

MARLY CONCEIÇÃO SILVA

**Diagnóstico da cardiomiopatia na distrofia muscular progressiva por
ressonância magnética cardiovascular – correlação com tratamento,
prognóstico e preditores genéticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Rochitte

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Marly Conceição

Diagnóstico da cardiomiopatia na distrofia muscular progressiva por
ressonância magnética cardiovascular : correlação com tratamento, prognóstico e
preditores genéticos / Marly Conceição Silva. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Carlos Eduardo Rochitte.

Descritores: 1.Distrofia muscular de Duchenne/fisiopatologia 2.Distrofia
muscular de Duchenne/complicações 3.Mutação/genética 4.Creatina quinase
5.Cardiomiopatia/diagnóstico 6.Cardiomiopatia/fisiopatologia
7.Cardiomiopatia/etiologia 8.Imagem por ressonância magnética 9.Função
ventricular 10.Miocárdio/patologia 11.Fibrose/diagnóstico 12.Inibidores da
enzima conversora da angiotensina

USP/FM/DBD-145/13

Dedicatória

À minha família e amigos pelo apoio e tolerância, meu respeito e amor.

Aos sofridos pacientes portadores de distrofia muscular de Duchenne, que com dores e imensas dificuldades posturais, se submeteram às demoradas ressonâncias cardíacas. Aos pais destes pacientes que acreditaram que poderíamos mudar os rumos do tratamento dos seus filhos e enfrentaram muitas dificuldades para os transportarem até o local de realização das ressonâncias cardíacas, meu compromisso e empenho.

À Dra Zilda Alves Meira por acreditar que, por meio desta pesquisa, poderíamos minorar o sofrimentos dos nossos pacientes com distrofia de Duchenne e pelo grande incentivo no dia a dia, minha amizade e admiração.

Ao mestre Dr. Carlos Eduardo Rochitte por acreditar na minha capacidade.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Rochitte, minha grande admiração pelo seu profícuo conhecimento e capacidade de compartilhá-lo com seus seguidores. Meus sinceros agradecimentos por me ensinar a pesquisar com respeito aos pacientes e rigor no método científico. Agradeço pela oportunidade e paciência.

À Lenira, amizade conquistada, pela inestimável colaboração e competência.

À Neusa e sua equipe na secretaria da pós-graduação, agradeço pela simpática ajuda.

Aos diretores da Axial Centro de Imagem , meus colegas Rogério Aguiar Ferreira e Geraldo Mol Starling que, com espírito científico, possibilitaram a realização, sem qualquer custo, de todas as ressonância cardíacas. Meu profundo agradecimento.

Aos técnicos da ressonância e enfermagem do Axial Centro de Imagem pela generosa colaboração.

Às professoras da UFMG Dra. Zilda Maria Alves Meira e Dra. Juliana Gurgel Giannetti pelo apoio e decisiva participação na pesquisa.

Ao departamento de pediatria da UFMG e em especial aos professores Maria Aparecida Martins, Maria do Carmo Barros de Melo e Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana, obrigada pelo incentivo e interlocução.

Ao amigo Dr. Marco Antônio de Oliveira Machado Lara, pelo incentivo de sempre e inestimável ajuda no tabelamento dos dados.

Ao Laboratório Baldacci por ter fornecido os medicamentos usados no tratamento de pacientes com envolvimento cardíaco, sem qualquer exigência. Obrigada pela confiança.

Aos pacientes, objetivo maior de toda atividade científica, meu eterno agradecimento.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos, de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de símbolos	
Resumo	
<i>Summary</i>	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico	4
1.2 Características clínicas das distrofias musculares de Duchenne e de Becker	5
1.2.1 Distrofia muscular de Duchenne (DMD).....	5
1.2.2 Distrofia muscular de Becker (DMB).....	6
1.3 Envolvimento cardíaco	7
1.4 Características genéticas e base molecular	9
1.5 Fisiopatologia	12
1.6 Diagnóstico.....	16
1.6.1 Creatinofosfoquinase	18
1.6.2 Estudo molecular	18
1.6.3 Biópsia muscular.....	19
1.7 Diagnóstico cardiológico.....	22
1.7.1 Ecocardiograma.....	22
1.7.2 Ressonância magnética cardíaca (RMC) com técnica de realce tardio miocárdico (RTM) na detecção de fibrose miocárdica.....	23
1.7.3 Fibrose miocárdica em pacientes com DMD e DMB pela RMC.....	25
1.8 Tratamento	27
1.8.1 Glicocorticóides.....	27
1.8.2 Drogas para envolvimento cardíaco	28
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVOS	31
4 MÉTODOS	33
4.1 Casuística.....	34
4.2 Estudo genético.....	39
4.3 Biópsia muscular	40
4.4 Creatinofosfoquinase (CK)	42
4.5 Eletrocardiograma (ECG).....	42
4.6 Radiografia de tórax (RX).....	42

4.7	Ecocardiograma (ECO)	43
4.8	Ressonância magnética cardíaca (RMC)	44
4.8.1	Cine ressonância	44
4.8.2	Realce tardio miocárdico (RTM)	45
4.8.3	Análise das imagens de ressonância magnética	46
4.8.3.1	Análise das imagens de cine ressonância	47
4.8.3.2	Análise das imagens de realce tardio	48
4.9	Análise estatística	51
5	RESULTADOS	53
5.1	Características clínicas dos pacientes	54
5.2	Avaliação morfofuncional	61
5.3	Função global do ventrículo esquerdo	64
5.4	Fibrose miocárdica	67
5.4.1	Análise de regressão múltipla	76
5.4.1.1	Em todos os pacientes	76
5.4.1.2	No grupo randomizado	77
5.4.1.3	No grupo de pacientes com mutação em exons	78
5.4.2	Relação entre idade, fibrose miocárdica e CK	83
5.4.3	Fibrose miocárdica segmentar e alteração da contratilidade segmentar (classificação da AHA)	89
5.5	Comparação dos pacientes com mutação em exons menores que o exon 45 e maiores ou iguais ao exon 45	93
5.6	Avaliação prognóstica	96
6	DISCUSSÃO	102
6.1	Distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker e envolvimento cardíaco	104
6.2	Avaliação da fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca	108
6.3	Evolução da fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca	111
6.4	Relação da fibrose miocárdica com a mutação nos exons menores que o 45 e maiores ou igual ao 45	112
6.5	Resposta ao tratamento de pacientes com fibrose miocárdica	114
6.6	Relação da fibrose miocárdica com óbitos e eventos	117
7	CONCLUSÕES	119
8	ANEXOS	121
9	REFERÊNCIAS	157

Listas

Tabelas

Tabela 1 - Isoformas da distrofina e padrões de expressão.	10
Tabela 2 - Principais parâmetros das sequências de ressonância magnética cardíaca.....	46
Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes segundo os grupos D (disfunção sistólica), SDSF (sem disfunção sistólica e sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado).....	59
Tabela 4 - Características clínicas dos pacientes segundo os grupos D (disfunção sistólica), SDSF (sem disfunção sistólica e sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado) (continuação).	60
Tabela 5 - Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo dos métodos tradicionais de diagnóstico de distrofia muscular progressiva em relação ao método de diagnóstico por ressonância magnética cardíaca.	61
Tabela 6 - Características morfofuncionais pelo ecocardiograma e RMC basal nos grupos D (disfunção sistólica), SDSF (sem disfunção sistólica sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado).....	63
Tabela 7 - Características clínicas e da RMC dos pacientes segundo a classificação da fração de ejeção pela RMC.	66
Tabela 8 - Características clínicas, do ecocardiograma e da RMC dos pacientes segundo classificação presença de fibrose miocárdica.....	68
Tabela 9 - Características da fibrose miocárdica obtida pela RMC basal e de seguimento segundo os grupos D (disfunção sistólica - FEVE < 50%), SDSF (sem disfunção sistólica - FEVE ≥ 50% e sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado).....	71

Tabela 10 - Comparação da evolução da fibrose miocárdica RMC basal e de seguimento dentro de cada grupo segundo classificação D (disfunção sistólica FEVE < 50%), SDSF (sem disfunção sistólica – FEVE ≥ 50% e sem fibrose), SDF-NT(randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado).	72
Tabela 11 - Fatores preditores da progressão da fibrose miocárdica em percentual.	80
Tabela 12 - Fatores preditores da progressão da fração de ejeção da RMC seguimento.	81
Tabela 13 - Fatores preditores da classificação da fração de ejeção da RMC seguimento.	82
Tabela 14 - Características da fibrose miocárdica obtida pela RMC basal e de seguimento segundo faixa etária.	84
Tabela 15 - Relação entre as medidas de fibrose miocárdica obtida pela RMC basal e de seguimento e idade.	85
Tabela 16 - Distribuição de frequência e comparação entre a classificação dos segmentos com fibrose segmentar (presente e ausente) e com contratilidade segmentar (normal e anormal).	92
Tabela 17 - Características clínicas, do ecocardiograma e da RMC dos pacientes segundo classificação exons - menor que o exon 45 e maior ou igual ao exon 45.	94
Tabela 18 - Características clínicas, do ecocardiograma e da RMC dos pacientes segundo classificação exons - menor que exon 45 e maior ou igual ao exon 45 (continuação).	95
Tabela 19 - Características clínicas dos pacientes que foram a óbito e dos sobreviventes.	96
Tabela 20 - Análise descritiva das características clínicas dos pacientes.	122
Tabela 21 - Análise descritiva dos parâmetros do ecocardiograma e RMC basal.	123
Tabela 22 - Análise descritiva dos parâmetros do RMC seguimento.	124
Tabela 23 - Análise de correlação entre idade e alguns parâmetros indicativos de doença mais avançada.	125

Tabela 24 - Comparação de médias da idade segundo óbito, eventos, cadeira de roda e presença de fibrose RMC basal.	126
Tabela 25 - Distribuição de frequência e comparação dos segmentos do AHA com fibrose.	127
Tabela 26 - Distribuição de frequência dos segmentos (classificação da AHA) com alteração de contratilidade.	128

Figuras

Figura 1 -	Organização genômica do gene da distrofina no cromossomo Xp21.....	9
Figura 2 -	Esquema da proteína com seus respectivos domínios (N-terminal, <i>Rod domain</i> , domínio rico em cisteína e C-terminal) e sua interação com as proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular.....	13
Figura 3 -	Algoritmo do diagnóstico de DMD ou DMB.....	17
Figura 4 -	Histoquímica muscular – HE (20x) tecido muscular esquelético com acentuada variação no calibre das fibras, fibrose endomisial, necrose, fagocitose e regeneração de fibras (A). HE (20x) tecido muscular esquelético com acentuada variação no calibre das fibras e fibrose endomisial (B).....	20
Figura 5 -	Imuno-histoquímica de amostras de músculo de paciente com distrofia de Duchenne (A, C e E) e controles (B, D e F) em aumento de 20x. Distrofina DYS1 Domínio Rod: negativo (A) e controle DYS1(B). Distrofina DYS2 Terminal carboxila: negativo com fibras (C) e controle (D). Distrofina DYS3 Terminal amino: negativo (E) e controle (F).....	21
Figura 6 -	Fluxograma do estudo.	38
Figura 7 -	Mapa polar representativo da divisão miocárdica em 17 segmentos com as respectivas nomenclaturas, recomendado para uso em imagens cardíacas proposto pela AHA.....	50
Figura 8 -	Imagens de quantificação da fibrose miocárdica pela ressonância magnética analisada por meio do <i>software</i> CMR42, versão 3.4.2 da empresa Circle Cardiovascular Imaging (Calgary, Alberta, Canadá).....	50
Figura 9 -	Histoquímica muscular do paciente número 33 – HE (20x): tecido muscular com acentuada variação no calibre das fibras, fibrose endomisial, necrose e regeneração de fibras.....	57

Figura 10 - Imuno-histoquímica de amostras de músculo do paciente número 33 com distrofia de Duchenne (A, C e E) e controles (B, D e F) em aumento de 20x.	58
Figura 11 - Relação entre fração de ejeção pela RMC basal e fração de ejeção pelo ecocardiograma.	65
Figura 12 - Imagens de pacientes portadores de fibrose miocárdica pela RMC. Imagens A,B,C,D e E são de pacientes com distrofia muscular de Duchenne e F, G, H e I são de pacientes com Becker.	69
Figura 13 - Progressão do percentual de fibrose de todos os pacientes....	73
Figura 14 - Progressão do percentual de fibrose dos pacientes do grupo SDSF (sem cardiomiopatia).	73
Figura 15 - Progressão do percentual de fibrose dos pacientes do grupo D.	74
Figura 16 - Progressão do percentual de fibrose dos pacientes do grupo SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado).	74
Figura 17 - Progressão do percentual de fibrose dos pacientes do grupo SDF-T (randomizado com fibrose tratado).	75
Figura 18 - Progressão da média do percentual de fibrose segundo os grupos D (disfunção sistólica - FEVE < 50 %), SDSF (sem disfunção sistólica - FEVE ≥ 50% e sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado), SDF-T (randomizado com fibrose tratado).	75
Figura 19 - Relação entre massa de fibrose pela RMC basal e idade.	85
Figura 20 - Relação entre volume de fibrose pela RMC basal e idade.	85
Figura 21 - Relação entre percentual de fibrose pela RMC basal e idade.	86
Figura 22 - Relação entre nº de segmentos com fibrose pela RMC basal e idade.	86
Figura 23 - Relação entre massa de fibrose pela RMC seguimento e idade.	86
Figura 24 - Relação entre volume de fibrose pela RMC seguimento e idade.	86
Figura 25 - Relação entre percentual de fibrose pela RMC seguimento e idade.	86

Figura 26 - Relação entre nº de segmentos de fibrose pela RMC seguimento e idade.....	86
Figura 27 - Relação entre CK e idade.....	87
Figura 28 - Relação entre média de CK e distribuição das faixas etárias	88
Figura 29 - Relação entre média de CK, média do percentual de fibrose na RMC basal e distribuição nas faixas etárias.....	88
Figura 30 - Distribuição de frequência dos segmentos do AHA com fibrose	90
Figura 31 - Distribuição de frequência dos segmentos do AHA com alteração de contratilidade	90
Figura 32 - Distribuição de frequência dos segmentos do AHA com fibrose segundo classificação subendocárdico, meso-epicárdico e transmural.....	91
Figura 33 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes com fração de ejeção normal e alterada na RMC basal.	98
Figura 34 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes com fibrose presente e ausente.....	98
Figura 35 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes segundo os grupos D, SDSF, SDF-NT, SDF-T.....	99
Figura 36 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida, em relação aos eventos combinados, dos pacientes com fração de ejeção normal e alterada na RMC basal.	99
Figura 37 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes com fibrose presente e ausente em relação aos eventos combinados.	100
Figura 38 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes segundo os grupos D, SDSF, SDF-NT, SDF-T, em relação aos eventos combinados.	100
Figura 39 - Imagens de paciente portador de distrofia muscular de Becker que foi a óbito demonstrando fibrose miocárdica no mesmo corte e segmento na peça de anatomia patológica e RMC – predomínio dos segmentos laterais.	101

Abreviaturas e siglas

αDG	Alfa distroglicano
βDG	Beta distroglicano
AHA	<i>American Heart Association</i>
ATPase	Adenosina trifosfatase
BAV	Bloqueio atrioventricular
BIPAP	<i>Bi-level positive airway pressure</i>
BRA	Bloqueadores dos receptores de angiotensina
CAPEPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CK	Creatinofosfoquinase
COOH	Carboxi
CPAP	<i>Continuous positive airway pressure</i>
D	Disfunção sistólica
DICOM	<i>Digital Imaging Communications in Medicine</i>
DMB	Distrofia muscular de Becker
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DNA	Ácido Desoxirribonucleico - <i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTPS	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DP	Desvio padrão
Dp	<i>Dystrophin protein</i>
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
FE	Fração de ejeção
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
H₂O₂	<i>Hydrogen peroxidase</i>
HC	Hospital da Clínicas
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
ICT	Índice cardiotorácico
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
INCOR	Instituto do Coração

IVDF	Índice de volume diastólico final
IVSF	Índice de volume sistólico final
MG	Minas Gerais
MLPA	<i>Ligation-Dependent Probe Amplification</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NH₂	Amino
nNOS	<i>Neuronal nitric oxide synthase</i>
ORO	<i>Oil red O</i>
p	Teste de significância
PAS	<i>Periodic acid- Schiff Test</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PH	Potencial hidrogeniônico
QT	Intervalo do início do QRS ao final da onda T
QTC	Intervalo QT corrigido
RMC	Ressonância magnética cardíaca
ROI	Região de Interesse - <i>Region of interest</i>
RR	Intervalo entre um complexo QRS e o seguinte
SDF-NT	Randomizado com fibrose não tratado
SDF-T	Randomizado com fibrose tratado
SDSF	Sem cardiomiopatia e sem fibrose
SSFP	<i>Steady-state free precession</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
VE	Ventrículo esquerdo

Lista de símbolos

>	maior
≤	menor ou igual
μl	Microlitro
μm	Micrometro
cm³	centímetro cúbico
g/l	grama por litro
g/m²	gramas por metro quadrado
g/ml	grama por mililitro
Kb	quilobase (1000 pares de base de DNA ou RNA)
KDa	quiloDalton (1 Dalton é a metade da massa do átomo de carbono)
MHz	<i>Megahertz</i>
ml	Mililitro
ml/m²	mililitro por metro quadrado
mm	Milímetro
mT/m	militesla por metro = 10 ⁻³ T
ng	Nanogramas
°C	graus Celsius
T	Tesla

Resumo

Silva MC. *Diagnóstico da cardiomiopatia na distrofia muscular progressiva por ressonância magnética cardiovascular – correlação com tratamento, prognóstico e preditores genéticos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: Distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne (DMD) e Becker (DMB) são doenças caracterizadas por progressiva degeneração musculoesquelética e substituição por tecido fibrogorduroso. O envolvimento cardíaco está presente em 80% dos pacientes, apresenta curso clínico silencioso e é diagnosticado tardiamente pelos métodos tradicionais.

