



O USO DA CRISPR/CAS9 COMO TERAPIA GÊNICA NA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

THE USE OF CRISPR/CAS9 AS GENE THERAPY IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY: AN INTEGRATIVE REVIEW

EL USO DE CRISPR/CAS9 COMO TERAPIA GÉNICA EN LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: UNA REVISIÓN INTEGRADORA

Joao Victor de Almeida Ambrosio

Deborah Moura Rebouças

Resumo: A Distrofia Muscular de Duchenne é uma doença de caráter genético neurodegenerativa relacionada ao cromossomo X. Ocorre quando a expressão da proteína distrofina é cessada ou diminuída devido a alguma mutação em algum dos éxons do gene DMD. Tem prevalência maior em garotos, sendo esta uma relação de 1:3500, e pode ser caracterizada por uma degeneração progressiva dos músculos esqueléticos, cardíacos e respiratórios, causando perda de força muscular gradual e de capacidade motora. O presente trabalho teve por objetivo analisar a utilização da tecnologia CRISPR-Cas9 para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne. Trata-se de um estudo de revisão integrativa, realizado a partir de estudos publicados nas plataformas Pubmed, Google Acadêmico e Scientific Electronic Library Online (SciELO), a partir da pergunta norteadora: “como o uso da CRISPR-Cas9 pode ser útil enquanto tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne?”, usando os descritores em saúde: “distrofia muscular de duchenne”, “proteína 9 associada à CRISPR”, “distrofina” e “edição de genes”. Sendo 10 artigos selecionados para compor essa revisão, muitos autores conseguiram com sucesso editar os éxons mutados, através de diferentes tipos de mediação, presentes nas células dos indivíduos testados, gerando assim um aumento da expressão da distrofina e atenuação dos defeitos funcionais e estruturais musculares. O presente trabalho confirmou que o uso da CRISPR-Cas9 é eficiente para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne. Por fim, mais estudos aprofundados são necessários na área a fim de melhorar a tecnologia, suas mediações e, finalmente, a qualidade de vida de seus pacientes.

Palavras-chaves: Distrofia Muscular de Duchenne. CRISPR-Cas9. Edição de genes.

Abstract: Duchenne Muscular Dystrophy is a genetic neurodegenerative disease linked to the X chromosome. It occurs when the expression of the dystrophin protein is stopped or reduced due to a mutation in one of the exons of the DMD gene. It has a higher prevalence in boys, with a ratio of 1:3500, and can be characterized by progressive degeneration of skeletal, cardiac, and respiratory muscles, causing gradual loss of muscle strength and motor skills. This study aimed to analyze the use of CRISPR-Cas9 technology for the treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. This is an integrative review study, conducted using studies published on the PubMed, Google Scholar, and Scientific Electronic Library Online (SciELO) platforms, based on the guiding question: "How can the use of CRISPR-Cas9 be useful as a treatment for Duchenne Muscular Dystrophy?", using the health descriptors: "Duchenne muscular dystrophy", "CRISPR-associated protein 9", "dystrophin", and "gene editing". Ten articles were selected for this review, and many authors successfully edited the mutated exons through different types of mediation

present in the cells of the tested individuals, thus generating an increase in dystrophin expression and attenuation of functional and structural muscle defects. This work confirmed that the use of CRISPR-Cas9 is effective for the treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. Finally, further in-depth studies are needed in this area to improve the technology, its mediations, and ultimately, the quality of life of its patients.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy. CRISPR-Cas9. Gene editing.

Resumen: La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad neurodegenerativa genética ligada al cromosoma X. Se produce cuando la expresión de la proteína distrofina se detiene o se reduce debido a una mutación en uno de los exones del gen DMD. Presenta una mayor prevalencia en niños varones, con una proporción de 1:3500, y se caracteriza por una degeneración progresiva de los músculos esquelético, cardíaco y respiratorio, que causa una pérdida gradual de la fuerza muscular y la motricidad. Este estudio tuvo como objetivo analizar el uso de la tecnología CRISPR-Cas9 para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne. Se trata de un estudio de revisión integrativa, realizado con estudios publicados en las plataformas PubMed, Google Scholar y Scientific Electronic Library Online (SciELO), basado en la pregunta guía: "¿Cómo puede el uso de CRISPR-Cas9 ser útil como tratamiento para la Distrofia Muscular de Duchenne?", utilizando los descriptores de salud: "distrofia muscular de Duchenne", "proteína 9 asociada a CRISPR", "distrofina" y "edición génica". Se seleccionaron diez artículos para esta revisión, y muchos autores lograron editar con éxito los exones mutados mediante diferentes tipos de mediación presentes en las células de los individuos estudiados, generando así un aumento en la expresión de distrofina y la atenuación de defectos musculares funcionales y estructurales. Este trabajo confirmó la eficacia del uso de CRISPR-Cas9 para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. Finalmente, se requieren estudios más profundos en esta área para mejorar la tecnología, sus mediaciones y, en última instancia, la calidad de vida de los pacientes.

Palabras clave: Distrofia muscular de Duchenne. CRISPR-Cas9. Edición genética.

1 Introdução

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular degenerativa ligada ao cromossomo X e ao gene DMD. Esse é o maior gene humano, constituído aproximadamente de 2,3 milhões de pares de bases, sendo responsável por codificar a proteína distrofina (Portela et al. 2023). O gene DMD é altamente mutável, sendo uma boa parte dessas mutações por mosaicismos de linhagem germinativa. Esse mosaicismos ocorre quando o DNA defeituoso ou patogênico está presente apenas nos gametas de um indivíduo não afetado. Isso ajuda a explicar porque pais geneticamente normais podem ter filhos afetados por doenças genéticas. A DMD pode ser descrita por uma degeneração progressiva dos músculos esqueléticos, cardíacos e respiratórios, além da substituição desses tecidos por tecido fibrótico, causando perdas graduais de força muscular e capacidade motora.

