

Conferência internacional em Bruxelas, Bélgica - 17 a 19 de novembro de 2009

## ***Derrubando barreiras em medicina translacional para doenças neuromusculares hereditárias***

Em nome do TREAT-NMD e do Instituto Nacional de Saúde dos EUA, organizadores deste encontro, eu, **Günter Scheuerbrandt**, bioquímico alemão, escrevi este relatório para todos os portadores de doenças neuromusculares, jovens e adultos, para suas famílias e cuidadores. Ele contém o resumo das 27 apresentações do evento e de algumas das discussões ocorridas entre elas.

Tentei escrevê-lo de forma a lhes permitir compreender a maior parte do que foi apresentado e discutido. Todavia, tive que manter o texto curto, porque não havia como explicar todos os detalhes científicos. Assim, se você realmente deseja compreender as diferentes abordagens utilizadas nas pesquisas de terapias para ao menos uma das doenças, a distrofia muscular de Duchenne, deve ler meus relatórios, que podem ser encontrados nas minhas páginas na internet, no endereço <http://www.duchenne-information.eu>, e copiá-las de lá no formato pdf em inglês, espanhol ou alemão.

Como fiz nos meus outros relatórios, escrevi os nomes dos cientistas omitindo seus títulos acadêmicos. Todavia muitos deles são professores, e praticamente todos são mestres ou doutores.

Os dirigentes da conferência foram **Kate Bushby**, da organização europeia TREAT-NMD, sediada em Newcastle upon Tyne, Reino Unido, e **John Porter**, do Instituto Nacional de Saúde dos EUA, NIH, sediado em Bethesda, perto de Washington, DC, nos EUA.

Participaram do encontro cerca de 350 pessoas vindas de 26 países, especialistas clínicos, pesquisadores, e representantes de nossa comunidade neuromuscular, para discutir questões-chave e problemas que devem ser abordados e solucionados, para que novas e promissoras terapias e tratamentos sejam rapidamente trazidos para a clínica, isto é, tornem-se disponíveis para vocês, pacientes, o mais rapidamente possível e onde quer que estejam.

O programa completo e os resumos dos 129 cartazes exibidos no encontro podem ser encontrados no endereço:

<http://www.treat-nmd.eu/conference/TREAT-NMD%20Conference%20Abstract%20Book%202009.pdf>

### **Distrofia muscular de Duchenne: a longa caminhada das partes rumo ao todo**

Palestra de abertura por **Gertjan van Ommen**, Universidade de Leiden, Holanda.

Durante os primeiros 120 anos desde que Guillaume Duchenne descreveu a distrofia muscular de Duchenne, em 1868, até a descoberta do gene da distrofina e de sua proteína, em 1986/87, nada de significativo ocorreu que pudesse ajudar os pacientes. E demorou mais uma década até que uma técnica genética para uma terapia fosse proposta em meados dos anos 90: o **salto de exon** (exon skipping) "para esconder exons do mecanismo de splicing (remoção de íntrons e união dos exons)". Ele deve restaurar o quadro de leitura no RNA mensageiro, produzir uma proteína distrofina mais curta, e alterar os graves sintomas da distrofia muscular de Duchenne para algo similar à distrofia muscular de Becker, normalmente muito menos grave.

Os primeiros pedidos de financiamento para o desenvolvimento dessa técnica não foram bem-sucedidos, porque, à época, o salto de exon era considerado "um belo truque de festas que nunca funcionaria na prática".

Contudo em 2000, cientistas holandeses conseguiram demonstrar que em uma cultura de células musculares obtidas de um menino com Duchenne, e deleção dos exons 48-50, um oligonucleotídeo antisense (OA) direcionado ao exon 51 causou o salto daquele exon, produzindo uma distrofina de Becker em fibras musculares isoladas. A primeira garrafa de champanhe havia sido aberta, e em breve muitas outras mais viriam, quando os passos seguintes rumo a uma terapia com a técnica do salto de exon foram também bem-sucedidos.

Os cientistas logo perceberam que “a distrofia muscular de Duchenne era uma doença querendo uma cura”, porque sem a distrofina, as membranas dos músculos desenvolviam buracos e fissuras, mas não as dos outros órgãos. Assim, as drogas para salto de exon conseguem penetrar facilmente nas fibras musculares, isto é, elas são específicas para músculos.

Entretanto, o salto de exon só conseguirá diminuir a velocidade da degeneração da distrofia muscular de Duchenne para algo semelhante à distrofia muscular de Becker, muito mais lenta. Ela será uma terapia efetiva, mas não a cura completa.

Recentemente foram efetuados quatro ensaios clínicos com resultados positivos, dos quais participaram quatro meninos portadores de Duchenne que necessitavam saltar o exon 51. Dois dos testes foram “provas de princípio”, com injeções locais em um único músculo, e dois testes foram sistêmicos, com injeções da droga na corrente sanguínea para que alcançasse todos os músculos.

Saltar um ou mais exons ajudaria cerca de 80% de todos os pacientes com Duchenne. O maior grupo de pacientes, 13% do total, necessitaria saltar apenas o exon 51.

A companhia farmacêutica **GlaxoSmithKline** fará pagamentos sem precedentes de até 680 milhões de dólares à companhia holandesa Prosensa, em Leiden, para o desenvolvimento de drogas para saltar os exons 51 e 44, e posteriormente mais dois outros exons, quando o próximo grande estudo clínico com 150 meninos com Duchenne utilizando essa técnica genética apresentar algum benefício clínico significativo.

No curso dos próximos anos a técnica do salto de exon estará plenamente desenvolvida para ser utilizada em terapias contra a distrofia muscular de Duchenne, mas há uma série de outras doenças onde essa técnica genética pode ser usada para reparar proteínas, alterar sua localização dentro das células, ou remover completamente proteínas que causam doenças.

O Dr. Gertjan van Ommen encerrou sua palestra salientando a importância dos “biobancos”, bancos de dados internacionais contendo dados padronizados de pacientes com doenças raras, e não tão raras, mas ainda intratáveis. Isso permitiria que os cientistas identificassem qual o mecanismo molecular de uma doença, em todos os detalhes, e desenvolvessem técnicas genéticas bem-sucedidas para terapias efetivas e precisamente direcionadas, ou mesmo uma cura total.

## Transformando em realidade os testes clínicos para doenças neuromusculares

**Cristina Csimma** (Viridante Pharmaceuticals, Cambridge MA, USA), presidente do Comitê Consultivo para Terapias do TREAT-NMD, TACT, iniciou a primeira sessão do encontro com sua apresentação “**Seguindo adiante com o TACT**” (*Moving forward with TACT*), explicando como o novo comitê, criado pelo TREAT-NMD no início de 2009, auxiliará pesquisadores acadêmicos e da indústria, que avaliam terapias para doenças neuromusculares.

A revisão e a avaliação do TACT têm por finalidade auxiliar os candidatos na preparação e execução de testes clínicos, levando em conta não só o potencial científico, mas também um caminho realista de desenvolvimento que facilite posteriormente uma potencial aprovação de comercialização de suas drogas

candidatas.

As revisões serão efetuadas em íntima parceria com cientistas, clínicos, organizações de pacientes, e com a opinião da indústria e dos órgãos reguladores do desenvolvimento de drogas.

O TACT inclui 42 membros com amplo conhecimento científico e experiência de desenvolvimento em doenças neuromusculares (DNM). Seus nomes, especialidades e fotografias, podem ser vistos no endereço:

<http://www.treat-nmd.eu/about/governance/TACT/>.

Os clínicos e os pesquisadores em doenças neuromusculares do meio acadêmico, ou da indústria, onde quer que estejam, quando passam a considerar um composto como candidato a testes clínicos, podem solicitar que o TACT avalie suas estratégias de pesquisa, para obter orientações que possam ajudar a fortalecer seus programas e prepará-los para a implantação dos testes. Tais orientações prévias fornecerão um caminho mais eficaz à frente, e evitará enganos e duplicidades.

O relatório de avaliação do TACT será um aconselhamento objetivo e confidencial, sem custos, baseado principalmente no projeto de pesquisa, nos dados pré-clínicos, e em quaisquer dados clínicos disponíveis em de doenças. Um resumo da avaliação será publicado na internet, na página do TREAT-NMD, para proporcionar informação e transparência à comunidade em geral. Os pesquisadores receberão o relatório de avaliação dentro de seis meses após a reunião do TACT, que baseará suas críticas no requerimento preenchido antecipadamente à reunião (um formulário de 15 páginas pode ser obtido no endereço da internet acima).

A primeira reunião para avaliação de medicamentos do TACT ocorrerá em 6 e 7 de fevereiro de 2010, em Roma, para avaliar três requerimentos para a distrofia muscular de Duchenne: losartan, isosorbide, e Flavocoxid. Os requerimentos para a segunda reunião de avaliação, que ocorrerá em 5 e 6 de junho em Barcelona, podem ser enviados até 15 de março de 2010 para: [emma.heslop@ncl.ac.uk](mailto:emma.heslop@ncl.ac.uk).

Para apresentar o segundo exemplo de uma recente cooperação entre especialistas, **Michael Shy** (Universidade Estadual de Wayne, Detroit, USA), da Associação CMTA ([www.charcot-marie-tooth.org](http://www.charcot-marie-tooth.org)), falou sobre a iniciativa **STAR (Star Initiative)**, para desenvolver tratamentos para a doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT).

A CMT atinge cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo. Ela não representa risco à vida, mas os pacientes perdem lentamente a capacidade de utilizar pés, pernas, mãos e braços, à medida que seus músculos enfraquecem por causa da degeneração dos nervos que os estimulam.

Cerca de 50% de todos os pacientes manifestam a CMT1A, a forma mais comum das mais de 30 diferentes causas genéticas da CMT. Ela é causada por uma duplicação em um dos genes do cromossomo 17, resultando em uma produção exacerbada da proteína mielina periférica 22, ou PMP22, nas células de Schwann, que produzem a mielina, matéria isolante que envolve as fibras nervosas, os axônios. Uma quantidade exagerada de PMP22 leva à deterioração desses nervos, e causa atrofia do tecido muscular para os quais eles deveriam conduzir os sinais vindos do cérebro.

Em uma terapia para a CMT, a quantidade de PMP22 deve ser reduzida. Para encontrar uma droga candidata que faça isso, a associação CMTA fundou a “**Iniciativa STAR, uma estratégia para acelerar pesquisas**” (STAR Initiative, a Strategy to Accelerate Research), com o apoio do Dr. John Porter, do Instituto Nacional de Desordens Neurológicas e Acidentes Vasculares Cerebrais”, NINDS. A iniciativa é resultante de uma parceria entre a organização de pacientes CMTA e pessoas do mundo dos negócios, das universidades e do governo.

A primeira tarefa foi desenvolver uma técnica automática de triagem em alta velocidade para encontrar, em meio a um número muito grande de compostos químicos, aqueles poucos, chamados “hits”, que exibiriam, em culturas de células de Schwann modificadas, as propriedades desejadas para uma possível droga para a

CMT, ou seja, a regulação negativa da proteína PMP22.

Baseados nas recomendações dos especialistas da STAR e com o financiamento do capital de risco, centenas de milhares de compostos estão sendo testados no Centro de Genética do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos. Dentre eles, foram testados até o momento 10 a 12 compostos promissores, que agora estão sendo passando por verificações adicionais e otimizações químicas antes que possam se transformar em candidatos para testes clínicos com pacientes.