Objetivos: 1. Investigar a progressão da fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca (RMC), em ensaio clínico randomizado para tratamento ou não com IECA, de pacientes com DMD e DMB e fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE) preservada, por um período de 02 anos. 2. Investigar se há mutações genéticas específicas que sejam preditoras do acometimento miocárdico diagnosticado pela RMC. 3. Comparar os achados do ECG, radiografia de tórax e ecocardiograma com os da RMC.

Métodos: Entre 1/6/2009 e 1/6/2012 foram incluídos 76 pacientes com diagnóstico de DMD e DMB. Todos os pacientes realizaram duas RMCs com intervalo médio de $2,05 \pm 0,11$ anos, com técnicas de cine ressonância para avaliação da função ventricular e realce tardio miocárdico para avaliação da fibrose miocárdica. A fibrose miocárdica foi quantificada por software específico para obtenção do percentual da massa de fibrose do VE com análise semi automática, utilizando os desvios padrões da média dos valores de intensidade do sinal do miocárdio normal. Os valores acima de 5 desvios padrões da média do miocárdio normal foram considerados como fibrose miocárdica. Os 42 pacientes com fibrose miocárdica e FEVE normal foram randomizado em 2 grupos, com 21 deles recebendo tratamento com IECA e 21 sem qualquer tratamento para cardiomiopatia. Após 2 anos, novas RMCs foram realizadas para avaliar a evolução da fibrose e a FEVE.

Resultados: Notou-se fibrose miocárdica em 72,3% dos pacientes, sendo que 55,6 % não apresentavam disfunção sistólica. Verificou-se uma correlação positiva significativa entre idade e percentual de fibrose na RMC basal ($r=0,338$, $p=0,014$) e seguimento ($r=0,315$, $p=0,006$). Os pacientes randomizados e tratados com IECA apresentaram menor evolução do percentual de fibrose do que os randomizados não tratados ($3,1 \pm 7,4\%$ versus $10,0 \pm 6,2\%$ respectivamente, $p=0,001$). Na análise linear multivariada, verificamos que pertencer ao grupo tratado diminui a progressão do percentual de fibrose ($y=-4,51x+29,63$ ajustado por idade, CK e percentual de fibrose basal, $p=0,039$) e indica uma tendência de menor probabilidade de apresentar fração de ejeção do VE $< 50\%$ na RMC seguimento (OR= 3,18, $p= 0,102$, por regressão logística). Os pacientes com mutação nos exons menores que 45 do gene da distrofina apresentaram maior percentual de fibrose que os com mutação dos exons maiores ou iguais ao 45 na RMC basal ($27,9 \pm 18,4\%$ versus $12,1 \pm 13,4\%$, respectivamente, $p=0,006$) e seguimento ($33,1 \pm 21,1\%$ versus $18,8 \pm 16,9\%$, respectivamente, $p=0,024$). A avaliação conjunta por métodos tradicionais (radiografia de tórax, ECG e ecocardiografia) apresentou baixa sensibilidade

de 47,3% e valor preditivo negativo de 34,1% para o diagnóstico do envolvimento cardíaco na DMD e DMB, em pacientes com FEVE normal e fibrose miocárdica na RMC. **Conclusões:** O ensaio clínico randomizado, por um período de 2 anos, em pacientes com DMD e DMB, com fibrose miocárdica diagnosticada pela RMC e FEVE preservada, demonstrou significativa maior progressão da fibrose miocárdica nos pacientes que não fizeram uso de IECA. Existe uma correlação significativa entre o local de mutação no gene da distrofina e o acometimento cardíaco. O ECG, o eco e radiografia de tórax apresentaram baixa sensibilidade e baixo valor preditivo negativo para detecção do envolvimento cardíaco precoce nos pacientes com DMD e DMB.

Descritores: Distrofia muscular de Duchenne/fisiopatologia; Distrofia muscular de Duchenne/complicações; Mutação/genética; Creatina quinase; Cardiomiopatias/diagnóstico; Cardiomiopatias/fisiopatologia; Cardiomiopatias/etiologia; Imagem por ressonância magnética; Função ventricular; Miocárdio/patologia; Fibrose/diagnóstico; Inibidores da enzima conversora da angiotensina

Summary

Silva MC. *Diagnosis of cardiomyopathy in progressive muscular dystrophy by cardiovascular magnetic resonance - correlation with treatment, prognosis and genetic predictors* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introduction: Duchenne and Becker muscular dystrophies (DMD and BMD) are diseases characterized by progressive skeletal muscle degeneration and replacement by fibro fatty tissue. Cardiac involvement is frequent, as high as 70 - 80% of patients, and often develops clinically silent, without any evident early clinical signs. Traditional diagnostic methods (ECG, chest x-ray and echocardiography) are only able to diagnose cardiac involvement at a later stage. **Objectives:** **1.** To investigate the progression of myocardial fibrosis by cardiac magnetic resonance (CMR), in a randomized clinical trial for treatment with ACE inhibitors, in patients with DMD or BMD and preserved left ventricular ejection fraction (LVEF), for a period of 02 years. **2.** To investigate whether there are specific genetic mutations that are predictive of myocardial involvement detected by CMR. **3.** To compare the findings of ECG, chest radiography and echocardiography with those found by CMR. **Methods:** Between 01/06/2009 and 01/06/2012 76 patients with DMD and BMD were included. All patients underwent two CMRs with a mean interval of 2.05 ± 0.11 years, using cine resonance for function evaluation and myocardial delayed enhancement technique for myocardial fibrosis detection. Myocardial fibrosis was quantified by specific software for obtaining fibrosis mass, as percentage of LV mass, using semi-automatic fibrosis analysis and standard deviations of the mean values of signal intensity of the normal myocardium. A value of five standard deviations above the mean of a normal myocardium were considered myocardial fibrosis. The 42 patients with myocardial fibrosis and normal LVEF were randomized into 2 groups, with 21 of them receiving ACE inhibitor treatment and 21 no treatment for cardiomyopathy. After 2 years, new CMRs were performed to evaluate fibrosis extent and LVEF. **Results:** Myocardial fibrosis was noted in 72.3% of the patients, 55.6% showed no systolic dysfunction. There was a significant positive correlation between age and myocardial fibrosis at the CMR baseline ($r=0.338$, $p=0.014$) and follow-up ($r=0.315$, $p=0.006$). Patients randomized and treated with ACE inhibitors had lower evolution of myocardial fibrosis than those who were randomized and untreated ($3.1 \pm 7.4\%$ vs. $10.0 \pm 6.2\%$, respectively, $p=0.001$). Using multivariate regression analysis, we found that belonging to the treated group decreases the progression of myocardial fibrosis ($y=-4.51x+29.63$ adjusted for age, CK and baseline myocardial fibrosis, $p=0.039$) and indicated a trend for lower probability of presenting $LVEF < 50\%$ at follow-up CMR (OR= 3.18, $p= 0.102$, by logistic regression). Patients with mutations in exons less than 45 had greater extent of myocardial fibrosis than patients with mutations in exons greater than or equal to 45 in CMR at baseline ($27.9 \pm 18.4\%$ vs. $12.1 \pm 13.4\%$, respectively, $p=0.006$) and at follow-up ($33.1 \pm 21.1\%$ vs. $18.8 \pm 16.9\%$, respectively, $p=0.024$). **Conclusions:** In this 2-year follow-up randomized clinical trial in patients with DMD and BMD with preserved LVEF, myocardial fibrosis diagnosed by CMR, showed significantly greater progression in patients not

receiving ACE inhibitors therapy. There was a significant correlation between the site of mutation in the dystrophin gene and cardiac involvement. ECG, echocardiography and chest radiography showed low sensitivity and low negative predictive value for early detection of cardiac involvement (myocardial fibrosis by CMR) in patients with DMD and BMD.

Descriptors: Muscular dystrophy, Duchenne/physiopathology; Muscular dystrophy, Duchenne/complications; Mutation/genetics; Creatine kinase; Cardiomyopathies/diagnosis; Cardiomyopathies/physiopathology; Cardiomyopathies/etiology; Magnetic resonance imaging; Ventricular function; Myocardium/pathology; Fibrosis/diagnosis; Angiotensin-converting enzyme inhibitors.

1 Introdução

Distrofia muscular progressiva corresponde a um grupo de doenças geneticamente determinadas, em que há degeneração musculoesquelética irreversível e progressiva, com consequente fraqueza muscular também progressiva, após um curto período de desenvolvimento motor aparentemente normal ¹. A herança pode ser autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao cromossomo X. A forma mais comum e letal da distrofia muscular progressiva é a forma de Duchenne (DMD). Uma outra forma alélica e 10 vezes mais rara que a forma de Duchenne, é a forma de Becker (DMB) ².

Nestas duas formas de distrofia há mutação no gene da distrofina localizada no cromossomo X, no locus Xp21. A distrofina é uma proteína localizada na camada interna da membrana plasmática das fibras musculares e, juntamente com as proteínas do complexo distroglicano, faz a ligação do citoesqueleto com a matriz extracelular ³. Sua principal função é manter a estabilidade da membrana celular (sarcolema) durante a contração muscular. Com a falta ou pequena quantidade de distrofina, os músculos distróficos sofrem sucessivas micro rupturas no sarcolema durante a contração, com consequente necrose das fibras musculares e substituição por tecido fibrogorduroso ⁴.

Na DMD as mutações levam a uma ausência de expressão da distrofina em tecido muscular, com manifestação fenotípica mais grave. Na DMB, a distrofina apresenta-se em quantidade reduzida ou com peso

molecular anormal levando a um fenótipo, em geral, mais leve e ao início dos sintomas mais tardiamente. Existe ainda, uma terceira forma clínica, descrita como forma intermediária entre DMD/DMB, cujas manifestações não são tão graves como na DMD nem tão leves como na DMB. Tal variabilidade fenotípica depende do tipo de mutação e do seu efeito na expressão da distrofina ³.

Como as distrofias musculares nas formas de Duchenne e Becker são recessivas ligadas ao cromossomo X, as mulheres são portadoras e os homens manifestam a doença. Aproximadamente 1/3 dos casos de DMD são causados por mutações novas e 2/3 são herdados de mães portadoras. Com esse padrão de hereditariedade, as gestantes portadoras apresentam risco de 50% de passar o gene defeituoso para a sua descendência, sendo que metade dos filhos pode ser afetada e metade das filhas tornar-se portadora ^{5,6}.

Na história natural destas distrofias ocorre o envolvimento dos grupos musculares esqueléticos, como o dos membros inferiores e respiratórios e também do miocárdio. Entre as principais causas de óbito destes pacientes estão a insuficiência respiratória e/ou cardíaca. Com a otimização dos cuidados respiratórios, a morte por causa cardíaca passou a representar um dos principais limitantes na sobrevivência destes pacientes ^{7,8}. Em 2007, nosso grupo descreveu pela primeira vez na literatura, em um pequeno grupo de pacientes, que o comprometimento cardíaco em DMD e DMB estava associado à presença de extensa fibrose miocárdica detectada pela Ressonância Magnética Cardiovascular (RMC) ^{9,10}. A correlação da fibrose

miocárdica com a mutação exon-específica e com intervenções terapêuticas que possam influenciar a progressão da fibrose miocárdica não são ainda conhecidas. Estes dados poderiam trazer modificações no manejo clínico destes pacientes.

1.1 Histórico

Em 1851, em uma comunicação para a *Royal Medical and Chirurgical Society of London* e em publicação no ano seguinte, Edward Meryon descreveu meninos apresentando sintomas consistentes com o diagnóstico de distrofia muscular ¹¹. Em 1867, na França, Guillaume-Benjamin-Amand Duchenne publicou um estudo detalhado, com sistematização clínica, patológica e eletrofisiológica de uma atrofia muscular progressiva que até hoje é conhecida como distrofia muscular de Duchenne (DMD) ¹². Em 1955, Becker e Kiener relataram uma forma alélica com fenótipo um pouco mais brando conhecido como distrofia muscular de Becker (DMB) ¹³.

Em 1993, Towbin *et al.* relataram uma forma de cardiomiopatia dilatada ligada ao cromossomo X, sem acometimento musculoesquelético expressivo, também considerada como uma forma alélica em que o padrão de expressão da mutação do gene da distrofina no músculo cardíaco difere do padrão de músculo esquelético ¹⁴.

Em todas estas três formas alélicas de distrofinopatias, o coração está clinicamente ou subclínicamente acometido em algum grau. O envolvimento

cardíaco foi mencionado pela primeira vez em 1836 por Conte e Gioia ¹⁵, em um caso semelhante ao que foi posteriormente descrito como distrofia muscular por Duchenne.

1.2 Características clínicas das distrofias musculares de Duchenne e de Becker

1.2.1 Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

A DMD se caracteriza por fraqueza muscular simétrica e progressiva, observada a partir do terceiro ano de vida. Entre três e seis anos, a criança apresenta acentuação da lordose lombar associada a báscula da bacia caracterizando a marcha anserina. Inicialmente, os meninos acometidos sofrem quedas frequentes e apresentam dificuldade para subir escadas, correr e levantar-se do chão ¹⁶. O “levantar miopático” é sinal característico e consiste em levantar-se apoiando sucessivamente as mãos nos diferentes segmentos dos membros inferiores, de baixo para cima, como se a criança estivesse ascendendo sobre si mesma ¹⁷. Estes sinais são decorrentes da fraqueza muscular simétrica que acomete inicialmente os músculos extensores das coxas e da coluna.

A distrofia muscular evolui com debilidade lentamente progressiva, levando a incapacidade para deambulação e o conseqüente uso da cadeira de rodas entre 10 e 12 anos de idade. Posteriormente, aparecem contraturas

musculares e deformidades esqueléticas progressivas. Os músculos dos membros superiores são acometidos com o progredir da doença, inicialmente nos grupos proximais e em seguida nos grupos distais ¹⁸. A insuficiência respiratória se estabelece como consequência da falência dos músculos respiratórios pela miopatia e pelos transtornos da mecânica respiratória pela grave lordose lombar ¹⁹.

Além das alterações musculoesqueléticas, há presença de osteoporose, dificuldade de deglutição ¹⁶ e cerca de 30 a 50% dos pacientes com DMD apresentam retardo mental ²⁰.

1.2.2 Distrofia muscular de Becker (DMB)

Na DMB o padrão anatômico de acometimento muscular é semelhante ao dos pacientes com DMD, entretanto estas doenças se diferenciam pela idade do início dos sintomas, ritmo de progressão e gravidade. A DMB é considerada uma forma mais leve de distrofia muscular progressiva e há maior heterogeneidade no fenótipo clínico, com o início dos sintomas em geral na segunda década de vida. A velocidade de progressão é muito variável. Os acometidos, em geral, continuam a andar até os 20 anos de idade, sendo que alguns deles deambulam até a quinta ou sexta décadas de vida ²¹.