Por ser ligada ao cromossomo X, a Distrofia Muscular de Duchenne afeta principalmente meninos, sendo prevalência de 1 a cada 3500 garotos nascidos vivos, onde dois terços dos casos são hereditários e um terço de novas mutações (Carvalho et al. 2025). Os primeiros sinais da doença tendem a aparecer entre os 2 e 5 anos de idade, onde o portador pode apresentar dificuldade de locomoção, gíngados e quedas recorrentes. Por este motivo, os indivíduos portadores da DMD progressivamente necessitam do uso de cadeira de rodas para locomoção. Seguindo a evolução da doença, os pacientes ainda devem apresentar cardiomiopatias, como a cardiomiopatia dilatada, e insuficiência respiratória, além de cifose e escoliose. Algumas células cerebrais também produzem a distrofina, sendo esta a razão do comprometimento cognitivo em

todos os pacientes, porém apenas de 20 a 30% deles apresentam um coeficiente de inteligência (QI) menor que 70 (Portela et. al 2023).

Para o diagnóstico clínico, o médico ortopedista pode coletar o histórico do paciente e da família e realizar um exame físico. Esse exame consiste na percepção de sinais clínicos associados à DMD, como fraqueza muscular, hipertrofia sem aumento de força especialmente no músculo da panturrilha, o gastrocnêmio, chamado de pseudo-hipertrofia, curvaturas anormais da coluna como a hiperlordose lombar, a conhecida marcha anserina e insuficiências cardíacas e respiratórias (Bonfante et al. 2024). Como descreve Zanotelli et al. (2024), não existe uma cura propriamente dita para a Distrofia Muscular de Duchenne, porém alguns tratamentos com glicocorticóides, como o deflazacorte ou prednisona são utilizadas atualmente para a DMD. Também tem sido possível utilizar terapias genéticas promissoras para regular a expressão de uma distrofina em menor tamanho.

O diagnóstico molecular laboratorial da DMD é complicado devido ao tamanho do gene, complexidade e alta taxa de mutação. Uma alta variedade de métodos podem ser usados, tais como o sequenciamento de nova geração (NGS), detecção óptica, colorimétrica e fluorescente e imunoenaios baseados em anticorpos ou enzimas. A análise para a detecção da Distrofia Muscular de Duchenne requer o sequenciamento dos 79 éxons do gene DMD e 8 promotores. Sarvutiene et al. (2025) descreve que a Espectrometria de Massa, NGS e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC) são os métodos mais vantajosos, pois são capazes de detectar a distrofina com alta sensibilidade, especificidade e gerar uma análise quantitativa, mas possuem alto tempo de processamento, são complexos em termos de preparação da amostra, tem alto custo e necessita de conhecimento técnico especializado.

A distrofina é uma proteína essencial produzida pelo gene DMD no cromossomo X. Fazendo parte do citoesqueleto muscular, ela é responsável por criar uma ligação primária entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de outra proteína: a actina. Possuindo um formato de bastão, tem quatro domínios funcionais - o terminal N (NT), o domínio central do bastão, o domínio rico em cisteína (CR) e o terminal C (CT). O domínio NT liga-se à actina e o domínio CR ancora a distrofina à membrana muscular por meio da proteína transmembranar β -dístroglicana, que por sua vez vai se conectar com as proteínas da lâmina basal para completar a junção do eixo MEC-citoesqueleto (Zhao et al. 2016). Através do complexo distrofina-glicoproteína (DCG), a distrofina também auxilia na manutenção da integridade muscular, assim como regula diversas vias sintéticas do corpo humano, tais quais como a síntese de óxido nítrico (NO) e a entrada de cálcio.

Uma das terapias gênicas mais bem sucedidas da atualidade é Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPR-Cas) que funciona como uma tesoura molecular, permitindo o corte em pontos específicos do DNA. Inicialmente descoberto por Ishino e colaboradores em 1987, a CRISPR provinha da bactéria *Escherichia coli* e acreditava-se que fazia parte do sistema imune bacteriano para combater infecções virais. Como descrevem Ramesh e Fakoya (2025) o advento da CRISPR-Cas9 transformou o panorama da edição genética, oferecendo uma abordagem mais simples e adaptável, aumentando a praticidade e abrindo novos caminhos para aplicações humanas, animais e agrícolas. Essa tese se dá pois métodos de edição gênica existem há muitos anos,

porém muitas delas enfrentam dificuldades em atingir os genes com precisão e até problemas com respostas imunes. Para além do tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne, a CRISPR-Cas pode ser aplicada na anemia falciforme, doença de Huntington e AIDS.

O método CRISPR-Cas9 possui três formas: DNA, mRNA e RNP. A CRISPR-Cas9 DNA ainda é a mais utilizada tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pois essa estrutura é mais estável e facilita a expressão a longo termo, porém, o uso contínuo dessa variação pode aumentar a quantidade de eventos off-target - mutações fora do sítio alvo. Já o RNP apresenta a menor taxa de mutações off-target, porém a sua administração é dificultada pela complexidade na produção desses complexos, bem como na falta de vetores de administração *in vivo* (Wang, 2025). Por fim, o CRISPR mRNA é a forma mais promissora para administração *in vivo*, pois não há risco de integração ao genoma do hospedeiro, tem uma meia-vida curta e não adentra o núcleo celular, reduzindo o risco de mutações off-target.

Diante do exposto, o uso desse método se torna indispensável para o tratamento de diversas doenças genéticas que outrora não poderiam ser sequer amenizadas. A tecnologia CRISPR se provou um excelente aliado aos humanos na busca pela melhora da qualidade de vida de pacientes acometidos por tais doenças. Através de melhorias contínuas, como o descobrimento de novas variações do CRISPR, a diminuição de casos de edições off-target e da incorporação do genoma viral para casos de mediação por AAV, essa tecnologia se mostra ainda mais promissora em um futuro não tão distante, onde o tratamento para doenças genéticas seja muito eficaz e acessível para todos.

AAV (vetores virais adeno-associados) são um conjunto de vírus não envelopados modificados para entregar DNA a células-alvo, funcionando como um pequeno invólucro que protege o material genético. Os AAVs fazem parte da família dos parvovírus e sua replicação depende da coinfeção com outros vírus. Naso et al. (2017) diz que, apesar de ser um dos vetores de terapia gênica mais estudados, não é o AAV selvagem utilizado, mas sim o AAV recombinante, ou AAVr, que não possui DNA viral, sendo uma nanopartícula proteica criada para atravessar a membrana celular.