**John Porter**, o terceiro apresentador da primeira sessão da conferência, disse que tanto a STAR quanto o TACT mostram claramente como as barreiras às pesquisas podem ser eliminadas para acelerar a translação de uma ciência bem-sucedida “do laboratório para a clínica médica”, para benefício dos pacientes e suas famílias. Essa abordagem também precisa ser aplicada em outras doenças. Hoje, a Myozyme, droga que combate a doença de Pompe, é o único medicamento existente no mercado para uma doença neuromuscular. Mas só em 2008, 239 milhões de dólares foram doados pelo NIH para pesquisas em doenças neuromusculares.

John Porter concluiu sua palestra com as palavras: “**É hora de aprender uns com os outros; se não nos ajudarmos, ninguém chegará ao medicamento**”.

## Objetivos e identificação de candidatos

Nesta sessão sobre métodos para encontrar possíveis substâncias químicas que poderiam ser usadas em terapias para doenças neuromusculares, **John Babiak**, (PTC Therapeutics, South Plainfield NJ, USA) falou sobre “**Primeiros passos na busca por tratamentos críticos**” (First step in the search for critical therapeutics).

A sigla PTC significa “**Controle Pós-Transcrição**”, porque a especialidade desta empresa é desenvolver drogas que reparariam a mensagem genética danificada de um gene causador de uma doença hereditária, após a transcrição (ou cópia) do DNA para o mRNA, no núcleo de uma célula.

O primeiro passo para encontrar um composto químico que poderia ser usado para reparar o erro no gene, sua mutação, é o uso da técnica de laboratório chamada triagem em alta velocidade.

Muitos milhares de diferentes produtos químicos, formados por pequenas moléculas, e que podem ser adquiridos em empresas especializadas, são analisados em equipamentos de laboratório altamente automatizados, para determinar se teriam algum efeito positivo no processo de uma doença. Um ensaio válido precisa estar disponível para gerar um sinal mensurável em um sistema de testes, que seria diferente para diferentes doenças. Para encontrar uma droga para a distrofia muscular de Duchenne, por exemplo, tal ensaio deve indicar o surgimento de distrofina em precursores de células musculares, como os miotubos, que podem ser mensurados em um sistema de testes utilizando a luciferase, uma enzima emissora de luz obtida de vaga-lumes.

Mas não é preciso que se conheça o exato mecanismo molecular - a farmacocinética - de como os sintomas estão sendo causados pela mutação de um gene, ou algum outro processo. A triagem é fenotípica, independente do objetivo.

Aqueles compostos que geram resultados positivos no processo de triagem são chamados “acertos” ou “hits”. Em um longo processo envolvendo muitas substâncias, e demorando muitos anos, os acertos mais promissores são otimizados até que poucos deles possam se transformar em candidatos a drogas, que exibem o comportamento desejado in vitro, em culturas de células, e in vivo, em animais vivos, modelos animais válidos das doenças humanas sob investigação. As drogas candidatas devem ser não tóxicas, fáceis de administrar, e fáceis de preparar em grandes quantidades.

A PTC tem usado triagem em alta velocidade para identificar e otimizar drogas candidatas para a supressão de mutações do tipo “non sense”, que causam códons de parada prematura (premature stop codons) em cerca de 15% dos pacientes. A PTC124, agora denominada “Ataluren”, já está sendo testada clinicamente contra a distrofia muscular de Duchenne, assim como contra a fibrose cística. Uma série de outras doenças, tais como algumas distrofias de cinturas, a atrofia muscular espinhal, e a hemofilia, são causadas também, até certo ponto, por códons de parada prematura, que podem ser influenciados por drogas como a Ataluren.

A PTC também tem usado triagem em alta velocidade aplicada a outras abordagens farmacológicas, para encontrar terapias para todos os pacientes com Duchenne, independente de suas mutações no gene da distrofina. Aqui, com a tecnologia GEMS - modulação da expressão genética por meio de pequenas moléculas - a produção de proteínas é incrementada ou diminuída, sem precisar conhecer o exato mecanismo.

Dentro do projeto Catalyst, vários acertos (hits) estão sendo otimizados para regular positivamente a expressão da utrofina, integrina alfa 7, mIGF1, SERCA2a, assim como para regular negativamente a miostatina. Todos os cinco procedimentos apresentaram efeitos positivos em animais distróficos de laboratório, e os testes clínicos com pacientes estão sendo preparados.

Na segunda apresentação da sessão, **Jenny Morgan** (University College, Londres, Reino Unido) tratou sobre os **“Obstáculos e possíveis soluções para o uso de mioblastos na triagem de oligonucleotídeos “anti sense” que resultem em saltos de exon na distrofina”**.

Mioblastos são células musculares precursoras, cujo desenvolvimento está um passo adiante quando comparados às células-satélite, as jovens células-tronco adultas dos músculos esqueléticos. Ao se diferenciarem em miotubos, e por fim em fibras musculares funcionais, eles contribuem para regenerar e reparar o tecido muscular lesionado.

Pelo fato de ser possível desenvolver mioblastos em culturas de células, eles podem ser utilizados para testar terapias musculares in vitro, e também em animais vivos. Por exemplo, o salto de certo exon com um oligonucleotídeo antisense, OA, para uma terapia contra a distrofia muscular de Duchenne, pode ser confirmado em experimentos pré-clínicos, para cada paciente, utilizando-se culturas de células obtidas de seus próprios mioblastos, antes que sejam tratados com suas drogas candidatas para salto de exon.

Mas é preciso obter, por biópsia, uma amostra do tecido muscular do paciente, para isolar os mioblastos que tenham sua mutação no genes da distrofina. Isolar mioblastos com Duchenne não é fácil, porque durante a purificação seguinte, baseada em proteínas marcadoras específicas existentes na superfície celular, eles podem, em culturas celulares, alterar suas propriedades e não mais se diferenciar em miotubos. Eles também se multiplicam mais lentamente do que mioblastos normais, e frequentemente param de se dividir cedo demais.

Devido às dificuldades em manter uma cultura de mioblastos com propriedades constantes durante certo tempo, um segundo experimento com salto de exon - para confirmar os resultados do primeiro - pode ser necessário. Por essa razão, fibroblastos obtidos de biópsias de pele também têm sido utilizados para estes estudos pré-clínicos. Eles são fáceis de isolar, mas o gene para a proteína marcadora MyoD precisa ser transferido para eles por meio de um vetor AAV (adenovirus) – eles precisam ser “MyoD transfectados” - antes que possam ser usados para experiências de salto de exon – nas quais a sequência do mRNA saltado (RNA mensageiro) pode ser determinada, mas a estrutura da distrofina não bem o suficiente.

Uma outra alternativa é a imortalização de mioblastos pela transfecção, com as enzimas telomerase e quinase 4 dependente de ciclina. Essas culturas de células de longa vida permitem a repetição de experimentos no laboratório, e em animais vivos, mas sua preparação é muito trabalhosa e os mioblastos de músculos com Duchenne são muitas vezes não miogênicos o suficiente, isto é, eles não se transformam facilmente em miotubos e em fibras musculares.

A Dra. Morgan encerrou sua apresentação sugerindo que mioblastos Duchenne imortalizados, e fibroblastos MyoD transfectados com as mutações definidas de seus genes da distrofina, devem estar disponíveis em biobancos, antes dos testes clínicos, para servir de controle para testes de salto de exon.

**Rebecca Pruss** (Trophos SA, Marselha, França), em sua apresentação intitulada “**Onde está o alvo? Descoberta de drogas e identificação de alvos aplicados às doenças do neurônio motor**”, explicou que sua empresa está usando triagem em alta velocidade para descobrir drogas para doenças do neurônio motor: esclerose lateral amiotrófica (ELA) e atrofia muscular espinhal (AME).

Uma possível causa para essas doenças é a perda de contato na junção neuromuscular, entre o neurônio motor e a célula muscular, que corta o suprimento de fatores de crescimento supridos pelos músculos ao neurônio motor. Isso eventualmente leva à morte do neurônio motor, mas o mecanismo exato do processo da doença, ou qual alvo molecular utilizar para um ensaio de triagem de drogas, não é conhecido e não precisa ser conhecido. Por essa razão, os cientistas da Trophos estão utilizando neurônios motores vivos para o ensaio de triagem. Cada recipiente onde ocorrerá a reação de teste contém de 100 a 400 células vivas. Todos os processos posteriores à preparação das células são automatizados, e os dados são coletados por meio de um instrumento para análises, recentemente desenvolvido, chamado **Plate Runner HD**, que determina o número de células vivas 2 a 6 dias após a adição dos compostos que sofrerão triagem, pela medição de luz fluorescente em três diferentes comprimentos de ondas.

Dentre os 40.000 compostos testados, incluindo algumas drogas aprovadas para outras doenças e fatores, conhecidos por influenciarem positivamente células nervosas, seis acertos (hits) foram encontrados. Eles eram esteroides e compostos semelhantes a esteróides.

Para otimizar os acertos, 300 compostos similares foram adquiridos ou prontamente sintetizados. Um deles, o TRO19622, também chamado de olesoxime, apresentava as melhores propriedades como droga candidata para doenças do neurônio motor. Ela é uma substância lipofílica, com estrutura semelhante ao colesterol, e pode ser formulada em cápsulas. É transportada para o interior das células e penetra nas mitocôndrias, as organelas celulares produtoras de energia, onde parecem reduzir as consequências do stress oxidativo que ocorre ali. Quimicamente, pode ser facilmente sintetizada em grau clínico e em lotes de 100 quilogramas.

A olesoxime está sendo testada em pacientes com ELA (esclerose lateral amiotrófica) em um teste clínico fase-III, completou um teste clínico fase Ib em pacientes com AME (atrofia muscular espinhal), e um teste clínico fase-III será iniciado em 2010. Ela também é uma droga candidata para tratar a neuropatia periférica induzida pela quimioterapia, NPIQ, um efeito colateral dos tratamentos para câncer, ainda sem solução. Outra droga candidata é a TRO40303, para tratar a lesão cardíaca de isquemia/reperfusão, LIR. A Trophos tem também outros programas em andamento para encontrar drogas para a esclerose múltipla, doença de Parkinson e outras patologias neurológicas.

**Gideon Dreyfuss** (Instituto Médico Howard Hughes, Universidade da Pensilvânia, Filadélfia, EUA), em sua apresentação intitulada “**Função da SMN e triagem em alta velocidade para AME**” (SMN function and high throughput screening for SMA), falou a respeito de um trabalho para definir a função molecular e encontrar compostos que regulariam positivamente a quantidade - ou atividade - da **proteína sobrevivência neurônio motor**, SMN, em pacientes com atrofia muscular espinhal, AME, uma grave e ainda incurável doença hereditária autossômica.

O gene para a proteína SMN, localizado no cromossomo 5, existe em duas cópias - a SMN1 e a SMN2 – ambas codificando a mesma proteína. Todavia, o mecanismo de splicing (remoção de íntrons e união dos exons) do RNA mensageiro (mRNA), do gene SMN2, é ineficiente na produção de mRNAs de SMN com comprimento total, devido a uma mutação de ponto que causa o salto do exon 7. Uma proteína SMN com comprimento total é funcional, mas aquelas que não possuem a sequência codificada pelo exon 7 são degradadas rapidamente. Isso não traz consequências maiores quando o gene SMN1 está intacto, mas deleções do gene SMN1, que ocorrem na maioria dos pacientes com SMA, deixam a cópia SMN2 como a única fonte de SMN, causando então uma deficiência de SMN com comprimento total.

Apenas 20% da quantidade total de mRNA derivado do gene em SMN2 tem comprimento total, isto é, é funcional, e isso é insuficiente para manter as unidades motoras, especialmente nos neurônios motores com axônios muito longos e suas placas motoras, que os conectam às células musculares. A consequência é a AME, que apresenta diversos níveis de gravidade, dependendo da quantidade restante de proteínas SMN normais, que tem correlação com o número de cópias do gene SMN2.