1.3 Envolvimento cardíaco

O envolvimento cardíaco na DMD é muito frequente, insidioso e está presente em aproximadamente 80% dos pacientes²². Como estes pacientes estão sujeitos a acentuada restrição de mobilidade, mesmo que estejam com disfunção sistólica acentuada, pode haver ausência de manifestações clínicas até a segunda década de vida^{21,23}. Os sintomas de disfunção cardíaca podem ser vagos e inespecíficos, como fadiga, perda de peso, vômito, distúrbios do sono²⁴. Estes pacientes frequentemente desenvolvem arritmias e podem apresentar bloqueio AV completo associado a disfunção sistólica grave no estágio final da doença²⁵.

Na DMB, existem vários casos em que a expressão do fenótipo é atípica, incluindo grave cardiomiopatia na ausência de fraqueza muscular significativa²⁶. Estudos têm demonstrado que o envolvimento cardíaco, na maioria dos casos, se dá por volta dos 30 anos de idade²⁷. Alguns pacientes podem apresentar importante cardiomiopatia como primeira manifestação da doença, que pode se tornar muito grave e evoluir para transplante²⁸.

A doença cardíaca nas distrofinopatias está relacionada a substituição progressiva de cardiomiócitos e do sistema de Purkinje por tecido conjuntivo, fibrose ou por gordura²⁵. Em autópsias de pacientes em estágio final de doença cardíaca, nota-se alternância de áreas de hipertrofia de miócitos, atrofia e fibrose^{29,30}. Estudos histológicos têm demonstrado que fibras cardíacas de Purkinje apresentam necrose similar à notada nos músculos esqueléticos³¹.

Aproximadamente 28% dos pacientes com DMD apresentam anormalidades cardíacas detectáveis pelo ecocardiograma por volta dos 14 anos e 57% por volta dos 18 anos^{24,32}. Em estudo pioneiro do nosso grupo com ressonância magnética cardíaca em pacientes com DMD e DMB a partir de 7 anos de idade, demonstramos a presença de áreas de fibrose miocárdica apesar da ausência de disfunção sistólica, sintomas cardiovasculares ou alterações na radiografia de tórax, eletrocardiograma e ecocardiograma^{9,10}. Este foi o primeiro trabalho na literatura a descrever a presença de fibrose miocárdica pela técnica de realce tardio miocárdico (RTM) na ressonância magnética cardíaca em pacientes com distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker.

As complicações cardíacas, respiratórias e ortopédicas, se não forem tratadas, podem levar ao óbito por volta de 19 anos de idade na DMD. Com a assistência ventilatória noturna (CPAP e BiPAP) e cirurgia para estabilidade da coluna, está havendo uma queda na incidência de mortes por insuficiência respiratória⁸, ao passo que as mortes por acometimento cardíaco estão se tornando cada vez mais frequentes. O comprometimento cardíaco já é a segunda causa mais frequente de mortes nas distrofinopatias⁷ que ocorrem geralmente da segunda à terceira décadas de vida na DMD e da quarta à quinta décadas na DMB^{2,33}.

1.4 Características genéticas e base molecular

A forma mais comum de distrofia muscular é a de Duchenne, que apresenta incidência de 1:3.000 no sexo masculino. A distrofia de Becker apresenta incidência de 1:30.000^{34,35,36}. O gene da distrofina que foi isolado na década de 1980 por Greenstein, é um dos maiores do genoma humano, apresenta 2500 kb e contém 79 exons correspondentes a 1% do cromossomo X³⁴.

Este gene possui oito regiões promotoras que originam diferentes isoformas de distrofina (figura 1). Essas isoformas apresentam diferentes tamanhos e se expressam em diversos tecidos. Com exceção das isoformas Dp140, Dp116, todas as outras apresentam expressão no tecido miocárdico.

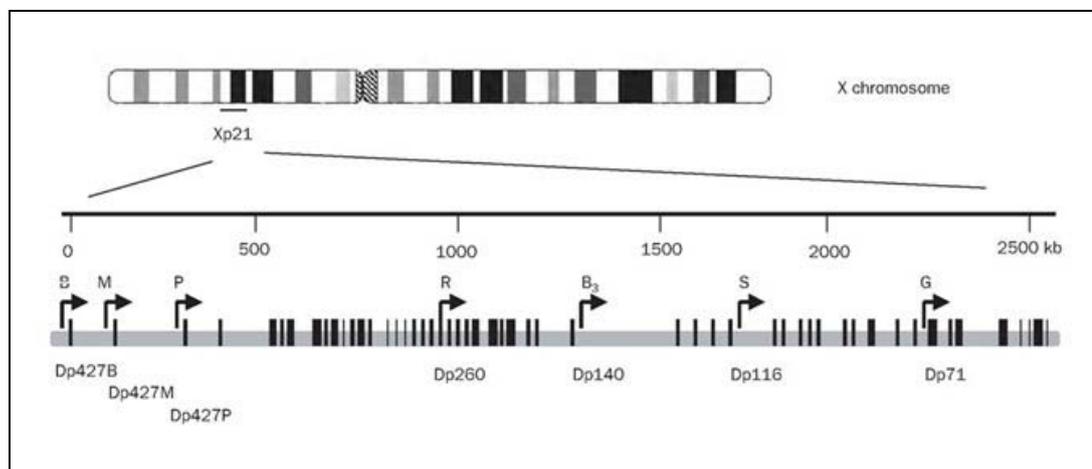


Figura 1 - Organização genômica do gene da distrofina no cromossomo Xp21. As linhas pretas verticais representam os 79 exons distribuídos em 2.500 kb. As setas indicam os vários promotores (B-cérebro, M-músculo, P-Purkinje, R-retina, S- células de Schwann e G-distrofina-cérebro). Abaixo estão descritas as várias isoformas da distrofina e as suas relações com os exons. Fonte: Adaptado de Muntoni, Torelli & Ferlini³⁷.

A Tabela 1 demonstra os padrões de expressão dos principais promotores da distrofina.

Tabela 1 - Isoformas da distrofina e padrões de expressão

Isoformas	Padrões de expressão
Dp427 B	Neurônios do córtex cerebral, hipocampo, músculo esquelético e cardíaco.
Dp427 M	Músculo esquelético e cardíaco; células gliais e córtex cerebral fetal.
Dp427 P	Neurônios cerebelares de Purkinje e músculo esquelético.
Dp260	Transcrita a partir do exon 30. Presente na retina, cérebro e músculo cardíaco.
Dp140	Transcrita a partir do exon 45. Presente no cérebro, coluna espinhal e rim. Expressa predominantemente durante o desenvolvimento cerebral do feto.
Dp116	Transcrita a partir do exon 56. Presente em células de Schwann.
Dp71	Transcrita a partir do exon 63. Presente no córtex cerebral, glândula pituitária, bulbo olfatório, giro denteado hipocampal, regiões no neocórtex, células-tronco embrionárias, retina, rim, pulmão e músculo cardíaco.

Fonte: Adaptado de Zachi ³⁸, Taylor ³⁹, Muntoni, Torelli & Ferlini ³⁷, Emery ⁴⁰ e Mehler ⁴¹.

A base molecular das distrofinopatias tem sido conhecida nos últimos 20 anos ^{42,43,44,45}. As distrofias de DMD e DMB podem estar associadas a diferentes defeitos genéticos tais como deleções em 70% dos casos, duplicações em 5-6% dos casos e mutações de ponto (em poucas bases ou em um nucleotídeo) nos casos restantes ⁴³. A extensão da deleção, no entanto, nem sempre se relaciona com a gravidade da doença. Alguns pacientes com DMB e sintomas mais leves podem apresentar deleções em numerosos exons enquanto outros com DMD e sintomas importantes podem apresentar deleções em poucos exons ⁴².

Estudos têm demonstrado que as mutações se concentram em duas regiões do gene, que são consideradas pontos quentes ou “*hot spots*”: As deleções ou duplicações ocorrem em 80% nos exons 44 a 52 e, nesta região, 40% delas ocorrem no exon 44, que é um dos mais extensos do gene da distrofina; outro “*hot spot*” corresponde aos exons 1 a 19, onde se concentram cerca de 20% das deleções ou duplicações ^{42,43,44,45}.

A distrofina é uma proteína cito esquelética que apresenta massa molecular de 427 kDa e 3.685 aminoácidos. São quatro os diferentes domínios conhecidos nesta proteína: o domínio amino terminal (NH₂-terminal); o *Rod domain*, que é a região mais central; o domínio rico em cisteína e o domínio carboxi terminal (COOH-terminal) ⁴⁶ (Figura 2).

A produção ou não da distrofina depende se a mutação mantém ou não a capacidade de tradução do mRNA na síntese da proteína. Monaco *et al.* ⁴⁷ propuseram a teoria de leitura de quadro, na qual hipotetizaram que a ausência de proteína detectável em DMD é causada pela mutação que provoca a perda da matriz de leitura do mRNA (*out of frame*), com consequente formação de uma proteína muito anormal que é rapidamente destruída pela célula na DMD. Se a deleção preservar a matriz de leitura do mRNA (*in frame*) forma-se uma proteína qualitativamente alterada, porém parcialmente funcional (DMB).

O conhecimento exato da mutação no gene da distrofina em pacientes com DMD ou DMB pode ser um indicador do prognóstico e parte importante no diagnóstico da doença. Existe uma teoria que relaciona o sítio da deleção com a gravidade do quadro clínico (expressão fenotípica).

Geralmente, os pacientes com DMD apresentam ausência da região C-terminal, enquanto na DMB essa região encontra-se preservada ⁴⁸. Deleções na região amino terminal (N-terminal) podem levar a variável, mas grave fenótipo de DMB. O *rod domain* proximal parece ser relativamente dispensável, pois as deleções encontradas neste local podem resultar em fenótipos mais leves ou atípicos. Deleções no *rod domain* distal tendem a ocasionar fenótipos mais típicos de DMB ⁴⁸.

Jefferies *et al.*, realizaram estudo genético de 47 pacientes com DMD e demonstraram que mutações nos exons 10-42 estiveram associadas com a presença de cardiomiopatia. Por outro lado, mutações nos exons 51 ou 52 foram relatados como possíveis cardioprotetores, isto é, não estiveram associados a envolvimento cardíaco ⁴⁹. Estudos experimentais vêm sendo desenvolvidos na tentativa de elucidar a relação entre o sítio da mutação e o desenvolvimento da cardiomiopatia. Entretanto, uma firme correlação entre o genótipo e o fenótipo cardíaco ainda não foi bem estabelecida ⁵⁰.

1.5 Fisiopatologia

Diversos modelos têm demonstrado que a distrofina faz a ligação da actina, proteína do sarcômero, que está situada sob a membrana, com a proteína de membrana beta-distroglicana e esta, por sua vez, interage com a proteína alfa-distroglicana, também conhecida como laminina, que está localizada na matriz extracelular ⁵¹. Com esta ligação, a principal função da

distrofina parece ser a estabilização do sarcolema e das proteínas do complexo distroglicano, assim como a conexão indireta da matriz extracelular com o aparato contrátil do citoesqueleto (sarcômero). Em tecidos não contráteis, a função da distrofina parece ser a organização da membrana celular e a manutenção de seus componentes^{52,37}.

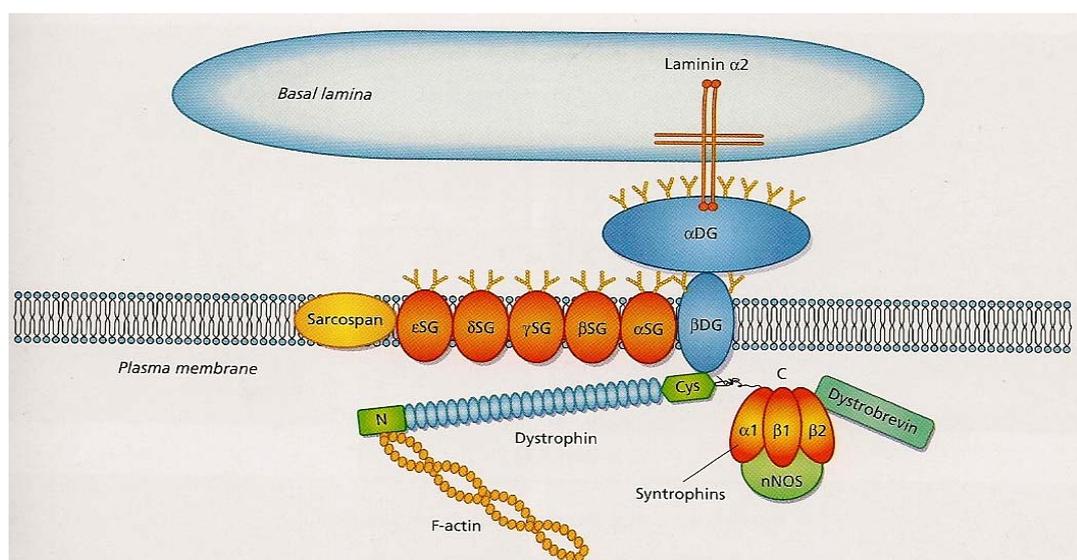


Figura 2 - Esquema da proteína com seus respectivos domínios (N-terminal, *Rod domain*, domínio rico em cisteína e C-terminal) e sua interação com as proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular.

Fonte: Dubowitz, V. 2007⁴⁶.

Apesar de todas as células musculares apresentarem micro rupturas na membrana plasmática quando sujeitas ao estresse mecânico, elas se adaptam reparando ou substituindo componentes que sofreram injúrias e prevenindo novas injúrias. Estas microrroturas provocam abertura transitória dos canais de cálcio e aumento localizado e transitório do fluxo de cálcio para o citoplasma celular, que é armazenado para próximas contrações

^{53,54,55}. Estudos com microscopia eletrônica em amostras de músculos esqueléticos de pacientes com DMD sugerem que a necrose da membrana muscular se dá devido ao fluxo anormal de íons de cálcio tecidual, com consequente aumento e persistência da atividade dos canais de cálcio, diminuição da estabilidade osmótica da membrana, ativação da protease sensível ao íon cálcio, causando degradação das proteínas musculares e dano tecidual ^{52,56,53}.

Estudos quantitativos de distrofina em biópsia muscular esquelética de pacientes com DMD, demonstraram pequena ou indetectável quantidade de distrofina ⁵⁷ manifestando-se com miopatia grave e morte prematura devido às complicações respiratórias e cardíacas ⁵⁸. Por outro lado, indivíduos com moderada redução do nível de distrofina apresentaram um fenótipo de DMB mais leve e variável ^{4,58,59}.

De forma semelhante, estudos realizados em biópsias miocárdicas em corações retirados de pacientes com DMD, submetidos a transplante e autopsiados, demonstraram a ausência de distrofina ^{29,30}. Bies *et al.* estudaram fibras cardíacas isoladas de corações originados de transplante cardíaco e demonstraram que a expressão anormal da distrofina nas fibras de Purkinje está diretamente relacionada aos defeitos de condução nos pacientes com DMD e DMB ⁶⁰.

Lohan *et al.* (2005) ⁶¹ estudaram as fibras cardíacas de modelo animal, com deficiência da isoforma da distrofina Dp427, devido à deleção de ponto no exon 23. O modelo animal exibiu um eletrocardiograma anormal e seu coração apresentou alterações necróticas e inflamatórias em grau

variável com propriedades contrateis alteradas. O exercício físico piorou o processo distrófico no coração. A análise por ensaio imuno enzimático sugeriu que a falta de distrofina claramente afetou a abundância do complexo distroglicano, como notado em músculos esqueléticos. Houve comprometimento da ligação entre a matriz extracelular e a actina no citoesqueleto, o que propiciou maior suscetibilidade às micro rupturas nas membranas das fibras cardíacas durante ciclos de excitação-contração-relaxamento, com conseqüente necrose celular ⁶¹.

No coração, a distrofina não está restrita ao sarcolema, mas também se localiza na região tubular transversa da superfície da membrana. Logo, a ruptura da membrana induzida pela contração afeta, além do plasmalema, os túbulos transversais na superfície da membrana ⁶². Em analogia à hipótese do efeito do excesso de cálcio nas fibras esqueléticas, a ruptura da membrana também introduz cálcio na superfície da membrana, levando ao aumento do transporte deste íon pelos canais de cálcio até o citoplasma, o que ativa as proteases dependentes de cálcio e ocasiona destruição de proteínas celulares e das fibras musculares ^{54,61,63}.

