies for duchenne muscular dystrophy: An update. *Genes (Basel).* 2020;11(8):1-25. doi:10.3390/genes11080837
40. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today.* 2008;13(17-18):760-770. doi:10.1016/j.drudis.2008.06.007
41. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet.* 2016;53(3):145-151. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103387
42. Sanger Sequencing Steps & Method. Accessed July 21, 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>
43. What is Next-Generation Sequencing? | Thermo Fisher Scientific. Accessed July 21, 2023. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/what-is-next-generation-sequencing.html>
44. Sample Multiplexing | Multiplex sequencing with indexes. Accessed July 21, 2023. <https://emea.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/multiplexing.html>
45. NGS vs. Sanger Sequencing. Accessed July 21, 2023. <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/ngs-vs-sanger-sequencing.html>
46. Viggiano E, Ergoli M, Picillo E, Politano L. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet.* 2016;135(7):685-698. doi:10.1007/s00439-016-1666-6

47. Grain L, Cortina-Borja M, Forfar C, Hilton-Jones D, Hopkin J, Burch M. Cardiac abnormalities and skeletal muscle weakness in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies and controls. *Neuromusc Disord.* 1975;209(4):347-351. www.elsevier.com/locate/nmd
48. Chelly J, Marlhens F, Le Marec B, et al. De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet.* 1986;74:193-196.
49. Benn P. Uniparental disomy: Origin, frequency, and clinical significance. *Prenat Diagn.* 2021;41(5):564-572. doi:10.1002/pd.5837
50. Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Johnson DB, Wolford JK, Popovich' BW. *Uniparental Disomy of the Entire X Chromosome in a Female with Duchenne Muscular Dystrophy.* Vol 60.; 1997.
51. Garcia S, de Haro T, Zafra-Ceres M, Poyatos A, Gomez-Capilla JA, Gomez-Llorente C. Identification of de novo mutations of Duchennè/Becker muscular dystrophies in Southern Spain. *Int J Med Sci.* 2014;11(10):988-993. doi:10.7150/ijms.8391
52. Helderma-Van Den Enden ATJM, Madan K, Breuning MH, et al. An urgent need for a change in policy revealed by a study on prenatal testing for Duchenne muscular dystrophy. *European Journal of Human Genetics.* 2013;21(1):21-26. doi:10.1038/ejhg.2012.101
53. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part I: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* 2018;17(3):251-267. doi:10.1016/S1474-4422(18)30024-3
54. What is NIPD? - Genomics Education Programme. Published July 2020. Accessed July 11, 2023. <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/blog/what-is-nipd/>
55. Xu Y, Li X, Ge HJ, et al. Haplotype-based approach for noninvasive prenatal tests of Duchenne muscular dystrophy using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Genetics in Medicine.* 2015;17(11):889-896. doi:10.1038/gim.2014.207
56. Scotchman E, Shaw J, Paternoster B, Chandler N, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and screening for monogenic disorders. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 2020;253:320-327. doi:10.1016/j.ejogrb.2020.08.001
57. Hill M, Finning K, Martin P, et al. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: Translating research into clinical practice. *Clin Genet.* 2011;80(1):68-75. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01533.x

58. Hanson B, Scotchman E, Chitty LS, Chandler NJ. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD): how analysis of cell-free DNA in maternal plasma has changed prenatal diagnosis for monogenic disorders. *Clin Sci*. 2022;136(22):1615-1629. doi:10.1042/CS20210380
59. Alfirevic Z, Navaratnam K, Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;2017(9). doi:10.1002/14651858.CD003252.pub2
60. Zaninović L, Bašković M, Ježek D, Katušić Bojanac A. Accuracy of Non-Invasive Prenatal Testing for Duchenne Muscular Dystrophy in Families at Risk: A Systematic Review. *Diagnostics*. 2023;13(2). doi:10.3390/diagnostics13020183
61. Será que é duchenne? – Teste creatina quinase - Movimento Duchenne. Accessed July 19, 2023. <https://movimentoduchenne.com.br/testeck/>
62. Guide for primary care providers. Published online 2012.
63. Programa Nacional de Rastreamento Neonatal Categoria - INSA. Accessed July 21, 2023. <https://www.insa.min-saude.pt/category/areas-de-atuacao/genetica-humana/programa-nacional-de-diagnostico-precoce/>
64. Mendell JR, Shilling C, Leslie ND, et al. Evidence-based path to newborn screening for duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2012;71(3):304-313. doi:10.1002/ana.23528
65. Distrofia Muscular de Duchenne - Teste da Bochechinha. Accessed July 21, 2023. <https://testedabochechinha.com.br/distrofia-muscular-de-duchenne-dmd/>
66. Sobre Teste da Bochechinha - Teste da Bochechinha. Accessed July 21, 2023. <https://testedabochechinha.com.br/o-teste-da-bochechinha/>
67. Sequenciamento de Nova Geração - Teste da Bochechinha. Accessed July 21, 2023. <https://testedabochechinha.com.br/entenda-tecnica-ngs-teste-da-bochechinha/>
68. “Teste da Bochechinha”: Um único teste já consegue detetar mais de 340 mutações genéticas. Published 2022. Accessed July 12, 2023. <https://lifestyle.sapo.pt/saude/noticias-saude/artigos/teste-da-bochechinha-um-unico-teste-ja-consegue-detetar-340-mutacoes-geneticas>
69. Tanveer N, Sharma MC, Sarkar C, et al. Diagnostic utility of skin biopsy in dystrophinopathies. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111(6):496-502. doi:10.1016/j.clineuro.2009.01.011