Diante do exposto, percebe-se a importância da Biologia Molecular enquanto método de diagnóstico e tratamento tanto para a Distrofia Muscular de Duchenne quanto para outras doenças genéticas, auxiliando assim na melhora da qualidade e expectativa de vida do paciente. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo analisar, através de uma revisão integrativa de casos clínicos, a utilização da técnica de biologia molecular CRISPR-Cas9 como possível tratamento para a Distrofia Muscular de Duchenne.

2 Metodologia

Este estudo é do tipo revisão integrativa e foi realizado através de pesquisas que tiveram como base a pergunta norteadora: “como o uso da CRISPR-Cas9 pode ser útil enquanto tratamento genético na Distrofia Muscular de Duchenne?”, onde buscou-se revisar estudos acerca desse tema.

Estão incluídos neste estudo a literatura científica produzida entre os anos de 2017 e 2025, sendo os artigos de ensaios clínicos, *in vitro* ou *in vivo*, em animais ou outros tecidos.

O uso da CRISPR/cas9 como terapia gênica na Distrofia Muscular de Duchenne: uma revisão integrativa

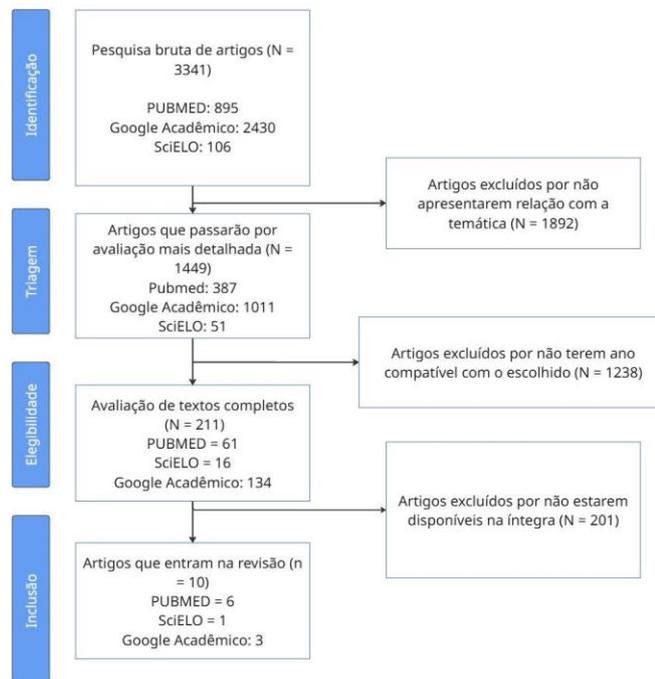
A pesquisa foi feita nas bases de dados Pubmed, Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Google Acadêmico. Os periódicos selecionados relacionam-se com a temática “distrofia muscular de duchenne” e “tratamento genético”, sendo estes distribuídos entre os anos de 2021 a 2025.

As pesquisas foram realizadas através do uso de descritores de busca pelos termos “distrofia muscular de duchenne”, “proteína 9 associada à CRISPR”, “distrofina” e “edição de genes” e suas respectivas correspondências em inglês quando necessário, todos devidamente cadastrados nos Descritores em Ciências da Saúde - DeCS, sendo esta realizada de agosto a novembro de 2025. Esses descritores foram combinados entre si por meio dos operadores booleanos AND e OR.

A partir dos descritores, foram encontrados 3431 resultados no total, dos quais 106 foram no SciELO, 895 no Pubmed e 2430 no Google Acadêmico. Após selecionar apenas os artigos disponíveis na íntegra, sobraram, respectivamente, 30, 109 e 1380. Após garimpar os artigos que se relacionavam com o tema e que não fossem duplicados, restaram 44 artigos no total, dos quais, após sua leitura, foram selecionados 6 do Pubmed, 1 do SciELO e 3 do Google Acadêmico, totalizando 10 artigos.

Após a seleção dos 10 artigos, foi elaborado um quadro em formato de fluxograma descrevendo a seleção dos artigos.

Figura 1- Fluxograma da metodologia da etapa de seleção e inclusão dos 10 artigos presentes nesse estudo.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025)

3 Resultados e Discussão

A partir dos descritores cadastrados no DeCS: “Distrofia Muscular de Duchenne”, “Edição de genes” e “Proteína 9 associado à CRISPR” e dos critérios de inclusão e exclusão, foram encontrados na bases de dados 10 artigos, sendo eles: 6 do Pubmed, 3 do Google Acadêmico e 1 do SciELO.

Após a leitura dos 10 artigos presentes neste estudo, foi elaborado um quadro (Quadro 1) contendo o título do artigo, os autores, o ano de publicação de cada artigo, a metodologia utilizada e os resultados e discussões, todos descritos em ordem cronológica decrescente. Todos os estudos foram desenvolvidos através de ensaios clínicos e foram publicados entre os anos de 2021 e 2025.

No artigo 1, Chen et.al (2021) desenvolveu um método para restaurar o gene DMD através da excisão em larga escala dos exóons 46-54 mediada por CRISPR. Usando células-tronco advindas do músculo gastrocnêmio de um paciente masculino de 4 anos de idade, um camundongo foi xenograftado (Camundongo PDX) para tentar restaurar a expressão de distrofina nas fibras musculares do paciente DMD. Após os estudos, ficou demonstrado que a excisão em larga escala dos exóons do gene DMD mutante foi eficiente em restaurar a expressão de distrofina. Mais de 10% das fibras musculares humanas do modelo PDX expressaram a produção de distrofina após esse tratamento. Portanto, esse método foi eficaz na aplicação de terapias genéticas em modelos in vivo, sendo o CRISPR/Cas9 muito eficiente em restaurar a expressão de distrofina.