O Dr. Dreyfuss descreveu estudos que revelaram uma função crítica da proteína SMN na biogênese da maquinaria do mecanismo de splicing (remoção de íntrons e união dos exons) em todas as células. Estudos recentes detalharam as vias bioquímicas através das quais a SMN, em conjunto com suas proteínas associadas (as gemins), constrói as subunidades que as células utilizam para efetuar o splice do pré-mRNA (RNA precursor) para produzir os RNA mensageiros. O entendimento alcançado a partir dessa pesquisa básica, e as ferramentas geradas no curso do trabalho, sugerem novas abordagens para incrementar a produção da proteína SMN, ou a compensação da perda de sua atividade nas células de pacientes com AME.

Um caminho para uma possível terapia para a AME poderia ser a regulação positiva da quantidade de SMN produzida pelo gene localizado em SMN2. O Dr. Dreyfuss descreveu o gene SMN2 como “uma oportunidade terapêutica”, e esboçou diversas abordagens que ele e seus colegas desenvolveram rumo à descoberta de uma terapia. De forma notável, e utilizando tecnologias para procurar por compostos que incrementem a quantidade de proteínas SMN nas células dos pacientes com AME – por meio de qualquer mecanismo –, a empresa farmacêutica Merck & Co testou cerca de 1,2 milhão de compostos em um programa de triagem de alta velocidade, executado em um projeto conjunto entre a indústria e o mundo acadêmico para ajudar o Dr. Dreyfuss e sua equipe no desenvolvimento de uma terapia para a AME. Para essa triagem foi desenvolvido um imunoenensaio baseado em células, para detectar a proteína SMN diretamente em células de fibroblastos obtidas de uma biópsia de pele de uma criança com AME. Foram selecionados, então, acertos (hits) a partir da primeira triagem, por uma matriz de triagens e ensaios adicionais. Exemplos de vários acertos selecionados ilustraram o potencial oferecido por esse esforço, e sinalizaram para a imensa quantidade de trabalho já efetuado, e que ainda precisará ser efetuado, para desenvolver essas iniciativas. A colaboração com a Merck & Co continua, e esforços também estão a caminho para procurar por compostos que influenciariam outros processos responsáveis pelos sintomas clínicos dos pacientes com AME.

Como exemplo de outro grande programa de triagem primária em mais de 65.000 compostos, o laboratório do Dr. Dreyfuss identificou compostos que modulam a atividade bioquímica do complexo SMN-Gemin. Até agora os agentes oxidativos identificados atuam como inibidores, capazes de paralisar o complexo SMN. Eles fornecem inestimáveis reagentes de pesquisa para compreender a regulação do complexo SMN, sugerem formas de protegê-lo de danos causados pelo meio ambiente, e podem levar à concepção de reguladores positivos capazes de originar drogas candidatas para testes clínicos com pacientes.

## Avaliação de modelo animal

Um dos desafios mais significativos no desenvolvimento de novas e promissoras terapias para doenças em seres humanos, é a “translação do laboratório para a clínica médica”. O desafio é lançar mão de tratamentos que pareçam efetivos em experimentos pré-clínicos em animais de laboratório, e testar sua eficácia em testes clínicos com humanos. Nesta seção, **Michael Benatar** (Universidade de Emory, em Atlanta, GA, USA), em sua apresentação intitulada “**Perdido na translação: lições sobre ELA, de um camundongo SOD1**” (*Lost in translation: lessons for ALS from the SOD1 mouse*), perguntou, inicialmente, se o animal de laboratório mais comumente utilizado para testar possíveis drogas para tratar pessoas com esclerose lateral, ELA, o camundongo SOD1, é mesmo um bom modelo da doença para prever como os pacientes com ELA reagiriam.

A ELA é a doença do neurônio motor mais frequente, atingindo principalmente pessoas na faixa dos 40 aos

70 anos de idade. Cerca da metade delas morrem por paralisia geral da musculatura, 3 a 5 anos após o diagnóstico. Existem cerca de 75.000 pacientes com ELA na Europa e nos Estados Unidos. Não há uma terapia efetiva, e o único medicamento aprovado, o Riluzole®, prolonga modestamente a vida. A droga foi descoberta antes que o camundongo modelo animal da ELA estivesse disponível, e tem apenas um modesto efeito na sobrevivência dos camundongos SOD1, se muito.

Cerca de 90% dos pacientes têm a forma esporádica da doença, e 10% a forma familiar, dos quais 20% têm uma mutação no gene SOD1 para a enzima superóxido dismutase 1, que destrói o agente tóxico oxidante peróxido de hidrogênio.

O animal de laboratório mais comumente utilizado para modelo animal de ELA baseia-se na introdução, em camundongos, do gene humano mutante SOD1. Embora o camundongo SOD1 apresente vários aspectos da ELA humana, existem muitas diferenças importantes. Por exemplo, esse modelo de camundongo só é relevante geneticamente para 2% de todos os pacientes com ELA, e resulta de uma superexpressão maciça da proteína SOD1, de uma forma não comparável à doença em humanos.

Além da questão da adequação do camundongo SOD1 como modelo para a avaliação pré-clínica de potenciais terapias para a ELA humana, questões sobre a qualidade metodológica de muitos desses estudos pré-clínicos dificultam sobremaneira a interpretação dos resultados. Além disso, não foram publicados muitos desses estudos terapêuticos com camundongos, e nem os estudos com resultados negativos. Logo, é impossível afirmar se os resultados dos experimentos com o camundongo SOD1 podem antecipar o que ocorreria em um estudo pré-clínico com humanos. Portanto, ainda não existe um modelo animal para a ELA que traga previsões confiáveis quanto aos efeitos benéficos em humanos.

## DEBATE:

O modelo animal ideal é aquele que duplica completamente, ou quase, as características da doença humana. O camundongo SOD1 não é um modelo animal ideal para a ELA. O camundongo mdx, que não possui distrofina, mas também não manifesta os graves sintomas dos meninos com Duchenne, é um modelo muito melhor, e consequentemente tem sido extensivamente usado em experimentos pré-clínicos. O camundongo duplo nocaute, que não possui distrofina nem utrofina, e portanto apresenta sintomas semelhantes à Duchenne, é um modelo ainda melhor.

Por causa do seu tamanho, o cão distrófico GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) é muito importante para estudos com distrofia muscular de Duchenne, pois drogas podem ser testadas com dosagens similares às necessárias, mais tarde, para meninos distróficos. Resultados positivos, similares em ambos os animais - o camundongo mdx e o cão GRMD - conferem confiança aos pesquisadores de que a droga trará os mesmos resultados em meninos. Pelas mesmas razões, porcos com AME estão sendo desenvolvidos atualmente.

Testes clínicos com pacientes humanos devem ser iniciados apenas quando experimentos relevantes em animais tenham mostrado uma eficácia significativa, e não apenas resultados marginais. Todos os resultados de estudos pré-clínicos com animais, inclusive aqueles malsucedidos, devem também ser publicados.

O TREAT-NMD está desenvolvendo procedimentos operacionais padronizados, os SOPs, para testes de drogas e tratamentos em animais de laboratório: <http://www.treat-nmd.eu/research/preclinical/SOPs>. A utilização de tais padrões evitaria erros dispendiosos, e permite a fácil comparação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios. Os experimentos deveriam também ser efetuados em acordo com as orientações das GPL - Good Laboratory Practice (Boas Práticas de Laboratório), que descrevem as práticas gerais de laboratório mundialmente aceitas e seguidas.

Os animais de laboratório devem ser tratados com a maior humanidade e cuidado possíveis, e as cirurgias devem ser efetuadas sob anestesia. Os cientistas devem agir de forma pró-ativa, no sentido de explicar ao

público como cuidam de seus animais, como efetuam experimentos com eles, e porque são necessários para que terapias para doenças ainda incuráveis sejam encontradas, com técnicas por vezes inteiramente novas, e quando não há alternativas.

## Conceito terapêutico equivocado e consideração ética

**Simon Woods** (especialista em ética da Universidade de Newcastle e colaborador do TREAT-NMD, Reino Unido), presidiu um debate, e um painel de discussão, no que foi - em minha opinião - a sessão mais importante do encontro.

Ele enfatizou, inicialmente, que a participação de pacientes com doenças raras em testes clínicos é absolutamente necessária, e deve basear-se no **consentimento adequadamente informado e voluntário**. Todavia, há evidências de que pais, que precisam dar tal consentimento em nome de seus filhos, podem confundir pesquisa e tratamento. O chamado equívoco terapêutico pode existir quando participantes de um teste clínico acreditam que o objetivo principal do teste é oferecer um benefício terapêutico.

Mas testes clínicos são só um degrau no progresso científico rumo a uma terapia efetiva. O Dr. Woods define ciência como sendo **“preocupar-se em fazer afirmações cautelosas sobre conhecimentos, baseadas nas melhores evidências possíveis e equilibradas por uma disposição saudável de reavaliar esse conhecimento à luz de novas evidências”**. Portanto, um teste clínico é só um experimento científico que não garante resultados positivos, e apesar de terem sido efetuado cuidadosos experimentos pré-clínicos antes do seu início, ele ainda envolve riscos desconhecidos. Isso é particularmente verdadeiro para os testes iniciais fase-I e fase-II, planejados para verificar se o novo procedimento é seguro. Para não provocar mal algum, qualquer médico que convoque pacientes para participarem de um teste clínico, precisa levar em consideração os requisitos do juramento de Hipócrates. Assim, nesse estágio inicial, um benefício terapêutico não pode ser esperado, e às vezes é até impossível, quando, por exemplo, apenas um músculo está sendo tratado.

Os médicos e cientistas que efetuam o teste clínico devem fazer o máximo para informar os pais de uma criança com distrofia muscular sobre todos os detalhes do teste. Todavia, se após as explicações os pais ainda não conseguirem distinguir entre pesquisa e tratamento, e disserem que concordam com o teste baseados em esperanças irrealistas de obter benefícios terapêuticos, então esse equívoco pode solapar a capacidade de consentir voluntariamente e esclarecidamente. Esse problema foi exposto para a audiência como um ponto de partida para debates e discussões. A seguinte moção foi proposta:

*Os pais que expressam esperança na possibilidade de obter benefícios terapêuticos pela participação em testes clínicos, não deveriam poder autorizar que seus filhos participem dos testes.*

*Estou relatando, aqui, uma narração abreviada dos próximos 70 minutos de discussões, por vezes complexas e emotivas, entre a audiência e os membros do painel de especialistas convidados. O debate foi muito abrangente, e com três exceções ao final, não pude identificar, pelas vozes nas gravações, aqueles que fizeram as declarações.*

*Foram levantadas importantes questões quanto às responsabilidades dos pesquisadores. Os cientistas que estão efetuando um teste clínico, devem explicar os detalhes do estudo em uma conversa relaxada, em linguagem leiga e sem pressa, “como que conversando enquanto se toma um café”. Eles devem falar sem pressa, frase por frase, utilizando termos comuns, sem expressões médicas ou científicas. Deve-se pedir aos pais que resumam como eles compreenderam o que foi dito, e isso ofereceria uma oportunidade de corrigir mal-entendidos.*

*O risco de que algo sério e inesperado possa ocorrer deve ser discutido abertamente. Por exemplo, estudos em animais têm algumas limitações com relação à escolha do momento adequado de passar aos estudos com humanos. Além do mais, os camundongos mdx são todos relacionados, pertencem à mesma família, e portanto os resultados dos experimentos efetuados com eles podem variar menos do que aqueles obtidos nos*

testes clínicos com humanos, que diferem muito entre si. Os resultados de testes clínicos com humanos não são 100% previsíveis. Um menino não é um camundongo grande, muito menos é um cão.