70. Borio L. *Scientific Dispute Resolution Appeal Regarding Eteplirsen.*; 2016.
71. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.* 2018;17(4):347-361. doi:10.1016/S1474-4422(18)30025-5
72. Yilmaz Ö, Karaduman A, Topaloğlu H. Prednisolone therapy in Duchenne muscular dystrophy prolongs ambulation and prevents scoliosis. *Eur J Neurol.* 2004;11(8):541-544. doi:10.1111/j.1468-1331.2004.00866.x
73. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *Lancet Neurol.* 2018;17(5):445-455. doi:10.1016/S1474-4422(18)30026-7
74. Gloss D, Moxley Iii RT, Ashwal S, Oskoui M. Practice guideline update summary: Corticosteroid treatment of Duchenne muscular dystrophy. Published online 2016.
75. Bladen CL, Salgado D, Monges S, et al. The TREAT-NMD DMD global database: Analysis of more than 7,000 duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat.* 2015;36(4):395-402. doi:10.1002/humu.22758
76. Phase 2B Study | ClinicalTrials.gov. Accessed July 19, 2023. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00592553?term=NCT00592553&rank=1>
77. Phase 3 Study | ClinicalTrials.gov. Accessed July 19, 2023. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01826487?term=NCT01826487&rank=1>
78. Bushby K, Finkel R, Wong B, et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve.* 2014;50(4):477-487. doi:10.1002/mus.24332
79. McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, et al. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2017;390(10101):1489-1498. doi:10.1016/S0140-6736(17)31611-2
80. McDonald CM, Muntoni F, Penematsa V, et al. Ataluren delays loss of ambulation and respiratory decline in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy patients. *J Comp Eff Res.* 2022;11(3):139-155. doi:10.2217/cer-2021-0196

81. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*. 2007;447(7140):87-91. doi:10.1038/nature05756
82. CHMP. ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS.
83. Haas M, Vlcek V, Balabanov P, et al. European medicines agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscular Disorders*. 2015;25(1):5-13. doi:10.1016/j.nmd.2014.11.011
84. Infarmed. RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO PRÉVIA DO MEDICAMENTO PARA USO HUMANO EM MEIO HOSPITALAR.; 2018.
85. Codon. Accessed July 18, 2023. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Codon>
86. Frameshift Mutation. Accessed July 18, 2023. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Frameshift-Mutation>
87. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. *An Explanation for the Phenotypic Differences between Patients Bearing Partial Deletions of the DMD Locus*. Vol 2.; 1988. doi:10.1016/0888-7543(88)90113-9
88. Deletion mutations - Action Duchenne. Accessed July 18, 2023. <https://www.actionduchenne.org/mutations/deletions/>
89. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JCT, Fokkema IF, Van Ommen GJB, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*. 2006;34(2):135-144. doi:10.1002/mus.20586
90. Nix EH, Aartsma-Rus A. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17(2):225-236. doi:10.1080/14712598.2017.1271872
91. Alfano LN, Charleston JS, Connolly AM, et al. Long-term treatment with eteplirsen in nonambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. *Medicine*. 2019;98(26):e15858. doi:10.1097/MD.0000000000015858
92. Mendell JR, Goemans N, Lowes LP, et al. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2016;79(2):257-271. doi:10.1002/ana.24555