Para o segundo artigo, Atmanli e colaboradores (2021) geraram células-tronco pluripotentes da linhagem cardíaca de um paciente com a deleção do éxon 44 do gene DMD (Δ Ex44) e de seu irmão saudável. Através da CRISPR/Cas9, o éxon 45 do gene DMD foi corrigido para gerar linhagens de células-tronco pluripotentes onde a sequência de nucleotídeos foi restaurada por meio de salto de éxons ou reframing. Os cardiomiócitos DMD demonstraram déficits funcionais, estruturais e morfológicos. Tais disfunções foram corrigidas através de CRISPR/Cas9 entregue por vetores virais adeno-associados, onde a pós-diferenciação desses cardiomiócitos reduziram o potencial arritmogênico. Logo, esse estudo foi capaz de demonstrar que a correção do DMD Δ Ex44 através de CRISPR/Cas9 pode mitigar anormalidades funcionais, estruturais e transcricionais consistentes com a cardiomiopatia dilatada independentemente de como o reading frame da proteína é restaurado. Essa descoberta é muito importante pois fornece dados importantes sobre como a edição genética pode ser utilizada para a correção de cardiomiopatias associadas ao gene DMD.

Neste terceiro artigo, Dara et. al (2021) projetou um par de RNAs guias (gRNA) para induzir a deleção dos éxons 48-53 no gene DMD na linhagem de células musculares esqueléticas humanas (HskMC) para corrigir o gene. Os dados demonstraram a edição correta do gene e a correção do reading frame nas células editadas e, apesar da grande deleção de genes, dados obtidos através de PCR em tempo real e imunocoloração fluorescente mostraram uma ótima expressão de distrofina nessas células editadas. A estrutura do gene, apesar da grande remoção de éxons, não deixou de expressar corretamente a distrofina, provando que o método CRISPR/Cas9 é muito eficiente.

No artigo 4, Li e colaboradores (2021) introduziram um deletador de quatro pares de bases (4-bp) no éxon 4 de um camundongo (DMDE4*). Exames ecocardiográficos, histológicos, micro computadorizados e testes de força foram realizados para determinar

os defeitos musculares e cardíacos presentes no camundongo. Após edição por AAV9eTam junto a AAV9-sgRNA em dose única, observou-se um aumento de até 90% na expressão de distrofina no músculo cardíaco. Como resultado dessa edição, as funções do músculo esquelético cardíaco foram melhoradas, levando ao prolongamento da expectativa de vida do modelo murino de pelo menos um ano. Assim como no segundo artigo, a edição genética mediada por CRISPR/Cas9 não só corrigiu deficiências funcionais de células cardíacas, como também ofereceu um tratamento e possibilidades de estudo mais aprofundados sobre a utilização de terapia gênica em cardiomiopatias relacionadas à Distrofia Muscular de Duchenne.

No artigo 5, Kenjo et. al desenvolveu um lipídio ionizável dependente de pH com três caudas hidrofóbicas e formularam em uma nanopartícula lipídica (LNP) para atingir o músculo esquelético. Utilizando um camundongo, o autor substituiu o éxon 45 do animal com o éxon 45 de um humano e deletaram o éxon 44. Após essa alteração, o camundongo apresentou perda de distrofina, hipertrofia da panturrilha e aumento de creatina quinase (CK) no plasma. Após uma única injeção de LNP-CRISPR, o camundongo teve um aumento na expressão da proteína distrofina através da terapia genética por salto de éxons por pelo menos um ano. Além disso, esse estudo foi crítico ao método de CRISPR mediado por AAV a longo termo, pois, segundo o autor, mutações fora do alvo podem ocorrer se mais de uma dose for injetada, enquanto o método desenvolvido pelo ensaio, LNP, é seguro e pode ser administrado repetidas vezes intramuscularmente com efeito de recuperação da expressão de distrofina acumulativo.

No sexto artigo, Majeu (2022) e colaboradores desenvolveram um método que permite carregar vesículas extracelulares (EVs) com ribonucleoproteínas (RNPs) CRISPR consistidas de proteínas SpCas9 e RNAs guias (gRNA). Essas EVs foram purificadas do soro humano ou de um camundongo usando o método de ultrafiltração e cromatografia por exclusão de tamanho. Após carregar as RNPs nas EVs, ficou demonstrado que essas ribonucleoproteínas são excelentes carreadoras in vitro e restauraram a expressão da proteína fluorescente tdTomato nas fibras musculares de camundongos Ai9. EVs carregando RNPs também foram injetadas no modelo de camundongo direcionados aos íntrons 22 e 24 do gene DMD com uma mutação sem sentido no éxon 23. 19% do cDNA extraído desses camundongos tratados apresentou as deleções pretendidas nos éxons 23 e 24. As RNPs injetadas sem EVs foram ineficientes na deleção dos éxons. Esse método traz uma nova abordagem sobre uma administração rápida e segura da CRISPR/Cas9, mostrando que os tratamentos genéticos da Distrofia Muscular de Duchenne só evoluem.

No artigo 7, Hanson et. al (2022) utilizaram o método CRISPR/Cas9 de *Staphylococcus aureus* junto a uma estratégia de corte duplo mediada por um par de vetores virais adeno-associados sorotipo 9 (AAV9) para restaurar a distrofina de camundongos afetados por duplo nocaute (dKO) de distrofina/utrofina. gRNAs foram projetados para excisar o éxon 23 do gene DMD. Essa excisão foi confirmada no DNA por PCR e sequenciamento de Sanger. A restauração da expressão da distrofina foi medida por western blot e coloração por imunofluorescência, sendo essa restauração mais eficaz no diafragma, onde a expressão observada foi de 5,7%. Porém, o tratamento com CRISPR foi ineficaz para prolongar a sobrevivência do camundongo dKO com a distrofina sendo expressa de maneira irregular dentro da fibra muscular dos músculos esqueléticos.

Análises posteriores mostraram a integração do DNA do AAV ao genoma do camundongo nos locais de corte do CRISPR. Essa informação vai exatamente de encontro à opinião do autor do artigo 5, onde ele expressa sua preocupação em relação à mediação por AAV. Portanto, esse estudo destacou as dificuldades e desafios quanto ao desenvolvimento bem-sucedido de terapias genéticas CRISPR e suas mediações no contexto da Distrofia Muscular de Duchenne.