Como demonstrado na Figura 2, a distrofina parece também estar envolvida em mecanismos de sinalização por meio da interação com as sintrofinas, distrobrevinas e indiretamente com enzima óxido nítrico sintase produzida nos neurônios (nNOS) e canais de sódio e potássio ²⁰. Nas fibras cardíacas, o nNOS está ausente no sarcolema e está substituído por eNos (NOS endotelial) ^{64,65}. Sander *et al.* (2000) ⁶⁶ demonstraram que a nNOS se liga indiretamente à porção carboxi terminal da distrofina e é necessária para

aumentar o fluxo sanguíneo durante a contração muscular em humanos se exercitando fisicamente. A falta da nNOS provoca isquemia durante a contração, exacerbando os efeitos deletérios da deficiência de distrofina⁶⁶.

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico precoce e acurado da DMD e DMB permite uma intervenção apropriada multidisciplinar, com suporte contínuo objetivando minimizar as incapacitações próprias da evolução da doença e das suas comorbidades. Na presença de história familiar positiva de DMD ou DMB e/ou sintomas clínicos como função muscular anormal em uma criança do sexo masculino, com idade em torno de cinco anos, alguns passos devem ser seguidos visando o diagnóstico da doença:

- Estudo da dosagem de creatinofosfoquinase, transaminases e aldolase no sangue periférico. Em pacientes com DMD, há aumento importante dos níveis sanguíneos de creatinofosfoquinase desde o nascimento^{67,68,69}.
- Coleta de sangue periférico para estudo molecular, visando encontrar deleções ou duplicações no gene da distrofina.
- Caso não seja encontrada mutação, o próximo passo é a realização da biópsia muscular para estudar a distrofina.



Figura 3 - Algoritmo do diagnóstico de DMD ou DMB

1.6.1 Creatinofosfoquinase

Creatinofosfoquinase (CK) é uma enzima cuja função é adicionar um grupo fosfato à creatina, produzindo uma molécula de alta energia: a fosfocreatina. Esta molécula é uma fonte rápida de energia para as demandas celulares. Durante o processo de degeneração muscular, há ruptura das membranas celulares e o conteúdo celular cai na corrente sanguínea. Como há presença de grande quantidade de CK nas células musculares, o aumento dos níveis séricos de CK indica dano muscular.

A concentração de CK no sangue periférico está aumentada em mais de 10 vezes em todos os pacientes com DMD e em até 5 vezes em todos os pacientes com DMB. Na DMD, os valores de CK, entre os 14 e 22 meses de idade, estão bastante elevados (50 a 100 vezes o valor normal), mas a concentração diminui gradualmente com o avançar da idade como resultado da progressiva eliminação de fibras musculares distróficas que são fonte de elevada concentração de CK ^{70,71}.

1.6.2 Estudo molecular

O estudo molecular é realizado a partir de amostra de sangue periférico usando, mais frequentemente, técnicas como reação de cadeia de polimerase (PCR) e a “*multiplex ligation-dependent probe amplification*” (MLPA) que detectam deleções e/ou duplicações. Nos últimos 5 anos, a MLPA tem sido muito mais usada ^{72,73,74}. Na tentativa de cobrir falhas de

diagnóstico ocasionadas pela PCR multiplex, um novo método foi desenvolvido na Europa pela MRC-Holland, o MLPA. A “*multiplex ligation-dependent probe amplification*” (MLPA) permite a identificação de deleções e duplicações nos 79 exons da distrofina. Diferentemente do MLPA, o PCR multiplex estuda um menor número de exons e não detecta duplicações^{75,76}.

1.6.3 Biópsia muscular

A biópsia muscular com estudo da distrofina é decisiva para o diagnóstico dos pacientes que apresentam mutações de ponto ou pequenos rearranjos de deleções, dificilmente identificadas pelas técnicas de biologia molecular^{59,58}.

O estudo da distrofina é feito pelas técnicas de *Western blot* e imuno-histoquímica. As técnicas de imuno-histoquímica permitem que se faça a visualização de antígenos por meio da aplicação de anticorpo específico ao antígeno (o anticorpo primário), de um anticorpo secundário ao anticorpo primário e de um substrato cromógeno com etapas de lavagem de permeio. A ativação enzimática do cromógeno resulta em um produto de reação visível no local do antígeno. Os resultados são interpretados por meio de um microscópio óptico. No estudo imuno-histoquímico da distrofina, utilizam-se anticorpos contra diferentes epitopos e contra alguns dos componentes do complexo distrofina-glicoproteínas, avaliando tanto a qualidade quanto a quantidade da distrofina e das glicoproteínas a ela associadas^{77,78}.

A técnica *Wester blot* associa técnicas de separação por eletroforese e métodos de detecção de anticorpos. Essa técnica fornece informações sobre o peso molecular, quantidade e diferentes isoformas das proteínas estudadas ^{16,79}.

O estudo histológico da amostra muscular é inespecífico nas diversas miopatias e deve ser interpretado juntamente com o quadro clínico e exames laboratoriais. Se o estudo for feito mais precocemente na evolução da doença, nota-se variação no diâmetro da fibra, centralização nuclear, focos de necrose e de regeneração de fibras que pode ser deficitária. Se o estudo for feito mais tardiamente, há deposição de gordura, tecido conectivo e fibroso. O processo de necrose e regeneração acontece até que as células percam a sua capacidade de multiplicação ⁸⁰.

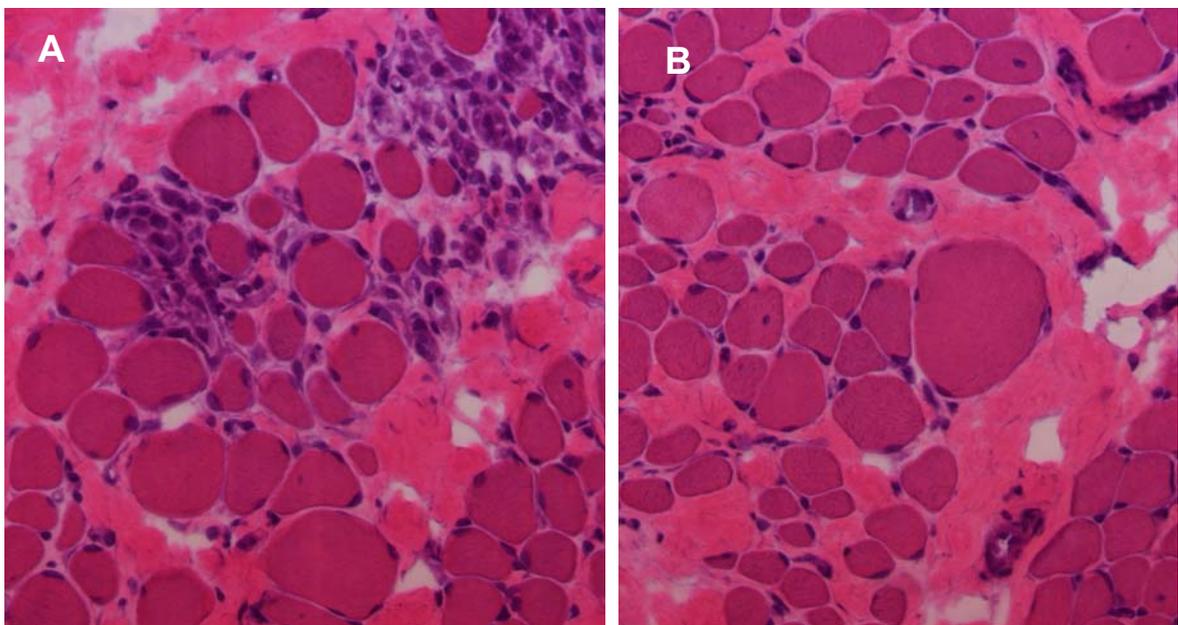


Figura 4 - Histoquímica muscular – HE (20x) tecido muscular esquelético com acentuada variação no calibre das fibras, fibrose endomisial, necrose, fagocitose e regeneração de fibras (A). HE (20x) tecido muscular esquelético com acentuada variação no calibre das fibras e fibrose endomisial (B). Imagens gentilmente cedidas por Dra Júlia Filardi de Oliveira Paim – patologista cirúrgica do laboratório de patologia clínica do Hospital Sarah Kubitschek, Belo Horizonte, MG

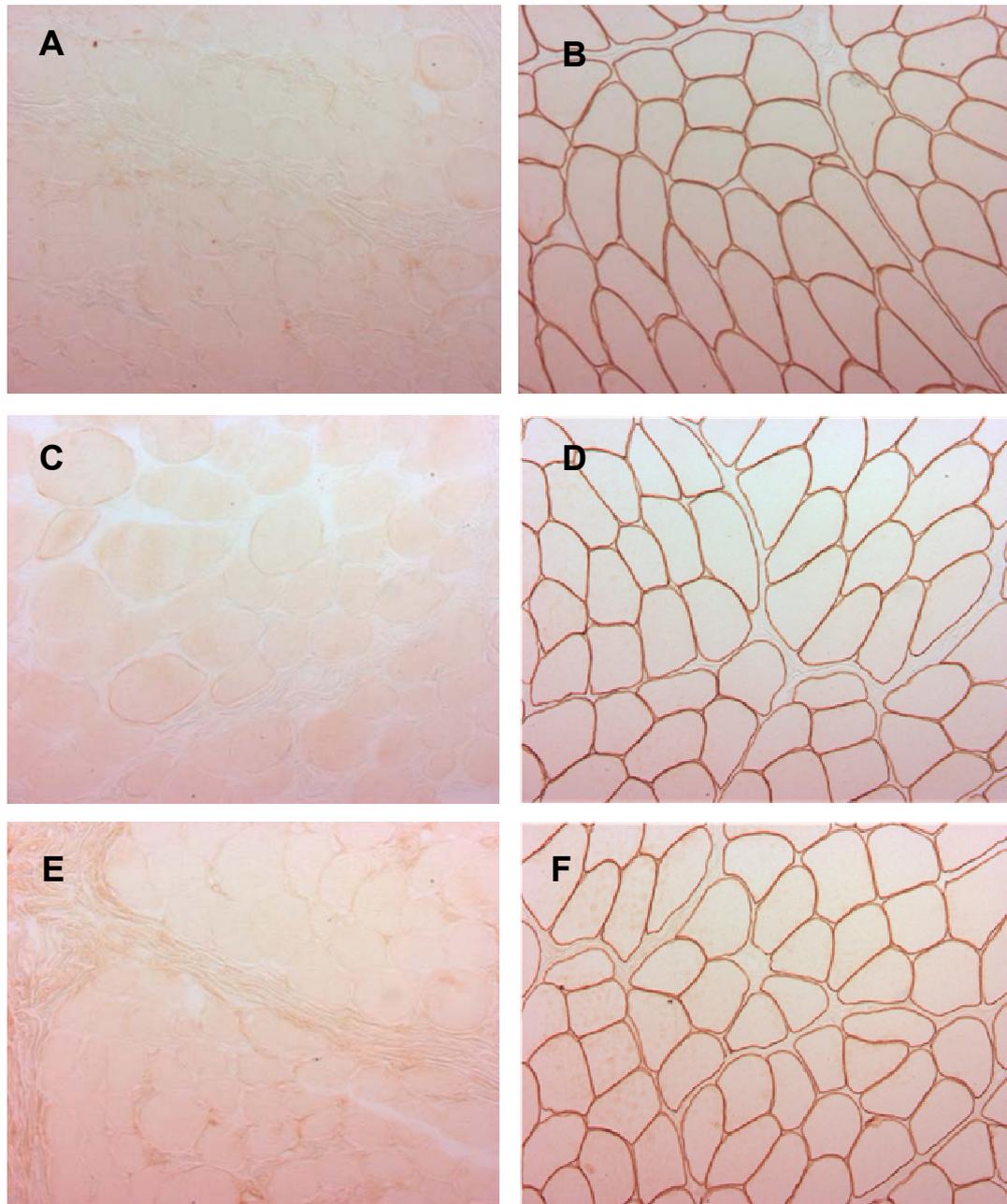


Figura 5 - Imuno-histoquímica de amostras de músculo de paciente com distrofia de Duchenne (A, C e E) e controles (B, D e F) em aumento de 20x. Distrofina DYS1 Domínio Rod: negativo (A) e controle DYS1(B). Distrofina DYS2 Terminal carboxila: negativo com fibras (C) e controle (D). Distrofina DYS3 Terminal amino: negativo (E) e controle (F)

Imagens gentilmente cedidas por Dra Júlia Filardi de Oliveira Paim – patologista cirúrgica do laboratório de patologia clínica do Hospital Sarah Kubitschek, Belo Horizonte, MG.

1.7 Diagnóstico cardiológico

Como o desenvolvimento da cardiomiopatia dilatada nas distrofinopatias usualmente precede o desenvolvimento de sintomas de insuficiência cardíaca e contribui significativamente para a mortalidade dos acometidos, a investigação diagnóstica precoce e sistemática é muito importante, visando a identificação e tratamento da disfunção sistólica inicial. A radiografia de tórax, o eletrocardiograma e o ecocardiograma devem ser realizados periodicamente tentando detectar algum sinal de disfunção cardíaca. Nos últimos anos, a ressonância magnética cardíaca tem sido valioso instrumento para a caracterização tecidual do miocárdio, em especial na detecção da fibrose miocárdica, em diversas cardiomiopatias isquêmicas e não isquêmicas^{81 82 83 84 85 86}. Na DMD e DMB a RMC detectou fibrose miocárdica como achado precoce na evolução da doença^{9,10,87,88,89,90,91,92}.

1.7.1 Ecocardiograma

O ecocardiograma ainda é o teste mais usado para diagnosticar a cardiopatia mas, frequentemente, está limitado pela escoliose acentuada que propicia pobre janela acústica, notada principalmente nos pacientes com DMD²¹. O ecocardiograma pode revelar dilatação de câmaras cardíacas, disfunção ventricular sistólica e diastólica, formação de trombos, anormalidades valvares, anormalidades na movimentação das paredes ventriculares, efusão pericárdica. O Doppler tecidual e o estudo da

deformação tecidual têm sido usados para estudo das anormalidades de movimentação das paredes miocárdicas podendo, em alguns casos, inferir fibrose subclínica^{93,94}.

1.7.2 Ressonância magnética cardíaca (RMC) com técnica de realce tardio miocárdico (RTM) na detecção de fibrose miocárdica

A ressonância magnética cardíaca é um método não-invasivo e desprovido de radiação ionizante, capaz de produzir imagens cardíacas com alta resolução espacial e em vários planos. Este método é padrão ouro para diagnóstico de alterações de contratilidade segmentar, por meio da técnica de cine ressonância^{95,23}. Nos últimos 10 anos, vários estudos experimentais^{96,97,98,99} e clínicos^{81,100,101,102,103} têm demonstrado que a RMC, utilizando a técnica de realce tardio, é precisa na caracterização tecidual miocárdica em regiões com infarto e/ou fibrose, identificando até mesmo áreas de microinfarto, não detectadas por outros métodos de imagem, devido a sua alta resolução espacial.

Nos últimos anos, além da consolidada importância da ressonância magnética na avaliação do miocárdio acometido por doença arterial coronariana, o estudo do realce tardio miocárdico por meio da RMC passou a ser utilizado em várias outras cardiopatias não isquêmicas, fornecendo importante contribuição no diagnóstico diferencial destas doenças. Muitas cardiopatias não isquêmicas apresentam aspectos característicos na

ressonância magnética, relacionando padrão de realce tardio à etiologia da agressão miocárdica ^{9,10,83,86,103,104,105,106,107,108,109}.

A técnica de realce tardio se desenvolveu a partir de estudos de Lima *et al.*, que detectaram e caracterizaram áreas de infarto, usando o gadolínio como contraste ¹⁰⁰. Kim ^{81,99,110} e Judd ¹¹¹ foram os primeiros a realizar trabalhos experimentais usando o realce tardio e Simonetti *et al.* ¹¹² fizeram a descrição da técnica do realce tardio miocárdico (RTM).