Não é incomum que se desenvolva uma relação especial, pessoal, entre as famílias e seus médicos especialistas. Por vezes esse profissional também pertence à equipe que efetua o teste clínico. As famílias, então, confiarão em seus “cuidadores”, sabendo que eles agirão sempre no melhor interesse do paciente. Sob essas circunstâncias, as famílias frequentemente aceitarão o médico, e assinam o formulário de consentimento, confiantes, sem longas explicações, mas sob risco de não compreenderem completamente o estudo e seus riscos. Famílias e médicos deveriam, então, ter cautela, para assegurarem que os detalhes do estudo sejam examinados minuciosamente.

Famílias com crianças doentes e com mais idade, que têm experiência com testes clínicos, podem ajudar outras famílias, cujas crianças foram recentemente diagnosticadas, a entenderem o assunto. Associações de pais também podem ajudar muito, mas devem ter cautela e não encorajar a participação em pesquisas, somente, mas permitir que pais recebam informações precisas e detalhadas, de forma que possam formar suas próprias convicções.

Além disso, um formulário de consentimento padrão, ou um modelo com bons exemplos em linguagem clara, seriam de muita ajuda. Muitos pesquisadores também apreciariam exemplos de textos que procurem explicar a pais e pacientes, em linguagem amigável, os importantes aspectos dos testes clínicos.

Um aspecto muito importante da discussão abordou a visão de que “esperança” é uma condição natural do espírito humano, e que ela não incapacita alguém de pensar racionalmente. Os pacientes não podem esperar por anos, e muito sentem que seu tempo está se esgotando, levando-os a considerar a participação em testes clínicos como uma última esperança. Também foi observado que mesmo aqueles que reconhecem haver poucas chances de benefício pessoal – como considerou um jovem de 20 anos com Duchenne – podem ainda participar de pesquisas, caso queiram, para ajudar aqueles que vêm “atrás deles”, com sua participação em um teste clínico. O desejo altruísta de ajudar outros pacientes, ou a comunidade de doenças neuromusculares em geral, pode também desempenhar um papel. Ninguém pode ser julgado por seus motivos em querer participar.

Escrevendo este relatório, ocorreu-me que existe ainda outra razão para ter esperança: se ao término do teste clínico, os resultados preliminares forem considerados positivos, ocorre, às vezes, a abertura de um período de extensão, durante o qual todos os participantes, inclusive aqueles que receberam placebo, podem receber a droga testada antes de sua aprovação oficial. Penso que isso pode ser uma forte razão para ter esperanças em um benefício terapêutico.

**Nick Catlin**, presidente do ActionDuchenne e pai de um menino de 9 anos com Duchenne, disse:

“Sofremos pela doença, e por isso somos mais vulneráveis que pais com crianças saudáveis. Mas não significa que somos mentalmente instáveis. Ainda podemos tomar decisões claras e racionais sobre nossos filhos. Desde o dia em que ouvimos o terrível diagnóstico, lutamos contra a sentença de morte de uma criança que ainda corre por aí, como uma criança normal. Temos bons e maus momentos. Em certos dias conseguimos lidar com a situação, mas em outros tudo o que queremos é chorar. Mas não perdemos nossa capacidade de pensar. Conhecemos a diferença entre risco e benefício. Mas nem sempre recebemos as informações por inteiro, e muitas vezes não somos levados a sério. John Porter estava certo quando disse que na nova era da medicina personalizada, deve haver uma parceria entre nós e vocês, cientistas e médicos, onde nós somos a parte central disso tudo. Se vocês não nos incluírem, fracassarão. Mas não queremos perder a chance de participar desse esforço rumo a uma terapia”.

A presidente do American Parent Project Muscular **Dystrophy**, PPMD, **Patricia Furlong**, disse-nos que seus dois filhos, Christopher e Patrick, morreram de **Duchenne** em 1995 e 1996, e continuou:

“Poucos anos antes, eles participaram de um teste clínico malsucedido da técnica da transferência de mioblastos. Foi uma experiência assustadora, e perguntei a mim mesma: qual é a dose terapêutica de

*esperança que nos permitiriam receber? Desde o dia em que nasceram, desejamos o melhor para nossas crianças, e a distrofia de Duchenne não muda isso. Queremos ser seus parceiros, cientistas e médicos, e precisamos ser informados sobre todos os detalhes de um teste, em um diálogo ativo, com palavras que possamos compreender. Precisamos de diálogo para expressar nossas preocupações, e para ouvir suas respostas. Falaremos a vocês sobre os nossos fardos, porque vocês não vivem em nossas casas 24 horas por dia. É muito diferente do que vocês imaginam! Temos esperanças, mas sei vocês também as têm, caso contrário não haveria pesquisas e testes clínicos. Para nossas crianças, precisamos de luz no final de um túnel muito longo”.*

**Dr. Karl Bettelheim**, diretor do ActionDuchenne e avô de Frederick, um menino de 7 anos com Duchenne, usou palavras drásticas para manifestar claramente sua oposição à moção:

*“Essa proposta é, em minha opinião, um insulto triplo. Em primeiro lugar, aos cientistas que efetuam o teste clínico, porque insinua que não o farão suficientemente bem. Segundo, aos pais, pois insinua que tentariam falsificar os resultados dos testes, por submeter seus filhos a alguma pressão indevida. E finalmente, um insulto às crianças, porque implicaria que elas só participariam dos testes porque esperam um possível benefício deles.*

*Alguém precisa olhar para as conclusões lógicas desta proposta: só pais que não expressam esperanças na possibilidade de obter benefícios terapêuticos pela participação nos testes clínicos, deveriam poder dar autorização para que seus filhos participem dos testes. Mas acredito que seria muito difícil encontrar pais que não expressem esperança. Assim, compus uma declaração sobre o que seria o correto em termos de ensaios clínicos:*

***Esta é uma doutrina adotada por eticistas delirantes, que pregam ser perfeitamente possível fazer com que pareçam os únicos juízes da moral e da ética, sem levar em conta se pais, que desejam o melhor para seus filhos, são moralmente e eticamente prejudicados.***

*Para deixar claro o que quero dizer, deixem-me descrever uma cena de um filme da BBC, ambientado em 1941, para o qual fui conselheiro científico:*

*Em um hospital em Oxford, Johnny Cox, um garoto de quatro anos e meio de idade encontra-se em estado de coma. De um lado de sua cama está sentado o Sr. Cox, seu pai, e do outro lado está sentado o cientista clínico, que diz ao Sr. Cox: Não há garantias Sr. Cox, os últimos pacientes com os quais testamos essa droga não sobreviveram. O Sr. Cox responde então: Eu sei que o senhor não está oferecendo um milagre, eu compreendo. No dia seguinte houve uma significativa melhora. O cientista clínico disse: Nos lhe daremos as quatro semanas inteiras de tratamento, e mesmo que ele pareça plenamente recuperado, não pararemos.*

*Três dias depois, apesar de parecer bem, a criança teve convulsões, e em dez minutos faleceu. Uma autópsia revelou que o menino não morreu da infecção bacteriana que tinha, mas pela ruptura da artéria carótida, causada pela infecção. A droga que lhe deram era a penicilina, e este foi o primeiro teste clínico com antibióticos.*

*Eu diria que qualquer um nesta sala, que foi beneficiado com um tratamento com penicilina ou com qualquer antibiótico descoberto posteriormente como resultado da grande descoberta da penicilina, tem a obrigação moral de votar contra esta abominável moção.”*

*E assim foi feito. Pediram-nos para levantar os cartões azuis caso apoiássemos a moção, e os cartões amarelos se fôssemos contra. Alguns momentos depois o resultado foi claro: cerca de 98% de todos os presentes levantaram seus cartões amarelos. Não foi preciso solicitar aos que apoiavam a moção, que levantassem seus cartões azuis.*

*O Dr. Woods acrescentou ao meu resumo a seguinte conclusão:*

*“O debate foi complexo, detalhado, e por vezes emocional. Entretanto, foram elaboradas diversas*

conclusões. Foi reconhecido que pesquisadores precisam trabalhar em íntima parceria com pais e pacientes. Observou-se que a esperança é parte importante e necessária para lidar com essas doenças, mas ela não deve cegar pais e pacientes quanto aos riscos reais de participar em pesquisas. Mais trabalho é necessário para permitir a colaboração e o trabalho conjunto com elevados padrões de conduta nas pesquisas, para desenvolver a informação de boa qualidade, e para garantir que os melhores métodos sejam utilizados em todo o mundo para permitir participação segura e ética em pesquisa."

## A administração sistêmica, e desenvolvimento de terapias inovadoras direcionadas a doenças

*Palestra de abertura:*

A palestra "**Novos tratamentos para doenças hereditárias**" foi proferida por **Kenneth Fischbeck** (Instituto Nacional de Doenças Neurológicas e Acidentes Vasculares Cerebrais, Bethesda, perto de Washington DC, USA), que tratou sobre os desafios terapêuticos da distrofia muscular e as oportunidades para a intervenção terapêutica.

As abordagens farmacológicas incluem agentes como o Ataluren®, da PTC Therapeutics, que corrige a tradução do mRNA mutante, e agentes como os inibidores de miostatina, que aumentam a regeneração muscular. A terapia de substituição de genes para distrofia muscular de Duchenne tem sido almejada, com algum benefício, por meio da utilização dos adenovírus, adenovírus associados (AAV), e da injeção direta de plasmídeos em modelos animais, embora uma distinta resposta inflamatória tenha ocorrido em cães ministrados com AAV. Um teste clínico em humanos, utilizando AAVs como transporte para uma distrofina truncada está sendo efetuado pelo Dr. Jerry Mendell e equipe, no Hospital Nacional Infantil em Columbus, Ohio, USA.

O mesmo grupo reportou recentemente o primeiro teste clínico bem-sucedido da transferência de genes em distrofia muscular de cinturas tipo 2D, que é causada pela falta da alphasarcoglycan, SGCA, uma das proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas, que ancora uma das pontas da distrofina à membrana da celular muscular. O curto gene da SGCA – somente 9.927 pares de bases – foi transferido pela equipe do Dr. Mendell, por meio de um adenovírus associado (AAV1) injetado localmente no pequeno músculo extensor digitorum brevis (EDB) localizado nos pés de três pacientes. Após seis semanas, o nível de proteínas aumentou de 4 a 5 vezes em comparação ao nível de controle, e o complexo distrofina-glicoproteínas foi restaurado. Alguma resposta imunológica contra o vírus foi detectada, significando que nos futuros testes clínicos as reações imunológicas devem ser consideradas. Os detalhes do teste foram publicados em setembro de 2009, no jornal *Annals of Neurology*, volume 66, páginas 267-270. As apresentações sobre a técnica de transferência de genes em distrofia muscular, feitas nessa sessão, foram efetuadas pelos Drs. Jon Wolff e Luis Garcia, e estão resumidas abaixo.

O Dr. Fischbeck falou também sobre o desenvolvimento da terapia com salto de exon por meio de oligonucleotídeos para a distrofia muscular de Duchenne. Estudos pré-clínicos em camundongos mdx foram encorajadores, e testes clínicos com injeções locais foram publicados em 2007 e 2009, por grupos na Holanda (trabalhando com a Prosensa) e no Reino Unido (trabalhando com a AVI BioPharma). Estudos subsequentes de ambos os grupos foram apresentados nessa sessão, pelos Drs. Judith van Deutekom e Francesco Muntoni.