Para o 8º artigo, Gapinske e colaboradores (2023) desenvolveram um novo método de CRISPR chamado CRISPR-SKIP, uma estratégia de edição de bases (BEs) para induzir um salto de éxons permanente ao introduzir mutações C > T ou A > G no aceitador de splicing no DNA genômico. Essa nova terapia pode ser adaptada para corrigir algumas formas da Distrofia Muscular de Duchenne ao interromper o aceitador de splicing no éxon 45 do gene DMD humano com alta eficiência. Após criar uma linhagem de mioblastos humanos com Distrofia Muscular de Duchenne com deleção do éxon 44 (DMD Δ 44), foram aplicados BEs e sgRNAs por vetores lentivirais (FNLS e ABERA). Linhagens clonais celulares foram então produzidas por transdução e diferenciadas em miotubos de músculo esquelético em 5 dias. Após a diferenciação, a taxa de edição do DNA e o salto do éxon 45 foram medidos por sequenciamento de nova geração (NGS) e foi descoberto que as linhagens FNLS e ABERA editaram o aceitador de splicing em 27,8% e 10,1% respectivamente. Além disso, para caracterizar completamente o espectro das alterações de splicing introduzidas por alterações de base, foi realizado NGS no mRNA dos éxons 43 a 47. Enquanto a FNLS gerou uma taxa de salto de éxons de 77,9%, a ABERA gerou 55% de taxa de salto de éxons. O trabalho demonstrado nesse artigo demonstrou que mudanças em uma única base para interromper o aceitador de splicing, levando a salto de éxons e correção do reading frame, podem restaurar a expressão da proteína distrofina com sucesso. Assim como no quinto artigo, o autor visou alterações no éxon 45 para restaurar a expressão da distrofina, sendo um sucesso em ambos os casos.

No nono artigo, Poyatos-García et. al introduziram um deletador de éxons 45-55 (del45-55), editado por CRISPR/Cas9, que copia os pontos de quebra intrônicos achados em um subconjunto de pacientes que apresentavam essa forma de distrofinopatia na linhagem celular de um paciente com Distrofia Muscular de Duchenne. Essa linhagem celular editada foi caracterizada ao avaliar a expressão da distrofina e o estado miogênico. Após a introdução do del45-55, a expressão da proteína distrofina foi restaurada e os efeitos miogênicos foram amenizados nos mioblastos editados. Para além de confirmar a capacidade do CRISPR/Cas9 em criar mutações personalizadas, também foi gerada uma linhagem de mioblastos imortalizada derivada de um paciente específico com um del45-55. De maneira geral, esse artigo ajudou a aprofundar alguns fatores desconhecidos sobre a fisiopatologia da Distrofia Muscular de Duchenne, assim como foi bem sucedida em restaurar a expressão da distrofina. Tal como os artigos oitavo, quinto e terceiro, esse artigo também foi bem sucedido em editar o éxon 45, ainda que esse éxon não tenha sido seu foco.

Para o 10º artigo, Xianjin e colaboradores (2025) sintetizaram uma série de lipopeptídeos (XP) anfifílicos responsivos a pH duplo, compostos de um ácido graxo lipamino cationizável lipofílico (LAF) e unidades succinil-tetraetilenopentamina polar (Stp) cationizáveis hidrofílicas, como veículos de entrega de RNP CRISPR/Cas9. Usando um modelo de célula DMD, foi utilizado o sistema de células HeLa mcherry-DMDEX23 onde a sequência de sgRNA (SgDMDEX23) guiou o Cas9 através da sequência PAM

O uso da CRISPR/cas9 como terapia gênica na Distrofia Muscular de Duchenne: uma revisão integrativa

(Positive Allosteric Modulator) para induzir uma quebra de fita dupla (DSB) próximo ao éxon 23 perto do sítio de splicing. Como resultado dessa mutação na sequência do éxon 23 da DMD, as células mCherry funcional possível de ser detectada por uma fluorescência vermelha na citometria de fluxo. Para chegar no potencial que as formulações LAF-Xp Cas9 tem de eficiência em salto de éxons, as células HeLa mCherry-DMDEX23 foram transfectadas com complexos 1611 e 1719 Cas9 RNP a 10nM RNP por 24h e então foram incubadas por mais 2 dias. A maioria das formulações exibiu alta eficiência no salto de éxons mediada por edição gênica, sendo os resultados dos complexos 1611 maiores que os dos complexos 1719. Esse estudo foi capaz de provar que os LAF-XP anfifílicos são excelentes carreadores de RNP Cas9, trazendo mais uma alternativa para o universo de edição genética mediada por Cas9 e transportada por algum outro complexo.

Apesar da utilização de diferentes tipos de mediação e da discordância de certos autores em relação a determinados tipos de mediação, como a AAV9, para a entrega do CRISPR-Cas9, os tratamentos descritos nos artigos mostram uma boa eficiência na edição dos éxons do gene DMD, com comprovação a partir da re-expressão da distrofina no tecido muscular esquelético e cardíaco.

Quadro 1: descrição do nome do artigo, autores, ano de publicação, metodologia utilizada e resultados e discussões de cada artigo selecionado.