Para o estudo de realce tardio, são realizadas sequências de pulso do tipo gradiente-eco rápida ponderadas em T1, com um pré-pulso de inversão-recuperação e um tempo de inversão ajustado para anular o sinal do miocárdio. Por conseguinte, as imagens adquiridas por meio desta técnica demonstram o miocárdio íntegro com intensidade de sinal muito baixa, próximo a zero, o que aparece na imagem como sinal escuro. O quelato de gadolínio, que é o contraste rotineiramente usado para caracterização tecidual na RMC, ocupa o espaço extracelular por ser inerte e não atravessar as membranas celulares dos miócitos íntegros. Além do mais, como no miocárdio normal os miócitos estão densamente organizados, ocupando a maior parte do espaço (~80% do espaço é intracelular), apenas pequeno espaço extracelular (~20%) pode ser ocupado por contraste baseado no gadolínio ^{111,113}. Assim, com pequeno volume de distribuição para o quelato de gadolínio, este é rapidamente eliminado do miocárdio normal. Nas áreas com necrose ocorrem rupturas das membranas dos miócitos, comunicando o espaço intracelular com o espaço extracelular e, em consequência, há aumento acentuado do volume de distribuição do

gadolínio ^{113,114,115}. Isto leva a uma alteração na cinética da distribuição do contraste e propicia a eliminação mais lenta do mesmo (*delayed washout*). Com essas alterações, cerca de 10 a 15 minutos após a injeção do gadolínio, quanto maior a área de espaço extracelular causada pela presença de fibrose ou necrose miocárdica, maior será a concentração do contraste nestas áreas de injúria, com conseqüente hipersinal nas imagens de RMC. Assim, este hipersinal caracteriza o miocárdio infartado ou fibrótico como um miocárdio branco nas imagens de RMC ¹¹⁶.

Em pacientes com infartos antigos ou portadores de cardiopatias não isquêmicas em que há presença de fibrose miocárdica e expansão do espaço extracelular, nota-se também aumento da concentração de gadolínio e lentidão para sua eliminação. O resultado final nas imagens de realce tardio é semelhante ao notado nos tecidos necrosados do infarto agudo, com miocárdio fibrosado branco e miocárdio íntegro escuro ¹¹⁶.

1.7.3 Fibrose miocárdica em pacientes com DMD e DMB pela RMC

Com a falta de sintomas cardiológicos e as dificuldades ecocardiográficas para se detectar precocemente a cardiomiopatia na DMD e DMB, o nosso grupo demonstrou pela primeira vez que a RMC é um método capaz de diagnosticar precocemente realce tardio miocárdico, indicativo de fibrose miocárdica, em pacientes jovens, com idade inferior a 10 anos, com total ausência de sintomas cardíacos e de alterações

cardiológicas detectáveis por ecocardiograma convencional, radiografia de tórax e eletrocardiograma^{9,10}.

Embora o realce tardio miocárdico não tenha sido até o momento validado por estudo histopatológico como fibrose miocárdica na cardiomiopatia das distrofias musculares, utilizaremos no texto desta tese o termo fibrose miocárdica como sinônimo de realce tardio miocárdico pela ressonância magnética cardíaca, por motivos de facilidade de citação. Cabe ainda ressaltar que o termo fibrose miocárdica é usado na literatura atual como sinônimo de realce tardio miocárdico em outras cardiomiopatias não isquêmicas, mesmo sem a validação histopatológica. Finalmente, nosso grupo tem dados ainda não publicados confirmando esta validação histopatológica em um paciente com distrofia muscular de Becker, já falecido.

Um achado interessante é que havia injúria miocárdica (áreas de fibrose com padrão meso-epicárdico) em pacientes muito jovens. Este padrão de realce tardio miocárdico ocorreu em 89% dos segmentos com fibrose miocárdica. A fibrose foi mesocárdica em 57,8% e subepicárdica em 31,1% dos segmentos. Fibrose segmentar foi distribuída irregularmente, com segmentos laterais mais comumente envolvidos. Nos pacientes com disfunção sistólica, foi notada correlação com a extensão da fibrose nos segmentos miocárdicos, realçando a importância da fibrose no desenvolvimento da cardiomiopatia.

1.8 Tratamento

Até o momento, não existe tratamento curativo para a DMD. Entretanto, hoje nota-se ganho expressivo na sobrevida e qualidade de vida com a atuação das equipes multidisciplinares, visando o tratamento suportivo fisioterápico, nutricional, respiratório e ortopédico. As drogas mais usadas no suporte terapêutico são glicocorticóides, que são usados mais precocemente e, com a disfunção sistólica instalada, IECA e betabloqueadores³³.

1.8.1 Glicocorticóides

De acordo com orientações da Academia Americana de Neurologia, os glicocorticóides devem ser usados em todos os pacientes com DMD. Entretanto, deve haver cuidado constante com os riscos do uso prolongado destes medicamentos e avaliação do custo-benefício em relação ao seu uso. A melhor época para o início do tratamento ainda não está bem definida e a decisão deve ser individualizada, baseada no estado do comprometimento muscular e na idade dos pacientes que serão tratados¹¹⁷.

Estudos têm demonstrado que a única medicação disponível e efetiva para diminuir o declínio da força e função musculares (sintomas mais devastadores da DMD), são os glicocorticóides^{16,33,117}. O uso desta classe de medicamentos pode melhorar a função motora, reduzir o risco de

escoliose, estabilizar a função pulmonar e, indiretamente, melhorar a função cardíaca ¹⁶.

1.8.2 Drogas para envolvimento cardíaco

As drogas classicamente administradas para disfunção sistólica como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), betabloqueadores e diuréticos têm sido usadas em pacientes com DMD e DMB com disfunção sistólica instalada. Alguns estudos sugerem que a administração isolada dos IECA ou sua associação com os betabloqueadores pode atrasar o início da disfunção ventricular e melhorar a função ventricular em pacientes com DMD ^{118,119,120}. Há um consenso que recomenda o uso de IECA associado a betabloqueadores em pacientes com DMD e cardiomiopatia precoce ³³.

Estudos sugerem que em pacientes com DMD pode haver melhora da função sistólica pela administração combinada de IECA e betabloqueadores, como nas diversas cardiomiopatias ^{120,121,122}.

2 Justificativa

Tendo em vista os achados preliminares em 10 pacientes demonstrando que a RMC pode identificar precocemente fibrose miocárdica, mesmo antes da detecção de alterações por meio de outros métodos diagnósticos complementares e, associadas à sintomatologia frustra nas fases iniciais do DMD e DMB^{9,10}, julgamos oportuno ampliar os dados de fibrose miocárdica pela RMC em uma coorte maior de pacientes.

Embora o início do tratamento da cardiomiopatia nos pacientes com DMD e DMB seja baseado na queda da fração de ejeção ao ecocardiograma, sabemos, pelos nossos dados preliminares^{9,10}, que a fibrose miocárdica detectada pela RMC, indicando cardiomiopatia, pode aparecer antes que a disfunção sistólica seja detectada pelo ecocardiograma. Assim, entendemos ser justificável a investigação da hipótese de que o tratamento precoce da cardiomiopatia em pacientes com função sistólica normal e com fibrose miocárdica pela RMC possa propiciar redução das áreas de fibrose miocárdica e benefícios clínicos a estes pacientes.

Consideramos justificável investigar o potencial valor das mutações genéticas e sua relação com a fibrose miocárdica pela RMC no prognóstico e evolução da doença.

Finalmente, seria justificável também a avaliação da fibrose miocárdica pela RMC frente a outros métodos diagnósticos que tradicionalmente são usados para definir em que ponto da história natural da doença um paciente se encontra.

3 Objetivos

1. Ensaio clínico randomizado em pacientes com distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker para investigar a progressão da fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca, no período de 2 anos, em pacientes com FEVE preservada, randomizados para o tratamento ou não com inibidor da enzima conversora da angiotensina II.
2. Investigar se há mutações genéticas específicas que sejam marcadores preditivos de envolvimento cardíaco, definidos pela presença de fibrose miocárdica pela RMC.
3. Comparar os achados eletrocardiográficos, radiográficos e Doppler ecocardiográficos com a fibrose miocárdica e disfunção sistólica identificadas na RMC.

4 Métodos

4.1 Casuística

Este é um estudo prospectivo que incluiu pacientes com distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker, do sexo masculino, a partir de 06 anos de idade, para avaliação de função ventricular esquerda e fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca. Este estudo incluiu um ensaio clínico randomizado, com tempo de seguimento de 2 anos, em pacientes que apresentaram fibrose miocárdica pela técnica de realce tardio e sem disfunção sistólica na ressonância magnética cardíaca, que foram randomizados em dois grupos, um deles recebendo tratamento com IECA e o outro não. Os pacientes preencheram os critérios de inclusão e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido que, assim como todo o estudo, foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), no dia 4 de fevereiro de 2009 sob número 1095/08 e no comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais com parecer número ETIC 104/08 no dia 7 de maio de 2008.

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de DMD e DMB em acompanhamento nos Ambulatórios de Doenças Neuromusculares e Cardiologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG. O diagnóstico de DMD ou DMB foi confirmado pela presença de mutação no estudo molecular, por meio da técnica de MLPA, e/ou ausência ou diminuição da distrofina na biópsia muscular. Todos os pacientes realizaram estudo para

investigação da mutação específica no DNA. Nos pacientes com ausência de mutação, a biópsia muscular foi sempre indicada. Entre os pacientes que não apresentaram mutação no teste genético e se recusaram a realizar a biópsia muscular, foram mantidos neste estudo somente aqueles com história familiar positiva para DMD/DMB (irmão com a doença confirmada pela biópsia muscular).

Todos os pacientes foram encaminhados para avaliação cardiológica inicial, realizada por meio do exame clínico, exame radiológico de tórax, dosagem de CK e Doppler ecocardiograma em serviço especializado de cardiologia pediátrica e por um único observador com experiência de mais de 20 anos em acompanhamento de pacientes com DMD e DMB (Dra. Zilda Maria Alves Meira no ambulatório de cardiologia pediátrica da UFMG). Os pacientes realizaram também eletrocardiogramas em serviços do SUS. Após até no máximo 2 meses da realização dos exames de RX, ECG, Ecocardiograma e CK, os pacientes foram encaminhados para realizar a primeira RMC.

Todos os pacientes foram submetidos à primeira RMC, com técnicas de cine ressonância e realce tardio miocárdico, para avaliação da função contrátil ventricular (global e segmentar), detecção e quantificação de fibrose miocárdica. Durante o período de estudo, os pacientes foram seguidos clinicamente no ambulatório de cardiologia pediátrica da UFMG, com intervalo de 6 meses na avaliação se não apresentassem sintomas cardiológicos e em qualquer época, se apresentassem sintomas

cardiológicos. Após 2 anos da primeira RMC, os pacientes foram submetidos à segunda RMC com o mesmo protocolo (Figura 6).

Os pacientes com FEVE < 50% ao ecocardiograma ou à RMC foram tratados clinicamente com medicações clássicas para disfunção sistólica, a critério da cardiologista responsável pelo acompanhamento de todos os pacientes (Dra. Zilda Maria Alves Meira). Consideramos este grupo como o grupo com disfunção sistólica (grupo D), recebendo IECA – inibidores da enzima conversora da angiotensina - (enalapril na dose de 10 a 20 mg de 12/12h), Betabloqueador (carvedilol na dose de 1mg/Kg, iniciando com 3,125 mg de 12/ 12h até a atingir a dose máxima de 25 mg 12/12h) e diurético inibidor da aldosterona para pacientes com fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor que 35%, (espironolactona 25 mg uma vez ao dia).

Os pacientes com FEVE \geq 50% e com presença de fibrose miocárdica avaliada pela técnica de realce tardio da RMC, foram considerados como o grupo com ausência de disfunção sistólica (SDF) e foram randomizados em dois subgrupos (randomização 1x1).

No primeiro subgrupo os pacientes receberam todos os tratamentos necessários indicados pela sua condição clínica baseados nas diretrizes (exemplo: corticoides, tratamento fisioterápico, respiratório, etc.), porém sem qualquer tratamento para cardiomiopatia, isto é, tratamento com IECA, bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA), betabloqueadores e/ou diurético inibidor de aldosterona. Este subgrupo foi considerado com o grupo com ausência de disfunção sistólica, presença de fibrose miocárdica e não tratamento (SDF-NT).

O segundo subgrupo recebeu o mesmo tratamento básico do SDF-NT, porém associado ao tratamento específico para cardiomiopatia com IECA (enalapril). Este subgrupo foi considerado como o grupo com cardiomiopatia subclínica e com tratamento (SDF-T). Não foram utilizados outras medicações para cardiomiopatia, apenas o IECA. A dose do IECA foi titulada até a dose máxima tolerada, avaliada pela cardiologista dos pacientes (avaliação clínica e nível de pressão arterial).

O enalapril foi administrado na dose de 2,5 mg duas vezes ao dia como dose inicial nos pacientes menores de 10 anos, sendo aumentada até a dose de 5mg de 12/12h nesta faixa etária. Nos pacientes com idade entre 10 e 15 anos, a dose inicial foi de 5 mg 12/12h até atingir a dose de 10 mg de 12/12h. Nos pacientes maiores de 15 anos, a dose foi de 10 até 20 mg de 12/12h, de acordo com a tolerância. A dose foi titulada para evitar episódios de hipotensão arterial.

O grupo de pacientes assintomáticos, com FEVE $\geq 50\%$ e sem fibrose miocárdica pela RMC não recebeu tratamento para cardiomiopatia. Este grupo foi considerado com o grupo sem disfunção sistólica e sem fibrose miocárdica (SDSF).

Para avaliação dos eventos clínicos no seguimento dos pacientes, foram considerados como eventos cardiovasculares maiores: óbito cardiovascular, internação por insuficiência cardíaca, arritmia cardíaca necessitando avaliação e/ou internação, infarto miocárdico fatal ou não fatal e acidente vascular cerebral.

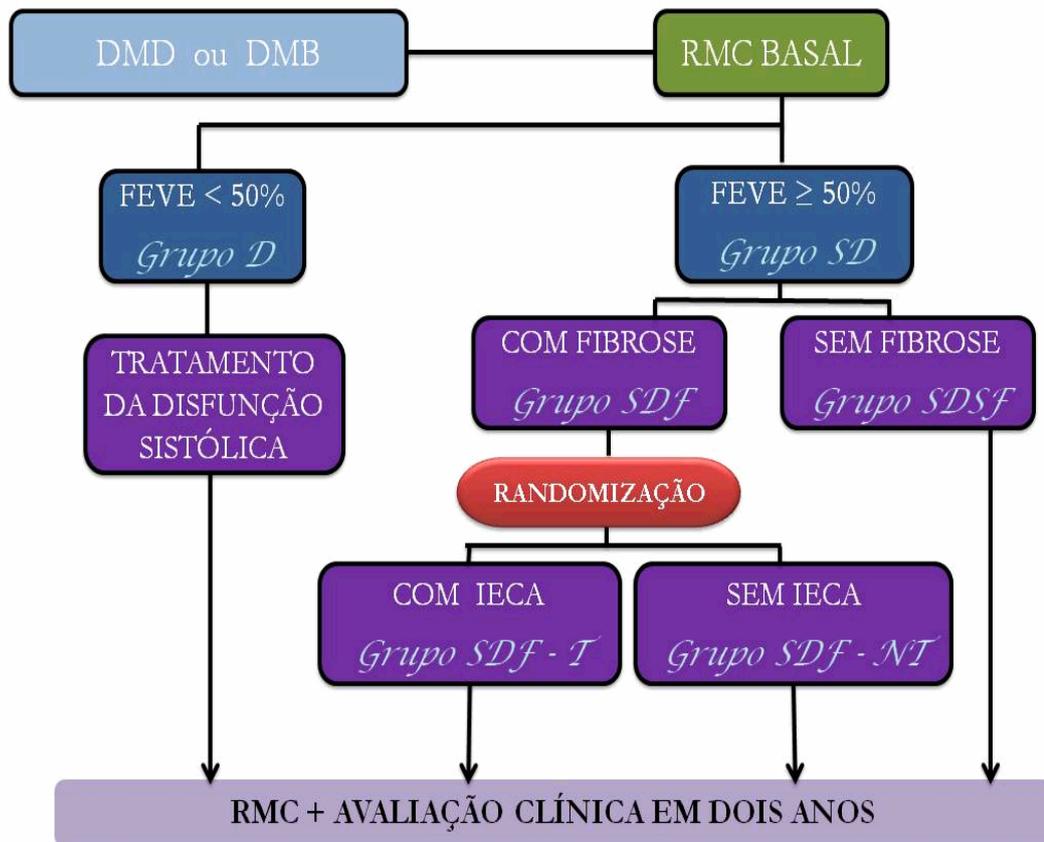


Figura 6 - Fluxograma do estudo: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker; RMC – Ressonância magnética cardíaca; Grupo D – Grupo com disfunção sistólica, Grupo SD – Grupo sem disfunção sistólica; Grupo SDSF – Grupo sem disfunção sistólica e sem fibrose miocárdica; Grupo SDF – Grupo sem disfunção sistólica e com fibrose miocárdica; SDF-NT – Grupo sem disfunção sistólica, com fibrose miocárdica e randomizado para não tratamento com IECA; SDF-T – Grupo sem disfunção sistólica, com fibrose miocárdica e randomizado para tratamento com IECA

4.2 Estudo genético

O estudo genético foi realizado a partir da coleta de 10 ml de sangue em tubo de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O material coletado foi enviado para o Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), onde foi realizada a extração de DNA e o estudo molecular (Dra. Mariz Vainzof e Dra. Mayana Zatz). Utilizou-se a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), capaz de identificar tanto deleções como duplicações dos 79 exons do gene da distrofina.