O Dr. Fischbeck também abordou as pesquisas para o desenvolvimento de uma terapia contra a atrofia muscular espinhal, AME. Com os inibidores da deacetilase de histona, HDAC, a quantidade da proteína SMN, e o tempo de vida dos camundongos SMA, foram significativamente aumentados. A triagem em alta velocidade identificou compostos ativos que promovem a retenção do exon 7 no mRNA, produzido pelo gene SMN2, e oligonucleotídeos desenvolvidos pelo Dr. Adrian Krainer são ainda mais efetivos. Descobriu-se que esses compostos elevam os níveis da proteína SMN, melhorando os sintomas clínicos do camundongo modelo da AME. Resultados de recentes estudos pré-clínicos com a transferência do gene da SMN, mediada por

AAVs (vírus adeno-associados), e efetuada pelo Dr. Brian Kaspar e colegas, foram também muito encorajadores e foram relatados ao final da sessão.

Conforme explicado em outras apresentações, a proteína SMN tem um importante papel nos spliceosomas de todas as células. Mas provavelmente ela também é necessária no transporte de mRNAs pelos longos axônios dos neurônios motores, para o crescimento de cones e junções neuromusculares nas conexões com as fibras musculares, onde são necessárias para a síntese de proteínas. Assim, uma quantidade insuficiente de proteínas SMN interfere na transferência dos sinais nervosos aos músculos, causando fraqueza muscular e a atrofia da AME.

Ao final de sua palestra, Dr. Fischbeck disse que descobrir terapias para doenças neuromusculares mostrou-se mais difícil do que se pensava há vinte anos, quando o gene da distrofina foi encontrado. Mas com as novas ferramentas de pesquisa e o crescente envolvimento das empresas farmacêuticas e de biotecnologia, as barreiras para um tratamento seguro e efetivo serão superadas.

Em seguida a esta palestra introdutória, foram discutidos os quatro testes clínicos com a técnica do salto de exon (exon-skipping): dois locais, cujos resultados já foram publicados, e dois sistêmicos, que foram finalizados, ou estão quase no fim, mas cujos resultados ainda não são conhecidos publicamente.

O salto do exon 51 foi escolhido para os dois primeiros testes, porque 13% de todos os pacientes com Duchenne – o maior grupo necessitado do salto de um único exon – seriam beneficiados com o salto desse exon em particular. Estou resumindo, aqui, as curtas apresentações dos Drs. Judith van Deutekom e Francesco Muntoni. Mais detalhes com relação os quatro testes, estão descritos no meu relatório mais recente sobre salto de exon, atualizado em outubro de 2009, que pode ser visto em: <http://www.duchenne-information.eu/Exon-Skipping-Report-English-firstupdate-October-2009.pdf>.

Em sua apresentação intitulada “**Novos resultados do teste clínico com salto de exon, da Prosensa**”, **Judith van Deutekom** (Prosensa Therapeutics, Leiden, Países Baixos) disse que é realmente incrível que em comparação a um típico programa de desenvolvimento de drogas, que dura pelo menos dez anos, os cientistas da Prosensa e da AVI demoraram apenas oito anos: da primeira prova bem-sucedida, em 1998, com o salto de um exon em cultura de células musculares de um paciente com Duchenne e em um camundongo mdx, modelo animal da distrofia de Duchenne, até o início dos ensaios clínicos em homens, e prova de princípio desta nova técnica genética com meninos distróficos, em 2006.

O primeiro teste clínico da Prosensa foi um estudo local efetuado entre janeiro de 2006 e março de 2007. O oligonucleotídeo antisense modificado **2’O-methyl-phosphorothioate** (PRO051), que atua contra o exon 51 do gene humano da distrofina, foi injetado em um músculo da tíbia de quatro meninos com Duchenne. Após quatro semanas, até 95% das fibras musculares apresentam distrofina. O tratamento foi seguro e sem efeitos colaterais, mas nenhum benefício terapêutico poderia ser esperado para as crianças. Os resultados foram publicados, na íntegra, em dezembro de 2007, no *New England Journal of Medicine*, páginas 2677-86 do volume 357.

O primeiro teste clínico sistêmico da Prosensa foi efetuado em Leuven e em Gothenburg, entre abril de 2008 e maio de 2009. Doze pacientes receberam a PRO051 em 5 injeções subcutâneas semanais, em um estudo com doses crescentes variando entre 0,5 e 6 mg/kg. A nova distrofina, sem o aminoácido codificado para o exon 51, foi detectada em quantidade proporcional à dose e sem efeitos colaterais. O objetivo principal do teste foi determinar se esse primeiro tratamento, abrangendo todo o corpo, seria seguro, mas também foram efetuados testes de função muscular, porque havia chances de que os meninos também obtivessem um benefício terapêutico. A Dra. van Deutekom não pôde comentar sobre a íntegra dos resultados do estudo. Eles serão conhecidos após sua publicação dentro dos próximos meses. Todos os doze pacientes participaram de uma extensão do estudo, na qual receberam injeções semanais da maior dose durante pelo menos seis meses.

Em sua apresentação intitulada “**Novos resultados do teste clínico da AVI Biopharma com salto de exon**”, **Francesco Muntoni** (University College, Londres, Reino Unido) tratou sobre dois testes com outro tipo de oligonucleotídeo, o morpholino, contra o exon 51.

No estudo local efetuado pela empresa entre o outono de 2007 e final de 2008, os cientistas britânicos trataram o pequeno músculo extensor digitorum brevis (EDB), localizado nos pés de sete meninos com Duchenne, com o seu OA morpholino AVI-4658, que age contra o exon 51. Ele foi desenvolvido pelo consórcio MDEX em colaboração com a AVI Biopharma em Bothell, perto de Seattle, Washington, USA. Quatro semanas depois da injeção de 0,09 ou 0,9 mg da droga, até 42% das fibras musculares ao redor do local da injeção, nas cinco crianças que receberam a dose mais elevada, continham a nova distrofina mais curta. Não houve produção significativa de proteínas nos dois meninos que só receberam as doses mais baixas, resultado que já era esperado. Como ocorreu no estudo Holandês, não poderiam ser esperados benefícios terapêuticos e não surgiram efeitos colaterais. Todos os detalhes do estudo foram publicados online, em agosto de 2009, pelo jornal "The Lancet Neurology", volume 8, páginas 918-928.

O teste sistêmico britânico iniciou em fevereiro de 2009, em Londres e Newcastle, e terminará em março de 2010. Dezoito meninos devem receber, por via intravenosa, doses crescentes da droga variando entre 0,5 e 20mg/kg/semana, durante 12 semanas. Duas semanas antes das injeções, e duas depois, foram efetuadas biópsias musculares para a análise das proteínas e do mRNA da distrofina. Mais uma vez, como no teste sistêmico holandês, a segurança do procedimento foi o principal resultado medido, mas a função muscular também foi monitorada porque os pacientes poderiam obter benefícios terapêuticos. Não foram detectados efeitos adversos relacionados à droga. A íntegra dos resultados será conhecida após sua publicação, na segunda metade de 2010. Todavia, a análise das primeiras 12 crianças tratadas identificou a presença de salto de exon e produção de distrofina em ao menos alguns pacientes tratados.

## **DISCUSSÃO:**

*Günter Scheuerbrandt: Não consegui identificar, pelas vozes, todos os membros do painel que responderam. A técnica do salto de exon é a abordagem de pesquisa mais avançada rumo a uma terapia para a distrofia muscular de Duchenne.*

*Judith van Deutekom: a Prosensa experimentou os métodos de administração subcutânea e intravenosa em camundongos e macacos. Elas são similarmente efetivas, mas a subcutânea minimiza riscos potenciais de toxicidade, e seria mais prática, porque mais tarde poderia ser aplicada em casa, sem a necessidade de visitas a um consultório médico ou hospital.*

*Annemieke Aartsma-Rus: O salto de exon não conseguirá substituir fibras musculares perdidas, mas só manter e estabilizar aquelas ainda presentes. Assim, pacientes já em cadeiras de rodas não voltarão a caminhar, mas provavelmente poderão continuar usando suas mãos e braços por mais tempo.*

*Judith van Deutekom: O salto de exon efetuado com os dois tipos de oligonucleotídeos antisense não provocaram efeitos colaterais sérios, mas só o tempo mostrará se haverá riscos a longo prazo. A Prosensa sempre verifica as sequências do OA utilizado, para identificar efeitos "fora do alvo" e evitar que se liguem em outro ponto qualquer do genoma, fora do gene da distrofina.*

*Tipicamente, ambos os tipos de OAs não atravessam a barreira sangue-cérebro. Assim, o salto de exon não afeta a distrofina existente no cérebro, que é mais curta do que a normal e pode ser a causa de problemas mentais em alguns pacientes.*

*O salto na exon da musculatura cardíaca ainda não é suficientemente eficiente, e poderemos criar pacientes tipo Becker com graves problemas cardíacos.*

*Judith van Deutekom: Os oligonucleotídeos antisense tipo 2OMePS são absorvidos pelo coração em níveis menores, mas com vida-média mais longa!!*

*Judith van Deutekom: Uma droga AO para saltar o exon 51 será a primeira a ser aprovada pela FDA e*

EMEA, e isso demorará mais alguns anos. As próximas drogas virão logo em seguida.

*Francesco Muntoni: Estamos mais próximos do que nunca das drogas aprovadas para salto de exon. Sempre estive errado quando dava minha estimativa de tempo.*

*Günter Scheuerbrandt (acréscimo pessoal a este debate): Na minha entrevista com Gertjan van Ommen, em 2004, em Mônaco, ele disse que demoraria cerca de 10 anos para que o salto de exon estivesse pronto para nossos meninos.*

**Jon Wolff** (Universidade de Wisconsin e Roche Madison Inc., Madison WI, USA), em sua palestra "**Transferência de genes por perfusão**", tratou sobre seus experimentos com "DNA nú".

Plasmídeos são pequenas estruturas circulares de DNA, sem proteína, dentro de bactérias, que oferecem principalmente resistência contra antibióticos. Para verificar se essas estruturas nuas de DNA poderiam ser utilizadas como vetores para transferência genética em músculos, cientistas introduziram, em plasmídeos, 79 exons de DNA - o cDNA completo do gene da distrofina - junto com sequências de controle, e os injetaram sob pressão dentro da corrente sanguínea das patas traseiras de camundongos mdx. A pressão foi produzida bloqueando-se temporariamente a circulação sanguínea com um torniquete, feito com a braçadeira de aparelho para medir pressão hemodinâmica. Tratamentos repetidos levaram à produção estável de até 20% do nível de distrofina de um camundongo normal em cerca de 15% de todas as fibras musculares do membro tratado, e perdurou pelo tempo de vida restante animal. A pressão hidrodinâmica foi bem tolerada pelo animal, cuja função muscular do membro tratado apresentou melhora significativa.

Como preparação para uma possível aplicação em seres humanos, o Dr. Wolff e seus colegas testaram essa terapia genética regional em macacos saudáveis. Após uma única injeção de plasmídeos transportando o gene da enzima beta-galactosidase, de 30 a 40% das fibras musculares dos membros tratados continham essa proteína marcadora. O tratamento sob pressão provocou inchaço dos músculos, que desapareceu após 24 horas. Mais de 100 macacos foram tratados dessa mesma forma sem apresentar efeitos colaterais prejudiciais.

Os primeiros experimentos em humanos já foram iniciados, e três adultos saudáveis estão recebendo injeções salinas para verificar se o método poderia tornar-se rotineiro para tratar crianças com Duchenne.