Nome do artigo	Ano	Autores	Metodologia	Resultados e discussões
Artigo 1: In vivo genome editing in mouse restores dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy patient muscle fibers	2021	Chen <i>et al.</i>	Este estudo desenvolveu uma nova estratégia para restaurar o gene <i>DMD</i> através de uma excisão de larga escala dos éxons 46 a 58 através de CRISPR. Além disso, um camundongo imunodeficiente foi xenografado de células tronco esqueléticas de um paciente com distrofia muscular de Duchenne. Os componentes genéticos editados por CRISPR foram administrados por vírus adeno-associados (AAVs)	Os dados demonstraram que uma excisão em larga escala dos éxons <i>DMD</i> mutantes resultaram em uma boa restauração na expressão da proteína distrofina. Também ficou confirmado que o CRISPR de <i>Provotella</i> e <i>Francisella</i> (Cas12a) tiveram tanta eficiência em corrigir a mutação <i>DMD</i> quanto a CRISPR-Cas9. A expressão da distrofina <i>in vivo</i> foi funcional e demonstrada pela expressão do membro do complexo glicoproteico da distrofina, β -dístroglicano.
Artigo 2: Cardiac Myoediting Attenuates Cardiac Abnormalities in Human and Mouse Models of Duchenne Muscular Dystrophy	2021	Atmanli <i>et al.</i>	No presente estudo foram geradas células-tronco pluripotentes de um paciente e de seu irmão com a deleção do exón 44 do gene <i>DMD</i> . Através do método CRISPR/Cas9, foi produzida uma nova linhagem de células-tronco pluripotentes corrigidas onde o gene <i>DMD</i> foi restaurado por <i>reframing</i> ou salto de éxons.	Os cardiomiócitos <i>DMD</i> demonstraram déficits morfológicos, estruturais e funcionais comparado aos cardiomiócitos controle. Já os cardiomiócitos de ambas as linhagens genéticas corrigidas foram similares aos do grupo controle. O sequenciamento do RNA de cardiomiócitos <i>DMD</i> mostraram desregulação transcricional consistentes com cardiomiopatia dilatada, enquanto esses efeitos foram mitigados nos cardiomiócitos geneticamente editados. A correção dos cardiomiócitos <i>DMD</i> por AAV9 mostrou uma atenuação de anormalidades estruturais, funcionais e transcricionais.
Artigo 3: Dystrophin gene editing by CRISPR/Cas9 system in human skeletal muscle cell line (HskMC)	2021	Dara <i>et al.</i>	Neste estudo, foi introduzido um novo par de RNA guias (gRNA) para induzir uma grande deleção dos éxons 48 a 53 no gene <i>DMD</i> na linhagem de células musculares esqueléticas humanas (HskMC) para corrigir o gene.	Os dados mostraram a edição do gene <i>DMD</i> , através da deleção dos éxons 48-53, como sendo bem-sucedida e da correção da <i>reading frame</i> nas células editadas. Apesar da grande deleção no gene <i>DMD</i> , os dados da PCR em tempo real e imunocoloração fluorescente demonstram também a expressão bem-sucedida de distrofina nas células editadas.

O uso da CRISPR/cas9 como terapia gênica na Distrofia Muscular de Duchenne: uma revisão integrativa

<p>Artigo 4: Therapeutic Exon Skipping Through a CRISPR-Guided Cytidine Deaminase Rescues Dystrophic Cardiomyopathy in Vivo</p>	<p>2021</p>	<p>Li <i>et al.</i></p>	<p>Para este experimento científico, foi introduzido um deletador 4-bp no éxon 4 de um camundongo. Utilizando-se de ecocardiografia, tomografia microcomputadorizada, medição de força muscular e análises histológicas, foram determinados defeitos cardíacos e no músculo esquelético no camundongo. Com base na técnica CRISPR/CAS9 em AAV9, foi introduzido um salto de éxons para resgatar a cardiomiopatia distrófica <i>in vivo</i>.</p>	<p>A administração de uma dose única de AAV9-eTAM causou mais de 50% de salto de éxons nas transcrições da <i>DMD</i> e restaurou até 90% da distrofina no coração. A remodelação ventricular precoce foi prevenida e a função dos músculos cardíaco e esquelético foram melhoradas, levando a um aumento da expectativa de vida dos camundongos. A restauração da distrofina e o resgate fisiopatológico da distrofia muscular durou por um ano.</p>
<p>Artigo 5: Low immunogenicity of LNP allows repeated administrations of CRISPR-Cas9 mRNA into skeletal muscle in mic</p>	<p>2021</p>	<p>Kenjo <i>et al.</i></p>	<p>Neste estudo foi desenvolvido um lipídio ionizável dependente de pH com três caudas hidrofóbicas e formulado em um sistema de entrega através de uma nanopartícula lipídica (LNP) para atingir o músculo esquelético de um camundongo.</p>	<p>LNP-Cas9 mRNA e LNP-sgRNA foram injetados no camundongo Rosa26 do grupo C57BL/6J. Quatro dias após a injeção foi avaliada a taxa de <i>indel</i> e foi descoberto que a co-injeção de LNP-Cas9/LNP-sgRNA induziu uma edição genômica dependente das doses. Esses dados demonstram que LNPs podem induzir a edição genética mediada por Crispr-Cas9/sgRNA no tecido muscular esquelético</p>

<p>Artigo 6: Serum extracellular vesicles for delivery of CRISPR-CAS9 ribonucleoproteins to modify the dystrophin gene</p>	<p>2022</p>	<p>Majeau <i>et al.</i></p>	<p>Na presente experiência científica, buscou-se utilizar vesículas extracelulares (VEs) como mecanismos carreadores de ribonucleoproteínas (RNPs) consistindo de proteínas SpCas9 e RNAs guias para restaurar a expressão da proteína fluorescente tdTomato em fibras musculares de camundongos com o transgene Ai9. Foram utilizados transfectantes proteicos para carregar as RNPs em VEs. As VEs foram purificadas do soro de humanos e camundongos utilizando ultrafiltração e exclusão de tamanho por cromatografia.</p>	<p>Os VEs foram primeiramente testados através de injeção intravenosa e intramuscular em camundongos para testar efeitos colaterais. Nenhum efeito como inflamação ou dor foi reportado durante sete dias após a injeção. VEs carregadas com RNPs foram injetadas nos camundongos com o transgene Ai9 e, após 8 dias, foram sacrificados. Seções musculares da tibia anterior foram analisadas em microscópio para detectar a presença da proteína vermelha fluorescente tdTomato e ficou determinado que 20% ($\pm 1,7\%$) das fibras musculares apresentaram fluorescência vermelha. Para confirmar a adição do gene tdTomato, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi empregada no DNA extraído desses músculos e uma banda de baixo peso molecular foi detectada do tamanho esperado do gene Ai9 editado.</p>
<p>Artigo 7: Non-uniform dystrophin re-expression after CRISPR-mediated exon excision in the dystrophin/utrophin double-knockout mouse model of DMD</p>	<p>2022</p>	<p>Hanson <i>et al.</i></p>	<p>Para este estudo, houve a investigação da eficiência do sistema Crispr-Cas9 advindo de bactérias do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> administradas por um par de vírus adeno-associados de sorotipo 9 (AA9) para restaurar a distrofina em camundongos severamente afetados por duplo nocaute (dKO) de distrofina/utrofina.</p>	<p>Foi observada um aumento de 5% e 5,7% na expressão de distrofina no músculo cardíaco e no diafragma em camundongos com duplo nocaute (dKo) que receberam injeções peritoneais de Crispr mediadas por AAVs, e de 2,9 e 7,1% no coração e no músculo tibial anterior daqueles camundongos tratados por injeção intravenosa.</p>