Para a realização do MLPA foi usado o Kit comercial P034-A2 / P035-A2 DMD / Becker (MRC- Holland MLPA[®]), produzido pela empresa MRC-Holland (Amsterdam, Holanda) e comercializado pela empresa Citogen no Brasil. Foi usado o protocolo fornecido pela MRC-Holland: 50 – 500 ng de DNA genômico foram diluídos em 5 µL de EDTA e foram aquecidos a 98°C por 5 minutos; em seguida foram resfriados e misturados a um conjunto de sondas em uma solução salina tampão. A mistura foi novamente aquecida a 95°C por 1 minuto e incubada a 60°C durante uma noite para uma adequada hibridização. A ligação foi realizada com a enzima ligase-65 a 54°C por 15 minutos. Em seguida, a ligase foi inativada pela incubação a 98°C por 5 minutos. Deste produto de ligação, 10 µL foram pré-misturados com 30 µL de tampão de PCR e postos em um termo ciclo a 60°C. Subsequentemente, 10 µL desta mistura foram adicionados a dNTPs, polimerases e *primers* de PCR, que são complementares à sequência universal do *primer* de MLPA. O

produto obtido foi diluído em 1:20 com água ultrapura, em seguida foi retirado 1,0 µL dessa diluição e acrescentado 9,0 µL de formamida e 0,075 µL de Size Standart GS 500 ROX (Applied Biosystems). O próximo passo foi o sequenciamento no ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems) e a análise pelo software GeneMarker® FAQ - Softgenetics. A identificação dos picos individuais correspondentes a cada exon foi baseada na diferença de migração e comparada ao tamanho padrão. A área do pico de cada fragmento foi comparada com a amostra controle. A ausência de picos de amplificação nos exons correspondentes levou ao diagnóstico de deleção nos referidos exons.

4.3 Biópsia muscular

As biópsias musculares foram abertas e obtidas na musculatura proximal, sob anestesia local. Foram colhidos 3 a 5 fragmentos de 5 x 5 mm e montados, mantendo-se a orientação transversal das fibras, em uma placa de cortiça, usando OCT-tissue Tek® como crio-protetor. As amostras foram congeladas usando nitrogênio líquido e posteriormente cortadas em criostato, em cortes de 5–6 µm de espessura. Foram realizadas as seguintes colorações histológicas e reações histoquímicas: hematoxilina-eosina, tri crômio de Gomori modificado, “oil red” O (ORO), ácido periódico de Schiff (PAS), ATPase no PH 9,4, 4,3 e 4,6, miofosforilase, esterase não específica, Tetrazolium NADH redutase, desidrogenase succínica, citocromo c-oxidase e ácida e fosfatase alcalina⁸⁰.

Para o estudo imuno-histoquímico (domínios “rod”, carboxi e amino terminal) ¹²³, as biópsias foram cortadas em seções de 4-10 micras. As seções foram descongeladas por 1 hora em temperatura ambiente e foram incubadas com o tampão PBS-H₂O₂ por 10 minutos, para neutralizar a peroxidase endógena. O tampão foi removido, inclinando a lâmina e envolvendo a seção com papel absorvente. As amostras foram então incubadas com anticorpo primário a uma diluição de 1:200 durante 60 minutos. Após a incubação, o anticorpo foi removido e as seções foram lavadas por 3 a 4 vezes, durante 10 minutos com o tampão PBS-S. As seções foram então montadas em lâminas com o reagente para fluorescência *Vectashield Mounting Medium* (Vector Labs, Burlingame CA, EUA). A análise foi feita em um microscópio óptico com epifluorescência, usando filtros específicos para a coloração.

Os exames foram realizados no Setor de Doenças Neuromusculares da Faculdade de Medicina da UFMG e no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Sarah Kubitschek (Belo Horizonte – MG). Para o estudo imuno-histoquímico da distrofina, foram empregados anticorpos monoclonais anti-mouse produzidos pela Novocastra Laboratories Ltd, NCL-DYS1, clone Dy4/6D3 para o domínio “rod”, NCL-DYS2, clone Dy8/6C5 para o domínio C-terminal e NCL-DYS3, clone Dy10/1282 para o domínio N-terminal.

4.4 Creatinofosfoquinase (CK)

Coletou-se através de punção venosa periférica, a quantidade de 3 ml de sangue venoso periférico que foi depositada em um tubo com gel para a separação do soro. Após centrifugação, pipetou-se 100 µL do soro que foi colocado em equipamento Vitros 5.1 (FS Chemistry System – Ortho-Clinical Diagnostics - Johnson & Johnson Company, New Jersey – EUA) para a realização da metodologia cinética e calorimetria.

4.5 Eletrocardiograma (ECG)

Os eletrocardiogramas de 12 derivações foram realizados de acordo com técnica padrão de registro ^{124,125}. Os eletrocardiogramas foram realizados previamente, conforme rotina no ambulatório de cardiologia, de 2 em 2 anos, no Sistema Único de Saúde.

4.6 Radiografia de tórax (RX)

O estudo radiológico de tórax foi realizado nas incidências em pósterio-anterior e perfil esquerdo conforme técnica padrão ^{126,127}. A análise das dimensões cardíacas foi realizada por meio da avaliação do índice cardiotorácico (ICT), considerando ICT > 0,50 como valor alterado. Houve também avaliação isolada de cada câmara cardíaca visando detectar dilatação.

4.7 Ecocardiograma (ECO)

Para a realização dos exames Doppler ecocardiográficos com estudo de fluxo a cores foi utilizado equipamento da ATL, modelo HDI 5000, dotado dos modos unidimensional, bidimensional, Doppler pulsado, contínuo e mapeamento de fluxo em cores, com transdutores de 5 ou 2,5 MHz, eletrônicos e multifrequenciais. Utilizou-se a técnica tradicional de exames ecocardiográficos geral e pediátrico ¹²⁸, com realização de análise sequencial e pesquisa de malformações congênitas. Foram realizadas mensurações dos diâmetros diastólicos do ventrículo esquerdo, das espessuras diastólicas do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo, assim com o diâmetro sistólico desse ventrículo. A partir dessas medidas e utilizando-se o sistema de cálculos automáticos do equipamento, foram calculados os parâmetros ecocardiográficos para avaliação da função sistólica ventricular esquerda, o percentual de encurtamento sistólico e a fração de ejeção, utilizando-se as fórmulas de Teichholz ^{129,130} e Simpson modificado ¹³¹. A massa ventricular esquerda também foi obtida por meio de cálculos automáticos do equipamento, utilizando a diferença do volume epicárdico menos o volume endocárdico, multiplicado pela densidade do miocárdico, com massa específica de 1,05 g/ml.

4.8 Ressonância magnética cardíaca (RMC)

As ressonâncias magnéticas cardíacas foram realizadas na Axial Centro de Imagem em Belo Horizonte, MG, utilizando um equipamento de ressonância Magnetom Avanto de 1,5 T (Siemens, Erlangen, Germany), equipado com sistema de gradientes com intensidade de 45 mT/m e taxa de ascensão (*slew rate*) de 200 T/ms. Usou-se bobina de superfície, projetada para exames cardíacos, de 4 elementos.

Os exames foram realizados com sincronização eletrocardiográfica retrospectiva, acoplando-se quatro eletrodos na parede anterior do hemitórax esquerdo. Todas as imagens foram adquiridas em pausa expiratória, visando minimizar os artefatos provenientes de movimentos respiratórios. Para a localização do coração, foram realizadas aquisições nos três planos ortogonais (transversal, sagital e coronal) usando-se sequência convencional de gradiente-eco. As sequências de cine ressonância e de realce tardio foram planejadas a partir destas imagens localizadoras e adquiridas exatamente nos mesmos planos de eixo curto e longo do VE, permitindo uma comparação precisa entre a função do ventrículo esquerdo e a estrutura miocárdica.

4.8.1 Cine ressonância

A aquisição de imagens dinâmicas, visando estudar os aspectos funcionais e morfológicos do coração, foi realizada por meio da técnica de

cine ressonância com uso da sequência de gradiente eco, com precessão livre e em estado de equilíbrio, SSFP (steady-state free precession) ^{132,133,134}.

As imagens foram adquiridas em eixos vertical (curto) e longitudinal (longo), com vários cortes axiais cobrindo ambos os ventrículos. Os cortes de eixo curto foram adquiridos com 8 mm de espessura e 2 mm de intervalo, em número de 8 a 14, visando cobrir toda a extensão do ventrículo esquerdo. Os cortes em eixo longo foram planejados a partir de imagens do eixo curto, com 8 mm de espessura e intervalos radiais de 45 graus, sendo 2 em duas câmaras, 1 em quatro câmaras e outro em três câmaras cobrindo a via de saída do ventrículo esquerdo. As dimensões de cada voxel foram, em média, 1,7 x 2,0 x 8,0 mm. Os principais parâmetros desta sequência estão descritos na Tabela 2.

4.8.2 Realce tardio miocárdico (RTM)

O realce tardio foi empregado para a avaliação das regiões acometidas por fibrose miocárdica. Usou-se uma sequência específica de gradiente-eco rápida, com pulso preparatório de inversão-recuperação ¹¹². As imagens foram adquiridas 10 a 20 minutos após a injeção endovenosa de contraste baseado no gadolínio – 0,4 ml/kg (gadoversetamida, OptiMark®, Covidien Deutschland GmbH, Neustadt – Alemanha). O tempo de inversão foi ajustado visando anular o sinal do miocárdio normal e sem fibrose. Os planos de corte foram prescritos usando as mesmas marcações da cine-

ressonância. As dimensões de cada voxel foram, em média, de 1,3 x 1,7 x 8,0 mm. Os principais parâmetros desta sequência estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais parâmetros das sequências de ressonância magnética cardíaca

Parâmetro	Cine-ressonância	Realce tardio
Matriz (pixel)	192 X 162	256 X 192
Campo de visão (cm)	300 a 420	300 a 420
Tempo de repetição (ms)	2 – 4	6 – 9
Tempo de eco (ms)	1,07 – 1,16	1 – 5
Largura de banda (Hz/pixel)	930-970	140-150
<i>Flip angle</i>	69 a 74	50
Número de excitações	1	1
Número de fases	20 a 30	-
Tempo de inversão (ms)	-	150 a 390 para 1 RR

4.8.3 Análise das imagens de ressonância magnética

As imagens adquiridas em todos os pacientes foram armazenadas em discos rígido, no formato DICOM (*Digital Imaging Communications in Medicine*) e enviados para o laboratório central de análise de RMC (CoreLab-RMC) do InCor – HC FMUSP, sob coordenação do Prof. Dr. Carlos E. Rochitte. Análises qualitativas e quantitativas da cine-ressonância

e do realce tardio foram realizadas de forma cega e independente entre si. Todas as análises qualitativas e a análise quantitativa da cine-ressonância foram realizadas por um observador sem o conhecimento do tratamento recebido pelos pacientes (Dra. Marly Silva). A análise do realce tardio para avaliação da quantidade de fibrose miocárdica foi realizada por 2 observadores independentes e cegos aos outros dados dos pacientes (Dr. Carlos Henrique Rassi e Prof. Dr. Carlos E. Rochitte).

4.8.3.1 Análise das imagens de cine ressonância

Para a análise das imagens dinâmicas da cine ressonância, utilizou-se a *workstation* Leonardo, usando-se o *software* customizado Argus (Siemens Healthcare). Foi utilizado o método volumétrico de Simpson em todos os cortes de eixo curto cobrindo todo o ventrículo esquerdo. A fração de ejeção foi avaliada por meio de planimetria das bordas endocárdicas do ventrículo esquerdo, nas fases diastólica final (maior cavidade) e sistólica final (menor cavidade). O valor maior ou igual a 50% foi usado como corte para fração de ejeção normal. As dimensões diastólicas e sistólicas finais foram realizadas em eixo curto, no nível imediatamente abaixo do plano mitral, medindo-se a distância entre a região septal medial e a parede lateral medial^{135,136,137}.

Para a avaliação da contratilidade segmentar do ventrículo esquerdo, as imagens do eixo curto foram divididas em 17 segmentos de acordo com *American Heart Association (AHA)*¹³⁸ (Figura 7).

4.8.3.2 Análise das imagens de realce tardio

As imagens foram avaliadas seguindo as diretrizes propostas pela AHA, com divisão em 17 segmentos (Figura 7). A planimetria da área de realce tardio foi realizada em cada segmento, usando software específico para a obtenção da massa de fibrose. As imagens foram analisadas de forma consensual por dois observadores experientes em RMC e com auxílio do software CMR42 (*Cardiac Magnetic Resonance*), versão 3.4.2 (92) da empresa Circle Cardiovascular Imaging (Calgary, Alberta, Canadá). Primeiramente, foram delimitados os contornos endocárdicos e epicárdicos do eixo curto do VE na sequência de realce tardio miocárdico. Em seguida, foi feita a análise quantitativa e semi-automática da fibrose miocárdica utilizando duas técnicas distintas de limiar (*threshold*).

A primeira foi uma técnica de limiar (*threshold*) utilizando desvios padrões, na qual utilizamos o miocárdio normal como sendo a nossa referência (região de interesse - ROI) para cálculo da média e desvio padrão dos valores de intensidade de sinal do miocárdio normal. Em seguida, o software quantifica os pixels com valores acima de 3, 5 ou 6 desvios padrões da média do miocárdio normal, o que é então considerado como fibrose miocárdica.

A segunda técnica utilizou o limiar do *Full Width at Half Maximum* (Largura à Meia Altura ou Largura Completa na Metade do Máximo), na qual utilizamos a fibrose miocárdica como a nossa referência (região de interesse – ROI), sendo construído um histograma com a dispersão dos valores da

intensidade de sinal dos pixels da fibrose. Valores acima deste limiar foram considerados como fibrose miocárdica .

A área de fibrose em centímetros quadrados foi calculada com base na região de interesse fornecida pelo *software* baseado em cada um dos algoritmos acima e em cada um dos cortes de eixo curto do VE. Esta área foi então multiplicada pela espessura do corte da imagem de RMC fornecendo o volume de fibrose em centímetros cúbicos ou mililitros. A massa de fibrose em gramas (g) foi calculada pela multiplicação do volume de fibrose pela densidade do tecido em questão ($\text{massa} = \text{volume} \times \text{densidade}$), sendo a densidade do miocárdio considerada como 1,05 g/ml.

A fim de assegurar a real existência das áreas de realce tardio e diferenciá-las de possíveis artefatos, os achados das imagens em eixo curto do VE foram confirmados nas imagens de eixo longo do VE, quando alguma imagem era questionável. Neste caso, as imagens consideradas como artefatos foram excluídas da quantificação com uma ferramenta específica para tal fim, disponível no *software* CMR42. As alterações no apex do VE (segmento 17) não foram utilizadas na quantificação da massa de fibrose miocárdica.

O padrão de fibrose foi avaliado de acordo com o seguinte escore: 0 = ausente 1 = subendocárdico, 2 = mesocárdico, 2 = epicárdico e 3 = transmural.