A próxima geração da técnica do salto de exon exigiria uma única injeção de uma droga, sem tratamentos subsequentes e repetidos por toda a vida do paciente. Tal tratamento foi desenvolvido pelo Dr. Luis García, do Instituto de Miologia da Universidade Pierre e Marie Curie, em Paris, e pelo Dr. Aurélie Goyenvalle, e seus colegas, agora na Universidade de Oxford. Com essa técnica, os genes de um "fator de splicing" modificado, U7, contendo sequências antisense contra o exon alvo, são transferidos para as células musculares por meio de um vetor, um vírus adeno-associado, AAV, de forma que as próprias células possam produzir continuamente a droga para salto de exon. Os detalhes dessa técnica - AAV-U7 – estão descritos no meu relatório sobre salto de exon, cujo endereço na internet encontra-se no início desta seção.

Durante a reunião, **Luis Garcia**, em sua palestra intitulada "**Novos resultados da transferência sistêmica via AAV**", apresentou os primeiros resultados dos seus experimentos para transladar os estudos em camundongos mdx para um animal muito maior, o cão distrófico GRMD. Os experimentos com camundongos demonstraram que dois meses após a injeção do sistema AAV-U7 em suas veias caudais, a maior parte das fibras musculares de quase todos os músculos, incluindo as fibras musculares do coração, continham a desejada distrofina mais curta sem os aminoácidos codificados para o exon 23.

O sistema U7 contendo sequências antisense contra os exons 6 e 8 do mRNA da distrofina do cão, foi utilizado no tratamento regional de uma perna do cão GRMD, para restaurar o quadro de leitura após a deleção do exon 7, por meio do método da transferência regional hidrodinâmica, descrito pelo Dr. Jon Wolff na apresentação anterior.

Depois que resultados positivos foram obtidos com esse tratamento regional, efetuou-se uma transferência sistêmica completa no cão distrófico Droopy, lançando-se mão de circulação extracorpórea ativada por uma

bomba mecânica. Foram transferidos duzentos milímetros de uma solução contendo 270 trilhões ( $2,7 \times 10^{14}$ ) de partículas virais, em quatro porções, no intervalo de 5 minutos. Utilizou-se um desvio cardiopulmonar para evitar os pulmões o mais possível.

Dois meses depois, detectou-se nas biópsias de todos os músculos analisados uma distribuição abrangente de mRNA de distrofina, sem os exons 6-9, e a correspondente distrofina mais curta. O salto do exon 9 não foi intencional, mas sua remoção não altera o quadro de leitura. O cão suportou muito bem o procedimento, mas apesar da grande quantidade de vetores infundidos, a quantidade sintetizada de distrofina nova foi pequena demais para causar efeitos na função muscular. É possível que algo na corrente sanguínea tenha bloqueado a transferência dos vetores, que não puderam sair dos vasos sanguíneos para o tecido muscular. Estudos estão avançando para superar esse gargalo crucial e obter uma melhora na função muscular, antes que testes clínicos com meninos com Duchenne possam ser contemplados.

Na última apresentação da sessão, **Brian Kaspar** (Hospital Nacional Infantil em Columbus OH, USA) tratou sobre “**Terapia Genética para a Atrofia Muscular Espinhal (AME)**”, onde o maior problema era a entrega sistêmica da proteína SMN aos neurônios motores que residem na medula espinhal.

Apesar dos tremendos esforços efetuados ao longo dos últimos dez anos, a entrega sistêmica ao sistema nervoso central - SNC, cérebro e medula espinhal – tem representado um desafio aos pesquisadores. O Dr. Kaspar relatou que pesquisadores descobriram que os vírus adeno-associados tipo 9, AAV9, poderiam ser usados para transportar, através da barreira sangue-cérebro de camundongos recém-nascidos, o gene de uma proteína marcador verde fluorescente (GFP) ou o gene para a proteína SMN com comprimento total. A barreira sangue-cérebro protege o sistema nervoso central de substâncias nocivas. Os vírus e suas cargas foram capazes de penetrar tanto em um grande número de neurônios por todo o cérebro, quanto em muitos neurônios motores da medula espinhal, onde o marcador fluorescente GFP, ou a proteína SMN com comprimento total foram produzidos. Em animais adultos tratados, apenas os astrócitos - células que envolvem as células nervosas e vasos sanguíneos no sistema nervoso central – e um pequeno número de neurônios estavam produzindo a GFP. Além disso, os vetores penetraram nos músculos esqueléticos e cardíacos, tanto nos animais recém-nascidos quanto nos adultos.

Os experimentos preliminares foram efetuados com o camundongo SMN2-delta7, modelo animal para a grave AME Tipo I (doença de Werdnig-Hoffmann). Como ocorre nos pacientes humanos, esse camundongo não possui um gene SMN1 funcional, e o mRNA do seu gene SMN2 apresenta uma deleção no exon 7.

Por meio de injeções sistêmicas do sistema vetor AAV9-SMN no jovem camundongo de 5-13 dias de vida, os pesquisadores demonstraram que enquanto o camundongo não tratado vive apenas 15 a 20 dias, aqueles tratados durante esse período não apresentavam mais os sintomas da AME e viveram mais de 100 dias. Todavia, os animais tratados cresceram, mais tarde, só a metade do tamanho de um animal normal. Outros laboratórios também reproduziram a capacidade do sistema vetor de penetrar eficientemente nos neurônios motores após injeções intravenosas. Um grupo de pesquisas na França, conduzido pelo Dr. Martine Barkats, utilizou o AAV9 no modelo felino (gatos) da AME, e obteve resultados semelhantes.

Os próximos passos são experimentos com primatas não humanos – macacos, por exemplo - para testar a aplicabilidade dessa abordagem e sua segurança, antes que testes clínicos com crianças portadoras da AME possam ser efetuados.

## Desenvolvimento de bancos de dados para ensaios clínicos

À medida que mais e mais testes clínicos são efetuados e preparados para o desenvolvimento de terapias para doenças neuromusculares, bancos de dados de pacientes estão tornando-se importantes para encontrar participantes para os estudos, com diagnósticos bem definidos e dados clínicos atualizados ao alcance dos centros de estudo.

Os três palestrantes desta sessão discutiram exemplos bem-sucedidos, particularmente dos bancos de dados internacionais para a distrofia muscular de Duchenne, DMD, e para a atrofia muscular espinhal, AME. Ambos os bancos podem ser acessados na internet, pelo endereço: <http://www.treat-nmd.eu/patients/patient-registries/global-registries/>. Por intermédio do endereço do TREAT-NMD, é possível acessar 19 bancos de dados para a DMD, 17 para a AME, e 8 para a distrofia miotônica tipo 1. Todos eles estão conectados entre si pela rede de bancos de dados do TREAT-NMD. Assim, pacientes com DMD e AME precisam se cadastrar em apenas um deles, de preferência em seus próprios bancos nacionais, porque suas informações mais relevantes - o conjunto mínimo de dados - são enviadas para o banco de dados global de DMD (ou de AME), localizados na Universidade de Montpellier, na França. Pacientes em países sem um banco de dados nacional podem armazenar seus dados em um dos bancos que utilizam formulários online.

As vantagens e benefícios do registro de pacientes, descritos a seguir, baseiam-se nas três apresentações dessa sessão:

(1) Os bancos de dados fazem a ligação entre pacientes e famílias interessados em participar de pesquisas, e pesquisadores das universidades e indústrias, interessados no estudo de suas doenças e desenvolver procedimentos terapêuticos.

(2) Permitem maior agilidade nos estudos, da concepção ao teste clínico, promovendo o uso eficiente do dinheiro.

(3) Dados sobre o manejo médico de pacientes permitirão desenvolver e manter bons padrões de cuidados em acordo com recomendações aceitas internacionalmente.

(4) Famílias e pacientes registrados não se sentem abandonados, mas pertencentes à comunidade da doença, porque recebem informações atualizadas sobre pesquisas e cuidados, especialmente sobre o início de testes clínicos que necessitem de sua participação.

(5) Como é possível documentar continuamente a evolução clínica da doença de um paciente, partindo dos primeiros sintomas - no passado - ao período posterior à aprovação e comercialização de "sua" droga - durante o tratamento, esses dados podem ser utilizados para estudar a história natural de uma doença, com fins de controle e identificação de qualquer efeito colateral e dados adicionais de eficácia que se surjam durante a utilização da droga a longo prazo.

(6) A disponibilidade de dados passados e futuros de pacientes, pode convencer agências reguladoras a aprovarem uma droga para uma doença rara, mesmo quando estudos randomizados e de segurança não possam ser efetuados como solicitado para a aprovação de drogas "normais".

Em sua apresentação intitulada **"Doença de Huntington e AME"**, **Jaqueline Jackson** (Universidade de Indiana, Bloomington IN, USA) disse-nos que alguns dos bancos de dados mais importantes foram criados muitos anos atrás: o banco de dados para a doença de Huntington, em 1979, para a AME, em 1986, para a doença de Alzheimer, em 1990, para a doença de Parkinson, em 1998, para a doença de Charcot-Marie-Tooth, em 2001, e para aneurisma intracraniano familiar, em 2002. Os bancos de dados para muitas outras doenças neuromusculares estão listados nas páginas sobre bancos de dados do TREAT-NMD. O banco de dados de AME, baseado em Indiana, contém atualmente dados de 2300 pacientes de 2160 famílias. O banco de dados para a doença de Huntington lista 14.000 pacientes de mais de 3.000 famílias totalizando 130.000 pessoas.

Para que pesquisadores tenham acesso aos pacientes e a seus dados, eles devem submeter propostas de seus projetos de pesquisa, que serão revisadas, e devem ser aprovadas por um comitê consultivo científico. Esses bancos de dados permitiram que milhares de famílias participassem de pesquisas e testes clínicos, e proporcionaram milhares de publicações sobre essas doenças.

Em sua apresentação intitulada **"Perspectivas industriais e regulatórias"**, **Per Nilsson** (Farmacêutica Actelion, Allschwil, perto de Basel, Suíça) descreveu as vantagens que os bancos de dados proporcionam para a pesquisa industrial. Dentre exemplos, mencionou a Myozyme, desenvolvida pela Genzyme contra a

doença de Pompe, e a Zavesca<sup>®</sup>, desenvolvida pela Actelion contra a doença de Niemann-Pick tipo C. O desenvolvimento dessas duas drogas consumiu muito tempo, e teve um elevado custo, mas se antes do início dos trabalhos rumo a um tratamento efetivo houvesse a disponibilidade de bancos de dados com informações de longo prazo para essas duas doenças raras, elas poderiam estar disponíveis mais rapidamente e a um menor custo.

Um outro exemplo é a droga Tracleer<sup>®</sup>, contra a hipertensão arterial pulmonar, PAH, hoje comercializada pela Actelion. Ela foi aprovada em 2002, na União Europeia, com dados de 170 pacientes em dois testes clínicos randomizados, na condição de que fosse estabelecido um programa pós-comercialização de gerenciamento de risco que requeria que os médicos relatassem às autoridades de saúde quaisquer efeitos adversos nos pacientes tratados. Isso foi determinado porque estudos clínicos demonstraram que cerca de 11% dos pacientes desenvolveram, de forma reversível, níveis crescentes de enzimas hepáticas. O esforço resultou na criação de um banco de dados para a PAH, que continha, após quatro anos, dados de quase 5000 pacientes tratados, abrangendo 80% das prescrições na União Européia. Esse tipo de banco de dados tornou-se, no caso outras doenças raras, um modelo para programas similares de vigilância orientada.