O uso da CRISPR/cas9 como terapia gênica na Distrofia Muscular de Duchenne: uma revisão integrativa

<p>Artigo 8: Targeting Duchenne muscular dystrophy by skipping DMD exon 45 with base editors</p>	<p>2023</p>	<p>Gapinske <i>et al.</i></p>	<p>Neste estudo foi utilizado a tecnologia CRISPR-SKIP (fusão da Crispr-Cas9 com uma molécula de desoxiadenosina ou citidina desaminase) para interromper o processo de splicing do éxon 45 para gerar um salto de éxons permanentes em células cultivadas. Ainda nesse contexto, foi demonstrado que editores de base Cas9 (BEs) com inteína dividida com alvo no éxon 45 da DMD são eficientes e podem editar o acceptor de <i>splicing</i> após administração de vetores virais adeno-associados (AAVs)</p>	<p>Utilizando linhagens celulares corrigidas com BEs, demonstrou-se que o salto do éxon em células DMDΔ44 restaurou a expressão da proteína distrofina. Além disso, foi utilizado CRISPR-SKIP, entregue por AAV, em um modelo de camundongo <i>in vivo</i> para editar o acceptor de <i>splicing</i> do éxon 45 do DMD. Fora injetado no bíceps femoral 2E11 genomas e depois mais 1E10 de AAV9-GFP (vírus adeno-associados junto a uma proteína verde fluorescente) e quatro semanas após a injeção, os núcleos dos músculos injetados foram triados por fluorescência celular ativada (FACS) para enriquecimento de núcleos positivos e não foi encontrada diferença significativa de núcleos positivos com GFP.</p>
<p>Artigo 9: Deletion of exons 45 to 55 in the DMD gene: from the therapeutic perspective to the in vitro model</p>	<p>2024</p>	<p>Poyatos-García <i>et al.</i></p>	<p>Foi introduzido um deletador (del45-55), cultivado de um conjunto de pacientes com <i>DMD</i> e geneticamente modificado por Crispr-Cas9, dos éxons 45 a 55 que mimetiza os pontos de quebra intrônicos na linhagem celular de um paciente com a distrofia muscular de Duchenne. A linhagem celular foi caracterizada avaliando a expressão de distrofina e o estado miogênico</p>	<p>A expressão de distrofina foi restaurada e os defeitos miogênicos foram amenizados nos mioblastos que foram editados com <i>del45-55</i>. Para além de confirmar o potencial de criar mutações personalizadas por Crispr-Cas9, também foi gerada uma linhagem imortalizada de mioblastos derivada de um paciente com <i>del45-55</i>.</p>

Artigo 10: Dual pH-responsive CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein xenopeptide complexes for genome editing	2025	Xianjin <i>et al.</i>	Estudo descritivo com experimentação científica utilizando xenopeptídeos anfifílicos para administrar uma ribonucleoproteína capaz de editar o genoma de quatro linhagens de células repórteres, incluindo um modelo de célula repórter modificada com <i>exon skipping</i>	Através da utilização de xenolipídeos anfifílicos responsivos a pH duplo compostos de ácidos graxos e lipoaminos cationizáveis lipofílicos (LAF-XP) como sistema de entrega em uma célula modelo com DMD, foi induzida uma quebra de fita dupla perto da área de <i>splicing do éxon 23</i> em células HeLa mCherry-DMDEx23. Para avaliar o potencial da eficiência do salto de éxons, essas células foram transfectadas com N/P 24 por 24h e então incubada por dois dias. Os resultados indicam uma alta eficiência no salto de éxons por edição genética mediada por complexos Cas9, além disso, essa descoberta levanta um ponto-chave: os LAF-XP são ótimos enquanto sistema de entrega de Cas9 e sgRNA.
---	------	-----------------------	---	---

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025)

Considerações finais

O uso da CRISPR-Cas9 enquanto terapia genética para a Distrofia Muscular de Duchenne se mostrou uma alternativa mais assertiva em relação a outros métodos como a fisioterapia, medicamentos e cirurgias, mas precisa de mais avanços para se tornar mais eficaz.

Considerando os dados de prevalência da DMD, há um senso de urgência em termos de tratamento ativo para tais doenças. Seja usando vetores virais adeno-associados (AAVs), ribonucleoproteínas (RNPs), vesículas extracelulares (EVs) ou quaisquer outros tipos de mediação, a tecnologia CRISPR é, para além do diagnóstico, capaz de oferecer um tratamento humanizado e personalizado, ainda que necessite de mais estudos que possam alavancar o seu potencial terapêutico.

Referências Bibliográficas

ATMANLI, A. *et al.* Cardiac Myoediting Attenuates Cardiac Abnormalities in Human and Mouse Models of Duchenne Muscular Dystrophy. **Circulation Research**, v. 129, n. 6, p. 602–616, 3 set. 2021.

BONFANTE, B. G.; BUCCO, S.; PINCULINI, A. P. G.; HABERMANN, M. A. M. Distrofia muscular de Duchenne: uma revisão narrativa. **Observatório de la Economía Latinoamericana**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. e4673, 2024. Disponível em:



<https://ojs.observatoriolatinoamericano.com/ojs/index.php/olel/article/view/4673>. Acesso em: 26 out. 2025.

CARVALHO, Candida Luiza Tonizza de; LEVY, Leslie Cristina Pinto; MARQUES, Roberta Muniz. Distrofia Muscular de Duchenne: Duchenne Muscular Dystrophy. **RCMOS - Revista Científica Multidisciplinar O Saber**, Brasil, v. 1, n. 1, 2025. Disponível em:

<https://submissoesrevistarcmos.com.br/rcmos/article/view/808>. Acesso em: 26 out. 2025.