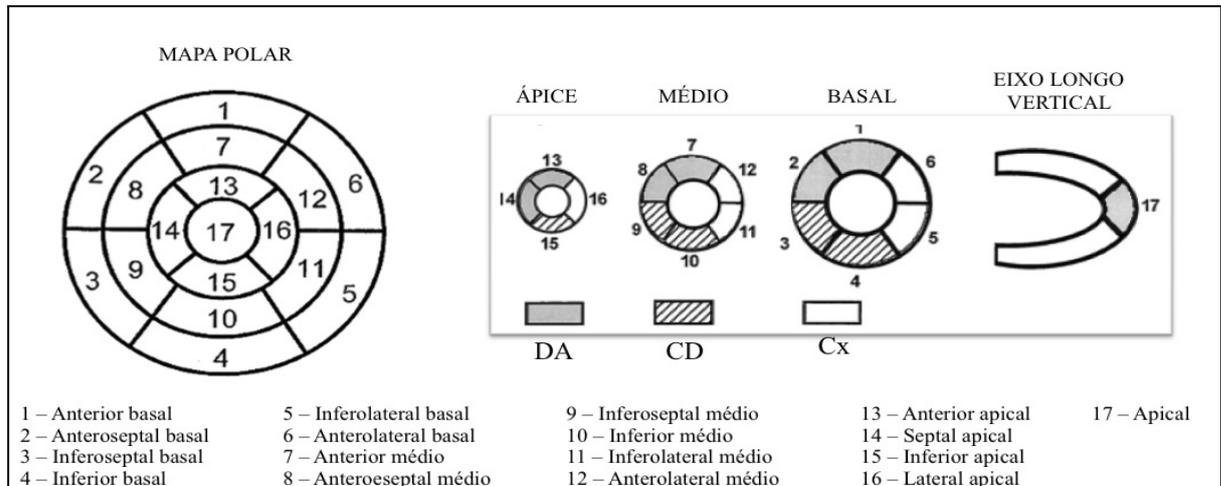


Figura 7 - Mapa polar representativo da divisão miocárdica em 17 segmentos com as respectivas nomenclaturas, recomendado para uso em imagens cardíacas proposto pela AHA¹³⁸

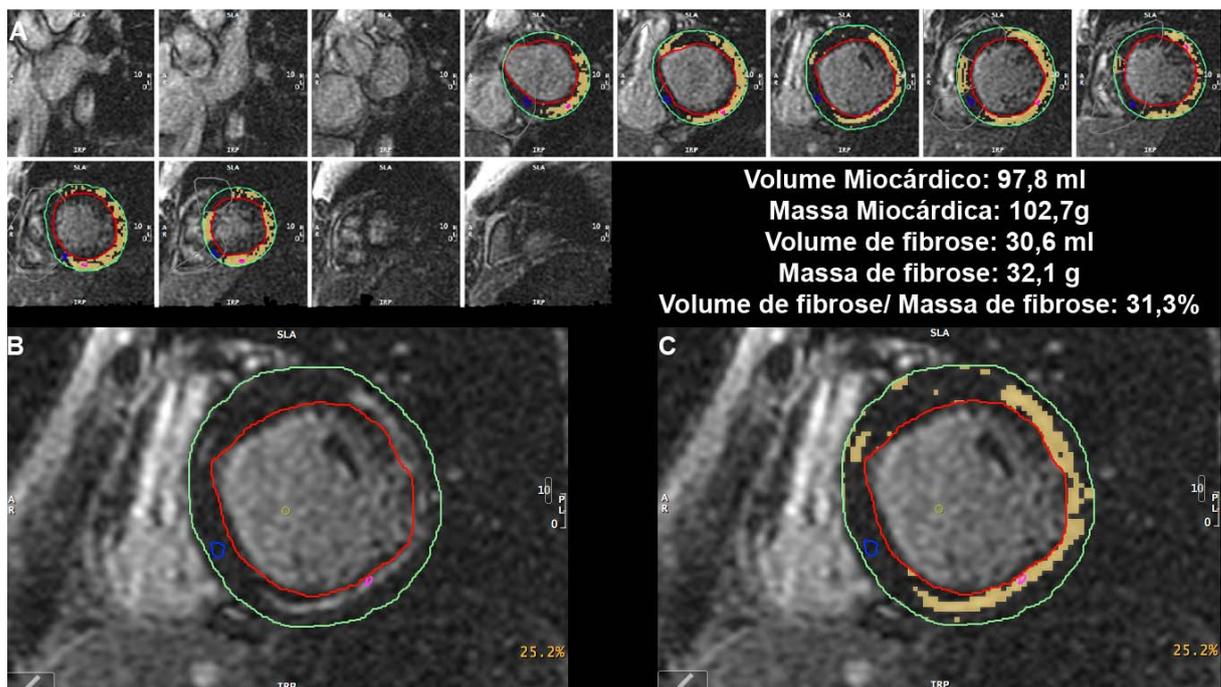


Figura 8 - Imagens de quantificação da fibrose miocárdica avaliada pela ressonância magnética analisadas através do *software* CMR42, versão 3.4.2 da empresa Circle Cardiovascular Imaging (Calgary, Alberta, Canadá)

4.9 Análise estatística

Os resultados descritivos foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características das diversas variáveis categóricas e da obtenção de média e desvio-padrão para as variáveis contínuas. As distribuições das variáveis contínuas foram avaliadas quanto a sua normalidade pelo teste de *skewness-kurtosis*.

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para avaliar a diferença das variáveis contínuas segundo os grupos de comparação. Para verificar a associação entre variáveis categóricas independentes utilizou-se o teste Qui-quadrado de Pearson. Para comparação das características da fibrose miocárdica segundo faixa etária utilizou-se o teste de Kruskal e para comparações múltiplas o método de Bonferroni.

Para comparação de proporções e de médias obtidas no exame basal de RMC e no exame de seguimento 2 anos após utilizou-se, respectivamente, o teste de McNemar e teste Wilcoxon, que considera que os dados foram coletados de forma pareada.

A relação entre variáveis contínuas foi verificada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Para avaliar os fatores preditores da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e a fibrose miocárdica foram feitas análises de regressão multivariada logística e linear.

Foram calculados a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos métodos tradicionais de diagnóstico de distrofia muscular progressiva (radiografia de tórax, eletrocardiograma e

ecocardiograma), considerando ao menos um dos exames alterados, em relação ao método de diagnóstico de ressonância magnética cardíaca.

O método de Kaplan-Meier foi aplicado nas análises de sobrevida.

Para as comparações das variáveis da RMC basal considerou-se o número de observações igual a 76 e para RMC seguimento de 74 observações, uma vez que dois pacientes evoluíram para o óbito antes que fossem realizadas as medidas no exame de seguimento 2 anos após.

As análises foram realizadas com o auxílio do programa de análises estatísticas STATA, versão 10.0 (StataCorp LP, College Station, TX, EUA). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Características clínicas dos pacientes

Foram incluídos 76 pacientes, sendo 70 pacientes com DMD e 6 com DMB. A idade média foi de $13,1 \pm 4,4$ anos. O índice de massa corporal foi de $19,6 \pm 4,4$ kg/m². Do total de pacientes, 43 (56,6%) realizaram biópsia muscular (Figuras 9 e 10) e 49 (64,5%) apresentaram mutação no exame de DNA. Quarenta e nove (64,5%) pacientes estavam em uso de cadeira de rodas com idade de $11,1 \pm 2,3$ anos. Os pacientes realizaram duas RMCs com intervalo médio de $2,05 \pm 0,11$ anos (mínimo de 1,9 anos e máximo de 2,5 anos) seguindo o mesmo protocolo. Os pacientes não foram classificados pela classe funcional devido a ausência de sintomas até mesmo em fase mais avançadas do acometimento cardíaco. As características clínicas dos pacientes estão descritas na Tabela 3 e no apêndice.

Os pacientes com disfunção sistólica (grupo D) apresentaram uma maior idade média ($19,2 \pm 3,9$ anos; $p < 0,001$), maior IMC ($23,0 \pm 4,1$ kg/m²; $p < 0,001$) e fizeram uso de cadeira de rodas com maior frequência (84,6%; $p = 0,008$) do que os pacientes sem fibrose e com ausência de disfunção sistólica (SDSF). O grupo randomizado com fibrose e tratado (SDF-T) apresentou maior idade média ($13,1 \pm 2,7$ anos; $p = 0,014$) e maior IMC ($20,3 \pm 3,8$ kg/m²; $p = 0,029$), entretanto há semelhança na proporção de pacientes

que fizeram uso de cadeira de rodas, em comparação com o grupo randomizado com fibrose e não tratado (SDF-NT).

Em relação à distribuição da idade em faixas etárias segundo os grupos de comparação, verifica-se que o grupo com disfunção sistólica está na faixa etária superior a 14 anos, sendo que 69,2% destes pacientes (fibrose e FEVE < 50%) estão em faixa etária superior a 17 anos. Os pacientes do grupo que não apresentou cardiomiopatia são mais jovens, sendo que 76,2% estão na faixa etária de 6 e 12 anos. Já entre o grupo randomizado (com fibrose e FEVE > 50%) verifica-se que a maioria dos pacientes está na faixa etária inferior a 15 anos (95,2%) entre os não tratados e 61,9% entre os tratados.

Pacientes com disfunção sistólica apresentaram, em média, menores medidas de CK do que os pacientes do grupo com ausência de disfunção sistólica e sem fibrose e os do grupo randomizado com fibrose tratado.

O eletrocardiograma foi alterado em 32 pacientes (42,1%), estando 11 no grupo com disfunção sistólica na RMC basal e 6 no grupo com ausência de sinais de comprometimento cardíaco (sem disfunção sistólica e sem fibrose) na RMC basal. Na comparação entre estes dois grupos, nota-se diferença significativa ($p=0,001$). No grupo randomizado com fibrose e não tratado, 7 pacientes apresentaram ECG alterado. No grupo randomizado com fibrose e tratado, 8 pacientes apresentaram alterações no ECG. Na comparação entre estes dois grupos não há diferença significativa ($p=0,747$).

Do total de pacientes, 13 (17,1%) apresentaram arritmia como queixa clínica, estando 6 no grupo com disfunção sistólica, 2 no grupo com

ausência de sinais de comprometimento cardíaco, 2 no grupo randomizado não tratado e três no grupo randomizado tratado. Na comparação entre estes dois grupos, nota-se diferença significativa ($p=0,014$). Na comparação entre os dois grupos randomizados, não há diferença ($p=0,634$).

A radiografia de tórax apresentou índice cardiotorácico superior a 0,5 em 6 pacientes (7,9%), estando todos os pacientes no grupo com disfunção sistólica. Na comparação entre o grupo com disfunção sistólica e o grupo sem fibrose e sem disfunção sistólica nota-se diferença significativa ($p=0,001$).

O ecocardiograma bidimensional com Doppler colorido foi alterado (fração de ejeção menor que 50%) em 12 pacientes, todos do grupo com disfunção sistólica pela RMC basal.

A avaliação conjunta dos pacientes por métodos tradicionais, (radiografia de tórax, eletrocardiograma e ecocardiograma), considerando ao menos um dos exames alterados, apresentou baixa sensibilidade (47,3%) e baixo valor preditivo negativo (34,1%) para a detecção de pacientes com envolvimento miocárdico definido pela presença de realce tardio miocárdico na ressonância magnética cardíaca (Tabela 5).

Quanto ao uso de esteroides (glicocorticóides) não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,721$). No grupo randomizado com fibrose e não tratado, 16 pacientes usaram glicocorticóides e no grupo randomizado com fibrose e tratado, 14 pacientes usaram glicocorticóide. Não há diferença significativa na comparação entre estes dois grupos ($p= 0,495$).

Durante o período deste estudo, 8 (10,5 %) pacientes sofreram eventos cardiovasculares, como dispneia e taquicardia, estando 6 pacientes no grupo com disfunção sistólica e 2 no grupo randomizado e não tratado e um no grupo randomizado e tratado. Na comparação entre o grupo com disfunção sistólica e o grupo sem disfunção sistólica e sem fibrose, há diferença significativa ($p = 0,003$). Na comparação entre os dois grupos randomizados houve semelhança. Observou-se, ainda, que 4 pacientes (5,3%) foram a óbito, estando 3 no grupo com disfunção sistólica e 1 no grupo randomizado com fibrose e tratado.

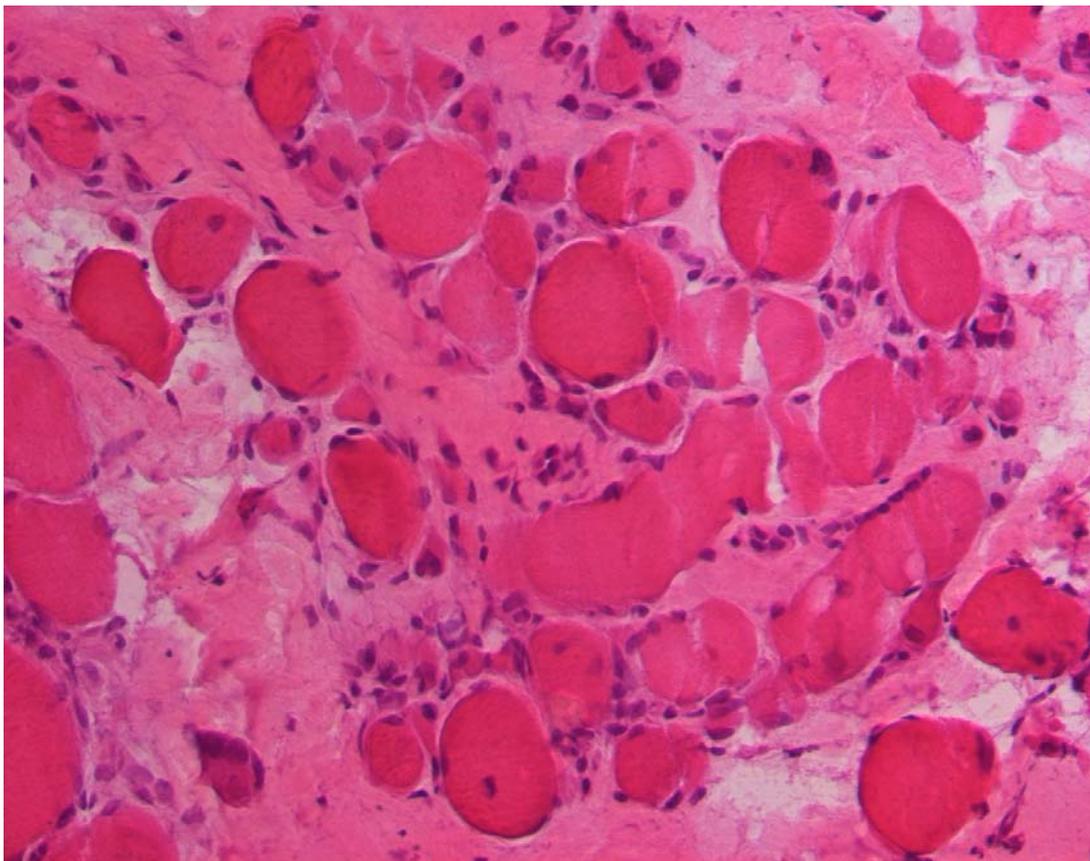


Figura 9 - Histoquímica muscular do paciente número 33 – HE (20x): tecido muscular com acentuada variação no calibre das fibras, fibrose endomisial, necrose e regeneração de fibras
Imagens gentilmente cedidas por Dra. Júlia Filarei de Oliveira Paim – patologista cirúrgica do laboratório de patologia clínica do Hospital Sarah Kubitschek, Belo Horizonte, MG.