Foi iniciado em 2000, na Suécia, um banco de dados e um estudo clínico para o uso de terapia trombolítica para dissolver coágulos de sangue em acidentes vasculares cerebrais isquêmicos, que eventualmente incluiu 11.000 pacientes de 30 países. Esse banco de dados forneceu dados importantes para mostrar que os benefícios de uma terapia desse tipo, indicados por testes clínicos placebo controlados, poderiam ser trasladados para a prática clínica. Isso ilustra, mais uma vez, a grande importância dos bancos de dados de pacientes no desenvolvimento de drogas para doenças graves.

**Hanns Lochmüller** (TREAT-NMD, Newcastle, Reino Unido) finalizou a sessão com sua apresentação "**Bancos de dados de pacientes do TREAT-NMD**". Além das informações incluídas na introdução deste resumo, ele mencionou ter levado três anos para recrutar 150 pacientes com Duchenne para o grande estudo alemão sobre tratamento combinado de prednisona e ciclosporina, coordenado pelo professor Rudolf Korinthenberg, do Hospital Infantil da Universidade de Freiburg, que demonstrou que a adição de ciclosporina não aumentava o efeito da prednisona administrada sozinha. Naquela época não havia bancos de dados de Duchenne, que tornariam o recrutamento de pacientes mais fácil e rápido.

Uma correlação genótipo-fenótipo confiável seria de grande importância prática, porque permitiria, por exemplo, prever quais sintomas da distrofia de Becker certa droga para salto de exon produziria. Os dados clínicos e genéticos, derivados de um banco de dados para a DMD/DMB, facilitariam o estabelecimento de tal correlação.

O TREAT-NMD está preparado para ajudar associações de pais a criarem bancos de dados para suas doenças neuromusculares. O Centro Neuromuscular Europeu, ENMC, nos Países Baixos, também ajudou a criar e colocar em atividade bancos de dados de pacientes em cooperação com o TREAT-NMD.

## Medida de resultados clínicos

Medidas de resultados são ferramentas para avaliar mudanças em um paciente ao longo do tempo. Elas medem alterações em áreas significativas da vida de uma pessoa, para decidir sobre os tratamentos possíveis. Eu encontrei esta definição na internet, e o programa desse encontro contém as seguintes três frases de introdução para esta sessão:

**A escolha correta das medidas de resultados para um teste clínico pode ser crítica para seu sucesso. Fazer tais escolhas pode ser um processo longo e demorado. Uma vez feitas as escolhas, existem muitas questões práticas que devem ser abordadas para implementá-las com sucesso.**

As três apresentações a seguir foram realizadas nesta sessão, e tratam de como escolher medidas de resultados, como implementá-las, otimizá-las, e garantir sua qualidade:

**Michael Rose** (King's College, London, Reino Unido) “*Como devemos escolher as medidas de resultados para estudos e testes clínicos?*”

**Julaine Florence** (Universidade de Washington, St. Louis MO, USA) “*Implementando e otimizando medidas de resultados clínicos.*”

**Jeremy Hobart** (Escola de Medicina Península, Plymouth, Reino Unido) “*Avaliação da qualidade de medidas de resultados.*”

Muitos detalhes foram fornecidos pelos palestrantes que, em minha opinião, podem realmente não interessar à maioria dos pacientes com doenças neuromusculares e suas famílias, para os quais escrevi este relatório. E como minha área de conhecimento é pesquisas em terapias para a distrofia muscular de Duchenne, tenho dificuldade de tratar com essa área técnica especial e resumir os fatos mais importantes. Por essa razão, peço a quem necessite conhecer mais sobre o assunto, que consulte a documentação detalhada sobre medidas de resultados, publicada pelo TREAT-NMD na internet: <http://www.researchrom.com>.

Entretanto, há uma medida de resultados que vale mencionar aqui: o teste da caminhada de seis minutos, feito com pacientes que ainda conseguem caminhar, e agora largamente utilizado em testes clínicos com Duchenne e outras doenças musculares.

O primeiro estudo científico utilizando esse teste, feito com meninos distróficos e com meninos saudáveis, foi publicado online pelo jornal *Muscle & Nerve*, em 25 de novembro de 2009, por Craig M. McDonald e seus colegas de trabalho, da Universidade da Califórnia, em Davis. Os resultados indicam que os jovens meninos com Duchenne podem realizar o teste de forma consistente e confiável. O estudo foi patrocinado pela PTC e financiado pelo American Parent Project Muscular **Dystrophy** (PPMD).

## Efeitos do tratamentos de longo prazo e as terapias combinadas

**Robert Griggs** (Universidade de Rochester NY, USA) iniciou esta sessão com sua apresentação intitulada “*Corticosteroides a longo prazo na DMD: implicações para novos tratamento*”.

O tratamento com corticosteroides - prednisona ou deflazacort – é atualmente o único tratamento medicamento comprovadamente capaz de - por tempo limitado - preservar ou manter os músculos de meninos com Duchenne. Ele é considerado, agora, o “padrão ouro”, utilizado para comparação com outros tratamentos farmacológicos.

Mas ainda não existe um consenso quanto a algumas questões: qual é o melhor esteróide, qual a dose e com que esquema de administração, e qual a melhor idade para iniciar. A dose deveria ser mudada quando o paciente ficar mais velho? Por quanto tempo o tratamento pode ser estendido? Quais os efeitos colaterais e como podem ser evitados ou minimizados? Uma pesquisa mostrou que 31 tipos diferentes de regimes de tratamento estão em uso em 60 centros médicos pelo mundo. Todavia, muitos pacientes com Duchenne ainda não recebem qualquer tratamento com esteróides.

Um grande teste clínico internacional, financiado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, NIH, está sendo preparado, e deve responder a muitas das questões mencionadas acima. Seus resultados devem levar a um padrão definido para tratamentos com esteróides. O teste será efetuado em 40 centros médicos de 11 países, e os 300 participantes, meninos com Duchenne e idades entre 4-7 anos organizados em 3 grupos randomizados de 100 pacientes, serão tratados durante três anos com 0,75 mg/kg/dia de prednisona, ou 0,9 mg/kg/dia de deflazacort, aplicados diariamente ou em doses ajustadas segundo o regime “Dubowitz”, isto é,

10 dias sim/10 dias não. Muitas medidas de resultados padronizadas serão utilizadas para que resultados de diferentes centros possam ser comparados. Com a cooperação do TREAT-NMD, estão planejados um manejo padronizado de efeitos colaterais e o acompanhamento de longo prazo por ao menos 10 anos, para identificar efeitos positivos e negativos de curto e longo prazos.

Em sua apresentação intitulada “**Efeitos colaterais de longo prazo das drogas em desenvolvimento para DNMs**”, Rudolf Korinthenberg (Hospital Infantil da Universidade de Freiburg, Alemanha) disse que em testes clínicos com drogas recém-descobertas, somente os efeitos colaterais de curto prazo passam a ser conhecidos.

Mas drogas para doenças neuromusculares deverão ser tomadas por longo tempo. Portanto, durante o período de extensão, após o fim de um teste clínico, quando todos os participantes estão recebendo a nova droga - inclusive aqueles que receberam placebo - não só os efeitos terapêuticos devem ser monitorados por vários anos, mas também os efeitos colaterais. Isso também é importante para a aprovação da droga. Essa tarefa não é tão complicada se os dados do paciente estiverem armazenados em um banco de dados que utiliza um programa ativo para supervisão de longo prazo da saúde do paciente.

O Dr. Korinthenberg apresentou uma relação de estratégias de tratamento, cujos efeitos colaterais de longo prazo devem ser monitorados. Isso é particularmente importante nas doenças neuromusculares crônicas, e onde são usadas drogas com efeitos terapêuticos moderados. Alguns efeitos colaterais inesperados podem ser: problemas com crescimento, osteoporose, função hepática e renal, e hipertensão, que podem surgir anos após o término dos testes clínicos.

**Bruno Eymard** (Instituto de Miologia, Paris, França) falou sobre “**Estudos pós-comercialização utilizando como paradigma a doença de Pompe**”.

A doença de Pompe, uma enfermidade relacionada ao depósito de glicogênio causado por uma mutação no gene para a enzima alfa-1,4-glicosidase ácida, localizado no cromossomo 17, existe sob duas formas: iniciando na infância, e tardiamente, em adultos.

A terapia com a Myozyme<sup>®</sup> para a substituição de enzimas, desenvolvida e comercializada pela Genzyme Corporation, é bem-sucedida em crianças e fácil de supervisionar. Mas em adultos o tratamento é difícil de avaliar, uma vez que a evolução clínica e os sintomas são mais complexos, e a Myozyme só apresenta um efeito modesto.

Devido ao alto custo da Myozyme, o Ministério da Saúde francês requisitou um estudo pós-comercialização que mostraria claramente um efeito positivo de longo prazo da droga, não apenas em crianças, mas também em adultos, cuja doença é mais difícil de controlar. Por essa razão foi montado, em cooperação com a Genzyme, um banco de dados Francês que contém atualmente cerca de 15 grupos de dados de 75 pacientes com doença de Pompe. Essa base é utilizada, nesse estudo, para avaliar os pacientes antes, durante, e após o tratamento, uma ou duas vezes por ano, para determinar o valor do tratamento para a saúde e a situação de vida dos pacientes, e também para detectar efeitos colaterais tardios. Os resultados do estudo devem convencer as autoridades de saúde da França a continuarem pagando pelo tratamento.

O banco de dados promoveu uma fértil colaboração entre as equipes francesas envolvidas com a doença de Pompe.

Em sua segunda apresentação, **Francesco Muntoni** (University College, London, Reino Unido) falou sobre “**Combinação de velhas e novas abordagens. Uma visão do futuro**”, e começou perguntando se alguém deveria efetuar estudos clínicos com drogas de potenciais diferentes ao mesmo tempo. Como alguém poderia saber qual componente de qual combinação de drogas foi responsável por qualquer efeito terapêutico positivo, ou colateral negativo?

À medida que mais e mais abordagens precisam ser avaliadas em testes clínicos, teremos que enfrentar o problema das terapias combinadas. Biomarcadores para cada efeito isolado seriam de grande ajuda, e teriam um efeito nas medidas de resultados a serem usadas em tal combinação. E essas medidas de

resultados também devem levar em conta as consequências pessoais, tais como a carga crescente que as famílias devem enfrentar quando cuidam de seus filhos mais velhos enfermos, e a deterioração da qualidade de vida dos pacientes.

Se meio bilhão de euros - como oferecido pela GlaxoSmithKline - é a quantia necessária para desenvolver apenas quatro drogas para salto de exon, que ajudariam somente 35% dos pacientes com Duchenne, então para tratar 45% a mais de pacientes, precisaremos de muitos bilhões a mais para as mais de 100 dessas drogas personalizadas.

Mas os 20% restantes precisarão de outras drogas, na maioria farmacológicas, que não têm relação direta com um tipo de mutação. Precisamos ajudar esses pacientes também. E embora a distrofia de Duchenne seja a mais frequente das doenças neuromusculares, ela não é a única. Para as outras, tratamentos efetivos também precisam ser encontrados.

Mas não são necessárias apenas imensas somas de dinheiro. Precisamos de mais pesquisadores, em mais países do que temos agora, que nos ajudarão a desenvolver novas drogas e métodos mais efetivos. E para os nossos pacientes que ainda têm muitos anos de espera, precisamos de procedimentos para manejo clínico padronizados e melhores, não só nos países desenvolvidos, mas também no restante do mundo. E todos os pacientes, suas famílias e seus médicos - onde quer que estejam - necessitam de acesso a informações atualizadas, para que não fiquem para trás quando a primeira droga efetiva - e em breve muitas outras - tenha chegado dentro de alguns anos.