CHEN, M.; SHI, H.; GOU, S. *et al.* In vivo genome editing in mouse restores dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy patient muscle fibers. **Genome Medicine**, v. 13, n. 57, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00876-0>.

DARA, M. *et al.* Dystrophin gene editing by CRISPR/Cas9 system in human skeletal muscle cell line (HSKMC). **Iran Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, n. 8, p. 1153-1158, ago. 2021.

GAPINSKE, Michael *et al.* Targeting Duchenne muscular dystrophy by skipping DMD exon 45 with base editors. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 33, p. 572-586, 2023.

HANSON, B. *et al.* Non-uniform dystrophin re-expression after CRISPR-mediated exon excision in the dystrophin/utrophin double-knockout mouse model of DMD. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 30, p. 379-397, dez. 2022.

KENJO, E.; HOZUMI, H.; MAKITA, Y. *et al.* Low immunogenicity of LNP allows repeated administrations of CRISPR-Cas9 mRNA into skeletal muscle in mice. **Nature Communications**, v. 12, n. 7101, 2021.

LI, J. *et al.* Therapeutic Exon Skipping Through a CRISPR-Guided Cytidine Deaminase Rescues Dystrophic Cardiomyopathy in Vivo. **Circulation**, v. 144, n. 22, p. 1760-1776, 30 nov. 2021.

ŁOBODA, A.; DULAK, J. Cell therapy for Duchenne muscular dystrophy: promises, challenges, and controversies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 82, n. 1, p. 356, out. 2025.

LUO, X. *et al.* Dual pH-responsive CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein xenopeptide complexes for genome editing. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 205, p. 106983, 2025.

MAJEAU, N. *et al.* Serum extracellular vesicles for delivery of CRISPR-CAS9 ribonucleoproteins to modify the dystrophin gene. **Molecular Therapy**, v. 30, n. 7, p. 2429-2442, 6 jul. 2022.

NASO, M. F. *et al.* Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. **BioDrugs**, v. 31, n. 4, p. 317-334, ago. 2017.

PORTELA, M. V. M. *et al.* Distrofia muscular de Duchenne. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 7, p. e12912, 9 jul. 2023.

POYATOS-GARCÍA, J. *et al.* Deletion of exons 45 to 55 in the DMD gene: from the therapeutic perspective to the in vitro model. **Skeletal Muscle**, v. 14, n. 1, p. 21, out. 2024.

PREVALENCE of Duchenne Muscular Dystrophy in the world: a systematic review and meta-analysis. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. e105131047171, 2024. Disponível em: <https://rsdjournal.org/rsd/article/view/47171>. Acesso em: 26 out. 2025.

RAMESH, B.; FAKOYA, A. O. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas Unleashed: Transforming Gene Editing With Breakthroughs, Applications, and Ethical Dilemmas. **Cureus**, v. 17, n. 11, p. e95908, nov. 2025.

SARVUTIENE, J. *et al.* Advances in Duchenne Muscular Dystrophy: Diagnostic Techniques and Dystrophin Domain Insights. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 8, p. 3579, abr. 2025.



Joao Victor de Almeida Ambrosio, Deborah Moura Rebouças

WANG, S. *et al.* Unlocking mRNA-driven CRISPR-Cas9 gene therapy via optimizing mRNA and the delivery vectors. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 36, n. 4, p. 102737, out. 2025.

ZANOTELI, E.; FRANÇA, M. C.; MARQUES, W. Gene-based therapies for neuromuscular disorders. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 82, n. 6, p. 1-10, 2024.

ZHAO, Junling *et al.* Dystrophin contém vários domínios independentes de ligação à membrana. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 17, p. 3647–3653, 1 set. 2016.



Editorial

Editor-chefe:

Vicente de Paulo Augusto de Oliveira Júnior
Centro Universitário Fanor Wyden
vicente.augusto@wyden.edu.br

Editora responsável:

Ozângela de Arruda Silva
Centro Universitário Fanor Wyden
ozangela.arruda@wyden.edu.br

Autor(es):

Joao Victor de Almeida Ambrosio
Centro Universitário Fanor Wyden
jaovictuuh@gmail.com

Contribuição: *Investigação, escrita e desenvolvimento do texto.*

Deborah Moura Rebouças
Centro Universitário Fanor Wyden
deborah.reboucas@professores.unifanor.edu.br
Contribuição: *Investigação, orientação, escrita e desenvolvimento do texto.*

Submetido em: 26.11.2025

Aprovado em: 27.12.2025

Publicado em: 27.12.2025

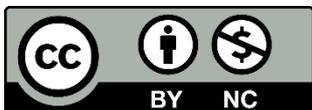
DOI: 10.5281/zenodo.18100491

Financiamento: N/A

Como citar este trabalho:

AMBROSIO, Joao Victor de Almeida; REBOUÇAS, Deborah Moura. O USO DA CRISPR/CAS9 COMO TERAPIA GÊNICA NA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. **Duna: Revista Multidisciplinar de Inovação e Práticas de Ensino**, [S. l.], p. 374–390, 2025. DOI: 10.5281/zenodo.18100491. Disponível em: <https://wyden.periodicoscientificos.com.br/index.php/jornadacientifica/article/view/1167>. Acesso em: 30 dez. 2025. (ABNT)

Ambrosio, J. V. de A., & Rebouças, D. M. (2025). O USO DA CRISPR/CAS9 COMO TERAPIA GÊNICA NA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. *Duna: Revista Multidisciplinar De Inovação E Práticas De Ensino*, 374–390. <https://doi.org/10.5281/zenodo.18100491> (APA)



© 2025 Duna – Revista Multidisciplinar de Inovação e Práticas de Ensino. Centro Universitário Fanor Wyden – UniFanor Wyden. Este trabalho está licenciado sob uma licença *Creative Commons* Atribuição - Não comercial - Compartilhar 4.0 Internacional CC-BY NC 4.0 Internacional).