93. Syed YY. Eteplirsen: First Global Approval. *Drugs*. 2016;76(17):1699-1704. doi:10.1007/s40265-016-0657-1
94. Frank DE, Schnell FJ, Akana C, et al. Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2020;94(21):E2270-E2282. doi:10.1212/WNL.00000000000009233
95. Heo YA. Golodirsen: First Approval. *Drugs*. 2020;80(3):329-333. doi:10.1007/s40265-020-01267-2
96. FDA grants accelerated approval to first targeted treatment for rare Duchenne muscular dystrophy mutation | FDA. Accessed July 20, 2023. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-first-targeted-treatment-rare-duchenne-muscular-dystrophy-mutation>
97. Roshmi RR, Yokota T. Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drugs of Today*. 2019;55(10):627-639. doi:10.1358/dot.2019.55.10.3045038
98. Dhillon S. Viltolarsen: First Approval. *Drugs*. 2020;80(10):1027-1031. doi:10.1007/s40265-020-01339-3
99. FDA Approves Targeted Treatment for Rare Duchenne Muscular Dystrophy Mutation | FDA. Accessed July 20, 2023. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-targeted-treatment-rare-duchenne-muscular-dystrophy-mutation-0>
100. Shirley M. Casimersen: First Approval. *Drugs*. 2021;81(7):875-879. doi:10.1007/s40265-021-01512-2
101. Nakamura A, Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy: Symposium: Clinicopathological aspects of neuromuscular disorders - A new horizon. In: *Neuropathology*. Vol 29. ; 2009:494-501. doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01028.x
102. Chamberlain JR, Chamberlain JS. Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy*. 2017;25(5):1125-1131. doi:10.1016/j.ymthe.2017.02.019
103. Lim KRQ, Yoon C, Yokota T. Applications of CRISPR/Cas9 for the treatment of duchenne muscular dystrophy. *J Pers Med*. 2018;8(4). doi:10.3390/jpm8040038
104. Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz Rj. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. *Molecular Therapy*. 2016;24(3):465-474. doi:10.1038/mt.2016.5

105. Verhaart IEC, Aartsma-Rus A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(7):373-386. doi:10.1038/s41582-019-0203-3
106. Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, et al. Dystrophin Immunity in Duchenne's Muscular Dystrophy. *New England Journal of Medicine.* 2010;363(15):1429-1437. doi:10.1056/nejmoa1000228
107. Balakrishnan B, Jayandharan G. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. In: *Current Gene Therapy.* Vol 14. ; 2014:86-100. doi:10.2174/1566523214666140302193709
108. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;8:87-104. doi:10.1016/j.omtm.2017.11.007
109. A Gene Transfer Therapy Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Delandistrogene Moxeparvovec (SRP-9001) in Participants With Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) (EMBARC). Accessed July 20, 2023. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT05096221?term=NCT05096221&rank=1>
110. Study to Evaluate the Safety and Efficacy of PF-06939926 for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. Accessed July 20, 2023. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04281485?term=NCT04281485&rank=1>
111. FDA Approves First Gene Therapy for Treatment of Certain Patients with Duchenne Muscular Dystrophy | FDA. Accessed July 22, 2023. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapy-treatment-certain-patients-duchenne-muscular-dystrophy>
112. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(5):358-378. doi:10.1038/s41573-019-0012-9
113. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *Journal of Infectious Diseases.* 2009;199(3):381-390. doi:10.1086/595830
114. Calcedo R, Morizono H, Wang L, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2011;18(9):1586-1588. doi:10.1128/CI.05107-11

115. Meliani A, Boisgerault F, Hardet R, et al. Antigen-selective modulation of AAV immunogenicity with tolerogenic rapamycin nanoparticles enables successful vector re-administration. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-06621-3
116. Conklin LS, Damsker JM, Hoffman EP, et al. Phase IIa trial in Duchenne muscular dystrophy shows vamorolone is a first-in-class dissociative steroidal anti-inflammatory drug. *Pharmacol Res.* 2018;136:140-150. doi:10.1016/j.phrs.2018.09.007
117. Kenjo E, Hozumi H, Makita Y, et al. Low immunogenicity of LNP allows repeated administrations of CRISPR-Cas9 mRNA into skeletal muscle in mice. *Nat Commun.* 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-26714-w
118. Agrawal P, Harish V, Mohd S, et al. Role of CRISPR/Cas9 in the treatment of Duchenne muscular dystrophy and its delivery strategies. *Life Sci.* 2023;330. doi:10.1016/j.lfs.2023.122003
119. Falzarano MS, Passarelli C, Ferlini A. Nanoparticle delivery of antisense oligonucleotides and their application in the exon skipping strategy for duchenne muscular dystrophy. *Nucleic Acid Ther.* 2014;24(1):87-100. doi:10.1089/nat.2013.0450
120. Mitelman O, Abdel-Hamid HZ, Byrne BJ, et al. A Combined Prospective and Retrospective Comparison of Long-Term Functional Outcomes Suggests Delayed Loss of Ambulation and Pulmonary Decline with Long-Term Eteplirsen Treatment. *J Neuromuscul Dis.* 2022;9(1):39-52. doi:10.3233/JND-210665
121. FDA grants accelerated approval to first drug for Duchenne muscular dystrophy | FDA. Accessed July 23, 2023. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-first-drug-duchenne-muscular-dystrophy>