## **DISCUSSÃO:**

Robert Griggs: Se a restauração completa da distrofina pudesse ser obtida para todos os músculos, poderia ser suficiente para obter a aprovação sem um controle placebo.

Francesco Muntoni: Mas 30% da distrofina normal pode ser o suficiente para obter uma boa função muscular. Estou confiante de que também seremos capazes de demonstrar essa correlação entre o nível de distrofina e a função muscular em meninos com Duchenne, como ela já existe nos camundongos e cães distróficos.

Petra Kaufmann: A chave do nosso sucesso é a parceria e o comprometimento dos pesquisadores, médicos, indústria e organizações de pacientes, nossos maiores interessados. A contínua coleta de informações em bancos de dados é decisiva para descobrir o que acontece com e sem os tratamentos. Isso é importante para obter a aprovação e o financiamento do NIH.

Bruno Eymard: Os pacientes não devem se sentir perdidos quando mudam ou trocam de médicos. Uma boa comunicação entre os centros médicos é essencial.

Victor Dubowitz: Não há substituto para o bom senso! Alguém pode sempre pensar em começar uma terapia com esteróides com aplicações diárias por três meses, então trocar para aplicações intermitentes, com efeitos colaterais menores. E se alguém continuar por muito tempo, talvez pudesse reduzir lentamente a dose até que o tratamento fosse interrompido completamente. Devemos observar experiências com outras doenças, como o reumatismo, onde esteróides também são usados, e os efeitos colaterais têm sido estudados já há muito tempo.

Robert Griggs: Nosso estudo é de longo prazo e também monitoraremos os efeitos colaterais por um longo tempo. Quando encontrarmos a terapia com os menores efeitos colaterais, tentaremos chegar a um acordo e recomendar o tratamento ideal.

Kate Bushby: Cada paciente deve ter a oportunidade de participar de um teste clínico apropriado a ele ou ela. E todos devem compreender que podem receber placebo, mas que também receberão o tratamento padrão, incluindo esteróides e acompanhamento de longo prazo.

Elizabeth Vroom: Nós recebemos solicitações de pacientes de países onde não há centros efetuando testes

clínicos, e que até gostariam de imigrar e vir até nós. E há pacientes cujas drogas para salto de exon podem não ser desenvolvidas tão cedo, ou até mesmo nunca. Eles devem ter acesso aos testes clínicos.

*Francesco Muntoni e outros:* Os resultados de cerca de 30% de todos os testes clínicos nunca são publicados, porque as empresas às vezes não desejam ceder seus dados. Mas todos os testes clínicos devem ser publicados, mesmo aqueles mal planejados e que obtiveram resultados ruins. Nós podemos aprender com esses erros.

*Representantes da Genzyme:* Nosso banco de dados para a doença de Pompe tem agora 20 anos, e o custo para mantê-lo e trabalhar com ele é de milhões de dólares por ano. O acompanhamento de pacientes a longo prazo, utilizando bancos de dados, é importante para o processo de aprovação e para decidir quem pagará posteriormente pelo tratamento. O teste da caminhada de seis minutos com pacientes com Pompe demonstrou o benefício clínico da Myozyme. As drogas da Genzyme para as doenças de Fabry e de Gaucher demoraram, respectivamente, 15 e 8 anos até que um tratamento ótimo fosse encontrado, após o término dos testes clínicos e da aceitação dos dados de acompanhamento, como prova dos benefícios. Não é possível chegar a tais resultados com base somente em testes clínicos.

## Derrubando barreiras entre os interessados

A palestra de encerramento foi ministrada por **Volker Straub**, coordenador do TREAT-NMD, Universidade de Newcastle, Reino Unido.

O Dr. Straub iniciou sua palestra com a pergunta: quais são as “nossas” partes interessadas, os diferentes grupos de pessoas que, no nosso caso, têm um interesse em comum, ou seja, encontrar caminhos para terapias efetivas contra doenças neuromusculares: as organizações de pacientes, os cientistas, os médicos, as grandes e pequenas companhias farmacêuticas, os reguladores e as agências financiadoras. Embora todos eles procurem compreender uns aos outros e trabalhar juntos rumo a um objetivo comum, existem barreiras entre eles, porque todos têm seus interesses individuais, que os levou a desenvolver conhecimentos próprios, com base em treinamento e qualificação próprios, suas próprias linguagens especializadas, com palavras difíceis, e suas próprias formas de pensar sobre o que é ou não importante. Essas barreiras devem ser levadas a sério, podem retardar o progresso, e essa é a razão pela qual o TREAT-NMD, nossa Rede Europeia de Excelência, enxerga isso como sua principal tarefa: unir nossas partes interessadas e agrupá-las em uma direção que trará, a todos, terapias para a distrofia muscular de Duchenne, para a atrofia muscular espinhal, e para muitas outras das nossas doenças ainda sem tratamento.

Temos que derrubar essas barreiras. Temos que melhorar nossa comunicação: os cientistas devem aprender a explicar suas pesquisas aos pacientes e suas famílias, em linguagem compreensível, o que não é fácil, visto que nem todos sabem como a ciência funciona. A barreira da linguagem está intimamente relacionada com as diferenças culturais existentes entre as partes interessadas. O conceito de doença e tratamento, é por vezes fundamentalmente diferente entre diferentes culturas e continentes.

Falsas expectativas também podem criar barreiras. Dez anos para desenvolver uma nova droga parece normal para um cientista, ao passo que para uma família com um menino distrófico, ela é necessária para “amanhã”, antes que seja tarde demais. Expectativas podem ser influenciadas por comunicados de imprensa, publicações, exageros em geral, e entusiasmo com relação a novas tecnologias e descobertas. Equívocos terapêuticos, ou esperança de que haverá estratégias melhoradas de tratamento em um futuro próximo, não só afetam pacientes e família, mas também médicos, cientistas, indústrias e organismos de financiamento.

O Dr. Straub salientou que as pessoas estão trocando conhecimentos a um ritmo cada vez maior, o que está causando um impacto fundamental em nossas vidas profissionais e estilos de vida. O filósofo alemão Hermann Lübbe chamou isso de “gegenwartsschrumpfung”, o “encolhimento do presente”. O futuro chega mais rápido do que nunca, e nós esperamos que as terapias efetivas cheguem mais depressa também.

*Para derrubar barreiras, a comunicação entre as partes interessadas deve ser intensificada, e há boa vontade para fazê-lo. A nós, cabe decidir a direção a seguir. Os modernos métodos de comunicação, como e-mail, permitem a correspondência mundial na velocidade da luz, e agora até reuniões virtuais, nas quais pode-se participar ativamente, a partir de em casa, via computador.*

*O Dr. Straub finalizou sua palestra dizendo que esta reunião, com sua mistura única de apresentações e painéis de discussão, mostrou o quão importante é o encontro pessoal, face a face, e que não há melhor forma de derrubar barreiras e chegar a um consenso quanto às diversas formas de prosseguir no rumo certo, em direção a uma terapia para alcançar vida longa para nossos pacientes.*

## **Palavras de encerramento**

*Por **Kate Bushby**, coordenadora do TREAT-NMD, Universidade de Newcastle, Reino Unido:*

*“Sabemos que os primeiros testes clínicos com uma nova droga, ou procedimento, devem fornecer uma prova de conceito, um experimento muito cauteloso para descobrir se uma nova ideia realmente funciona. Essa reunião foi, de certa forma, a prova de conceito da nossa nova ideia: a colaboração é chave para o sucesso da pesquisa translacional. Como em todas as reuniões científicas, a nossa teve apresentações e cartazes no seu programa. Mas também estávamos interessados em explorar um novo jeito de trabalhar para uma conferência internacional tão grande: com discussões abertas entre especialistas, nos painéis, e os muitos especialistas da audiência.*

*Acreditamos que o sucesso dessa reunião deve-se a esse conceito, de forma que, na realidade, muitas das barreiras entre laboratórios e a clínica fossem derrubadas, para que pudéssemos, rapidamente, encontrar novos caminhos para trazer aos pacientes terapias para as doenças neuromusculares.*

*Gostaria de dizer que essa “prova de conceito” forneceu resultados muito positivos: todos os nossos 350 participantes, vindos de 26 países, trabalharam ativamente juntos. Muitos deles enviaram suas perguntas e ideias por escrito, antes da conferência, e foram, em sua maioria, respondidas pelos membros dos painéis nas diferentes sessões. Novas perguntas e ideias surgiram e foram discutidas, e alguns temas importantes emergiram.*

*Pacientes, onde quer que estejam, devem ter a oportunidade de participar dos testes clínicos, e ter esperanças de que uma droga ou outra terapia os ajudaria agora, ou mais tarde. Para tornar suas vidas significativas, pacientes e famílias, onde quer que estejam, devem poder acessar as informações mais atualizadas sobre as pesquisas em suas doenças e aos melhores cuidados, e às drogas para suas doenças, quando estiverem disponíveis, mesmo que custem muito dinheiro.*

*Os bancos de dados precisam ser mantidos para que o futuro aprenda tudo sobre as doenças e sobre os efeitos colaterais de longo prazo das novas terapias, de modo que saibam o que poderá acontecer no futuro. As drogas de nova geração podem ser desenvolvidas para otimizar mais e mais os tratamentos. E as autoridades de saúde, em todos os países, devem aceitar suas responsabilidades para cuidar de todos os seus cidadãos portadores de doenças raras.*

*Só poderemos levar a cabo todos esses importantes pontos, se o espírito colaborativo, incorporado nesse encontro, for uma vez mais aplicado por todas as partes interessadas nos anos vindouros. Portanto, esse encontro será conhecido como um marco que precisamos acompanhar, e o TREAT-NMD fará todo o possível para que isso seja possível.*

*Agradeço a todos que fizeram esse encontro tão bem-sucedido, por seus esforços continuados para trabalhar juntos, sem barreiras, por terapias efetivas para todos os nossos pacientes.*

**Obrigada.**

Você pode examinar este relatório, meus relatórios anteriores sobre pesquisas com distrofia muscular de Duchenne, e algumas entrevistas em: <http://www.duchenne-information.eu>

Se desejar receber todos os meus futuros relatórios assim que estiverem prontos, em inglês, espanhol ou alemão, por favor, envie-me seu endereço de e-mail para incluí-lo nas minhas listas de e-mails, que já têm mais de um milhão de endereços.

Agradeço ao TREAT-NMD e ao projeto **American Parent Project Muscular Dystrophy, PPMD**, pelo apoio financeiro. Aqui está o endereço do TREAT-NMD, nossa rede neuromuscular:

Institute of Human Genetics, University of Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK, Tel.: \*44-191-241-8605, internet: <http://www.treat-nmd.eu>.

Encaminhei à maioria dos palestrantes da conferência de Bruxelas a primeira versão dos meus resumos sobre os seus trabalhos, e pedi que sugerissem mudanças e acréscimos onde necessário. Quase todos o fizeram, significando que não deve haver erros por corrigir, ou há poucos. Eu não teria conseguido escrever este relatório sem essa ajuda. Todos os meus agradecimentos vão para eles.

Envio a todos vocês, do meu local de trabalho de inverno na Floresta Negra, Alemanha, a cerca de 30 km a leste de Freiburg, os meus melhores cumprimentos.



**Dr. Günter Scheuerbrandt**, Im Talgrund 2 D-79874 Breitnau, Germany Tel.: \*49-7652-1777 E-Mail: [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de) Internet: <http://www.duchenne-information.eu>  
03 de fevereiro de 2010

**Traduzido para o português por: Marcelo D. P. de Oliveira**  
**E-mail: [trad.mdpo@gmail.com](mailto:trad.mdpo@gmail.com)**