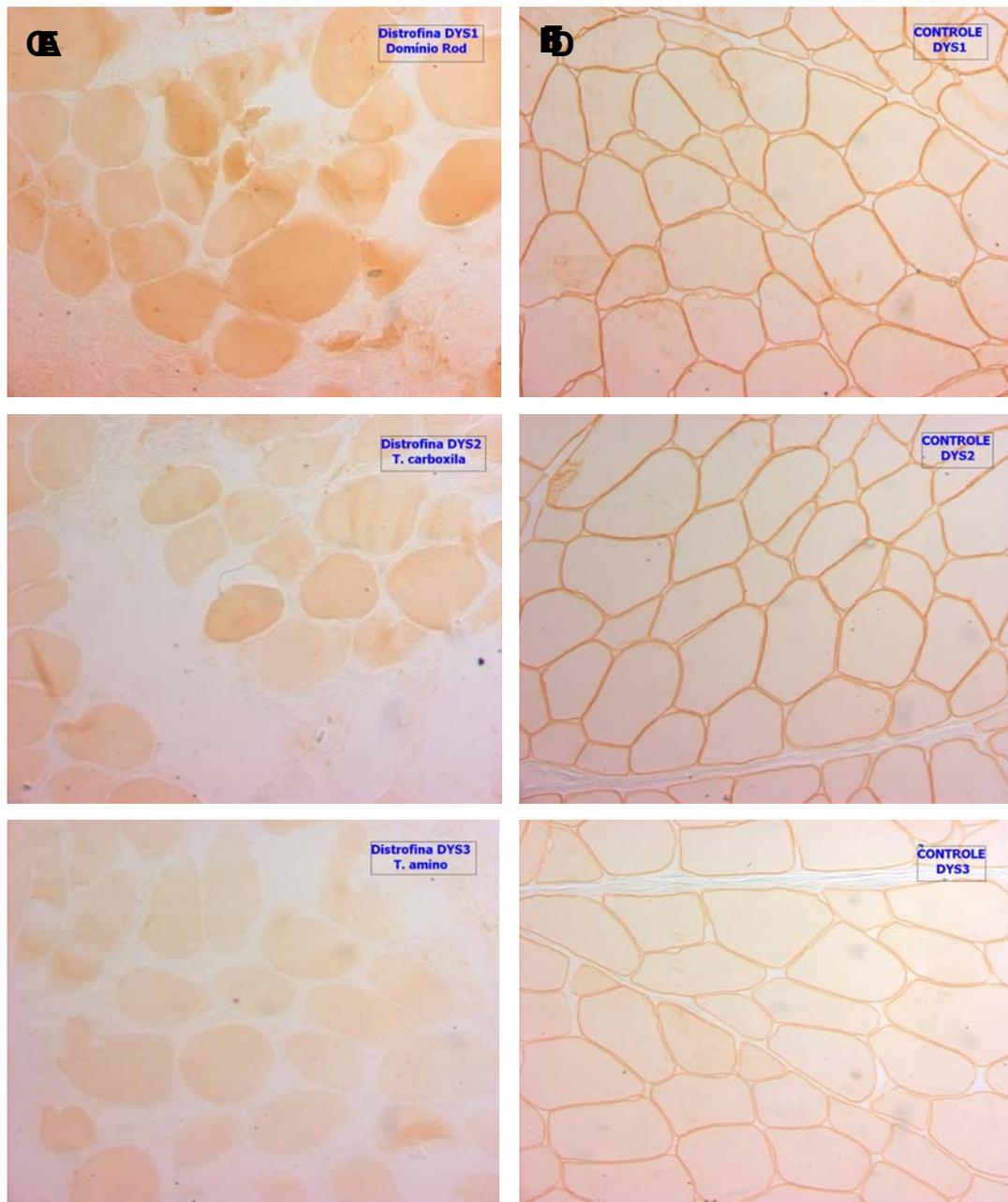


Figura 10 - Imuno-histoquímica de amostras de músculo do paciente número 33 com distrofia de Duchenne (A, C e E) e controles (B, D e F) em aumento de 20x. Distrofina DYS1 Domínio Rod: negativo (A) e controle DYS1(B). Distrofina DYS2 Terminal carboxila: negativo (C) e controle (D). Distrofina DYS3 Terminal amino: negativo (E) e controle (F)
Imagens gentilmente cedidas por Dra. Júlia Filardi de Oliveira Paim – patologista cirúrgica do laboratório de patologia clínica do Hospital Sarah Kubitschek, Belo Horizonte, MG.

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes segundo os grupos D (disfunção sistólica), SDSF (sem disfunção sistólica e sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado)

Características	Geral n=76	D n=13	SDSF n=21	SDF-NT n=21	SDF-T n=21	p ¹	p ²	p ³
Idade (anos)	13,1 ± 4,4	19,2 ± 3,9	11,2 ± 4,2	11,1 ± 2,3	13,1 ± 2,7	<0,001	0,014	<0,001
Faixa etária								
6 a 9 anos	18 (23,7%)	0 (0,0%)	8 (38,1%)	7 (33,3%)	3 (14,3%)	<0,001	0,111	0,001
10 a 12 anos	20 (26,3%)	0 (0,0%)	8 (38,1%)	7 (33,3%)	5 (23,8%)			
13 a 14 anos	13 (17,1%)	0 (0,0%)	2 (9,5%)	6 (28,6%)	5 (23,8%)			
15 a 16 anos	13 (17,11%)	4 (30,8%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	7 (33,3%)			
17 a 28 anos	12 (15,8%)	9 (69,2%)	2 (9,5%)	0 (0,0%)	1 (4,8%)			
Peso (kg)	45,6 ± 16,4	63,7 ± 11,6	38,6 ± 16,1	37,8 ± 12,6	49,3 ± 12,9	<0,001	0,006	0,011
Altura (m)	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	<0,001	0,031	0,013
IMC (kg/m ²)	19,6 ± 4,4	23,0 ± 4,1	18,9 ± 4,8	17,7 ± 3,5	20,3 ± 3,8	0,012	0,029	0,132
CK (UI)	10035 ± 7305	2682 ± 2603	15077 ± 8005	10778 ± 6778	8802 ± 4693	<0,001	0,521	<0,001
Biópsia muscular	43 (56,6%)	9 (69,2%)	9 (42,9%)	12 (57,1%)	13 (61,9%)	0,134	0,753	0,664
DNA	49 (64,5%)	11 (84,6%)	17 (80,9%)	11 (52,4%)	10 (47,6%)	0,785	0,758	0,031
Duchenne	70 (92,1%)	11 (84,6%)	20 (95,2%)	20 (95,2%)	19 (90,5%)	0,289	0,549	0,606
Becker	6 (7,9%)	2 (15,4%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)			
Usa cadeira de rodas	49 (64,5%)	11 (84,6%)	8 (38,1%)	14 (66,7%)	16 (76,2%)	0,008	0,495	0,555
Idade cadeira de rodas (anos)	11,1 ± 2,3	12,4 ± 2,5	11,1 ± 2,2	10,5 ± 1,4	10,8 ± 2,6	0,243	1,000	0,122
ECG (anormal)	31 (40,8%)	11 (84,6%)	6 (28,6%)	7 (33,3%)	7 (33,3%)	0,001	1,000	0,004
Raio X (anormal)	6 (7,9%)	6 (46,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,001	-	0,001
ECO (anormal)	12 (15,78%)	12 (92,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	<0,001	-	<0,001
Arritmia (sim)	13 (17,1%)	6 (46,1%)	2 (9,5%)	2 (9,5%)	3 (14,3%)	0,014	0,634	0,041
Uso de esteroides	52 (68,4%)	8 (61,5%)	14 (66,7%)	16 (76,2%)	14 (66,7%)	0,721	0,495	0,761
Fibrose RMC basal	55 (72,4%)	13 (100,0%)	0 (0,0%)	21 (100,0%)	21 (100,0%)	<0,001	-	-
Fibrose RMC seguimento	55 (74,3%)	11 (100,0%)	2 (9,5%)	21 (100,0%)	21 (100,0%)	-	-	-
Eventos cardiovasculares	8 (10,5%)	5 (35,7%)	0 (0,0%)	2 (9,5%)	1 (4,8%)	0,003	1,000	0,012
Óbito	4 (5,3%)	3 (23,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (4,8%)	0,021	0,311	0,107

Legenda: Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson; ¹ Comparação D versus SDSF; ² Comparação SDF-NT versus SDF-T; ³ Comparação D versus SDF-T.

Tabela 4 - Características clínicas dos pacientes segundo os grupos D (disfunção sistólica), SDSF (sem disfunção sistólica e sem fibrose), SDF-NT(randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado) (continuação)

Características	Geral n=76	D n=13	SDSF n=21	SDF-NT n=21	SDF-T n=21	p ¹	p ²	p ³
Medicamento								
Faz uso de medicamento								
Nenhum	42 (55,2%)	0 (0,0%)	21 (100,0)	21 (100,0%)	0 (0,0%)	-	-	-
Um	24 (31,6%)	3 (23,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	21 (100,0%)			
Dois	6 (7,9%)	46 (46,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)			
Três	4 (5,3%)	4 (30,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)			
Tipo de medicamento								
Enalapril	34 (44,7%)	13 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	21 (100,0%)	-	-	-
Dose de Enalapril (mg)	11,5 ± 5,6	15,8 ± 5,7	-	-	8,8 ± 3,5	-	-	-
Carvedilol	10 (13,2%)	10 (76,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	-	-	-
Dose de Carvedilol (mg)	21,2 ± 6,0	21,2 ± 6,0	-	-	-	-	-	-
Espironolactona*	4 (5,3%)	4 (30,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	-	-	-
Nº dias dos exames p/ RMC								
CK	20,0 ± 10,4	15,5 ± 6,9	22,0 ± 13,6	18,8 ± 6,3	21,9 ± 10,8	0,002	0,380	0,002
ECG	23,1 ± 9,5	17,8 ± 4,8	25,3 ± 7,0	22,1 ± 9,3	25,3 ± 7,0	0,002	0,635	0,045
Raio X	23,3 ± 10,0	18,0 ± 5,0	25,9 ± 8,1	22,4 ± 10,1	24,7 ± 12,9	0,003	0,644	0,084
ECO	23,7 ± 8,7	20,0 ± 6,0	26,7 ± 9,3	22,1 ± 8,8	24,6 ± 8,9	0,017	0,403	0,140

Legenda: Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson; ¹ Comparação D versus SDSF; ² Comparação SDF-NT versus SDF-T; ³ Comparação D versus SDF-T; * Espironolactona - mesma dose (25mg) para todos os pacientes que receberam este medicamento.

Tabela 5 - Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo dos métodos tradicionais de diagnóstico de distrofia muscular progressiva em relação ao método de diagnóstico por ressonância magnética cardíaca

Medida	
Sensibilidade (IC 95%)	47,3% (36,0% – 58,5%)
Especificidade (IC 95%)	71,4% (61,3% – 81,6%)
Valor Preditivo Positivo (IC 95%)	81,2% (72,5% – 90,0%)
Valor Preditivo Negativo (IC 95%)	34,1% (23,4% – 44,7%)

5.2 Avaliação morfofuncional

Na comparação entre os grupos com disfunção sistólica e ausência de disfunção sistólica mas com fibrose, verificou-se que o ventrículo esquerdo avaliado pelo ecocardiograma apresentou fração de ejeção média menor e cavidades maiores no grupo com disfunção sistólica (Tabela 6). A ressonância magnética basal mostrou resultados semelhantes nesta comparação (Tabela 6).

Na comparação entre os grupos com fibrose randomizados não tratados e tratados, a função e as dimensões do VE não foram diferentes pela ressonância magnética basal. Apesar da randomização, a massa e o volume de fibrose miocárdica foram significativamente maiores no grupo tratado. Porém, quando normalizado para a massa do VE, não houve diferença significativa (Tabela 6).

Nenhum paciente apresentou alteração de contratilidade segmentar ao ecocardiograma. No entanto, pela RMC basal, 52,6% (40 pacientes) de

todos os pacientes apresentaram alteração de contratilidade segmentar. Todos os pacientes (13) do grupo D apresentaram alteração de contratilidade segmentar contra nenhum paciente no grupo SDSF. Na comparação entre os grupos com fibrose randomizados, não houve diferença significativa, (Tabela 6).

Tabela 6 - Características morfofuncionais pelo ecocardiograma e RMC basal nos grupos D (disfunção sistólica), SDSF (sem disfunção sistólica sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado)

Características	Geral n=76	D n=13	SDSF n=21	SDF-NT n=21	SDF-T n=21	p ¹	p ²	p ³
ECOCARDIOGRAMA								
FEVE (%)	60,2 ± 11,3	40,6 ± 11,0	65,0 ± 4,3	66,5 ± 4,9	61,4 ± 6,6	<0,001	0,009	<0,001
IVDF (ml/m ²)	61,5 ± 26,2	89,9 ± 43,2	52,5 ± 13,6	56,3 ± 14,0	58,2 ± 20,7	<0,001	0,969	0,008
IVSF (ml/m ²)	26,4 ± 23,1	56,8 ± 41,3	18,5 ± 6,2	18,5 ± 5,1	23,4 ± 13,3	<0,001	0,371	0,001
Índice MASSA (g/m ²)	64,3 ± 32,0	104,9 ± 50,1	51,3 ± 15,4	57,6 ± 14,8	58,7 ± 23,1	<0,001	0,772	0,001
DDF (mm)	42,4 ± 8,6	55,1 ± 11,4	37,7 ± 4,4	39,2 ± 3,3	42,4 ± 5,7	<0,001	0,026	<0,001
DSF (mm)	29,1 ± 9,5	44,4 ± 12,8	24,4 ± 3,4	24,7 ± 2,3	28,5 ± 5,6	<0,001	0,006	<0,001
PPVE (mm)	6,6 ± 1,5	8,3 ± 1,9	5,8 ± 1,1	6,4 ± 1,2	6,5 ± 1,1	<0,001	0,345	0,003
SIV (mm)	6,6 ± 1,4	8,1 ± 2,0	6,0 ± 0,9	6,3 ± 1,1	6,4 ± 1,0	0,001	0,504	0,004
RMC BASAL								
FEVE (%)	54,5 ± 10,3	36,4 ± 9,6	59,3 ± 4,2	58,8 ± 4,8	56,7 ± 6,3	<0,001	0,244	<0,001
IVDF (ml/m ²)	70,7 ± 32,7	110,5 ± 55,1	59,6 ± 16,6	62,5 ± 14,9	65,5 ± 21,0	<0,001	0,606	<0,001
IVSF (ml/m ²)	33,8 ± 28,1	73,7 ± 50,6	23,6 ± 5,2	25,8 ± 7,6	27,4 ± 10,1	<0,001	0,551	<0,001
Índice MASSA (g/m ²)	58,4 ± 21,7	75,6 ± 29,9	46,6 ± 14,6	53,8 ± 13,7	64,2 ± 20,7	0,002	0,072	0,249
DDF (mm)	43,8 ± 9,3	57,1 ± 13,0	39,1 ± 4,7	41,0 ± 3,7	43,1 ± 6,5	<0,001	0,495	<0,001
DSF (mm)	31,8 ± 10,4	49,1 ± 12,8	26,2 ± 3,6	28,3 ± 3,8	30,2 ± 6,4	<0,001	0,553	<0,001
PPVE (mm)	7,1 ± 1,6	8,4 ± 1,0	6,4 ± 1,6	6,5 ± 1,2	7,6 ± 1,5	0,001	0,011	0,123
SIV (mm)	7,2 ± 1,2	9,1 ± 1,2	6,3 ± 1,6	6,4 ± 1,2	7,7 ± 1,8	<0,001	0,008	0,020
Nº de segmentos com fibrose	3,9 ± 3,3	7,5 ± 2,9	0,0 ± 0,0	4,5 ± 2,1	4,8 ± 2,5	<0,001	0,849	0,007
Alteração de contratilidade	40 (52,6%)	13 (100,0%)	0 (0,0%)	12 (57,1%)	15 (71,4%)	<0,001	0,334	0,034
Nº de segmentos contratilidade	3,5 ± 5,8	14,8 ± 5,3	0,0 ± 0,0	1,3 ± 1,3	2,0 ± 1,8	<0,001	0,189	<0,001
Massa de fibrose (g)	12,3 ± 13,5	30,0 ± 14,9	0,0 ± 0,0	8,7 ± 5,6	17,2 ± 10,8	<0,001	0,003	0,022
Volume de fibrose (ml)	11,9 ± 12,9	28,9 ± 14,1	0,0 ± 0,0	8,4 ± 5,4	16,5 ± 10,3	<0,001	0,003	0,017
Percentual de fibrose (%)	21,2 ± 17,3	32,5 ± 9,2	0,0 ± 0,0	23,8 ± 13,6	32,8 ± 13,7	<0,001	0,061	0,873

Legenda: Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson; ¹ Comparação D versus SDSF; ² Comparação SDF-NT versus SDF-T; ³ Comparação D versus SDF-T.

5.3 Função global do ventrículo esquerdo

Na comparação dos pacientes com FEVE alterada x normal, os pacientes com fração de ejeção alterada (13/76 ou 17,1%) apresentaram idade significativamente maior, maior proporção de eletrocardiogramas alterados, de arritmia como queixa clínica, de radiografias de tórax alteradas, eventos e óbitos do que os pacientes com fração de ejeção normal. Pacientes com fração de ejeção alterada apresentaram, em média, menores medidas de CK que os pacientes com fração de ejeção normal. Pacientes com fração de ejeção alterada apresentaram maior alteração de contratilidade segmentar na RMC basal e de (Tabela 7).

A magnitude da fibrose miocárdica foi significativamente maior nos pacientes com FEVE alterada que no grupo com FEVE preservada na RMC basal, seja pela massa de fibrose, volume de fibrose ou percentual de fibrose. Também na RMC de seguimento a magnitude da fibrose miocárdica foi significativamente maior nos pacientes com fração de ejeção alterada (Tabela 7).

Uma correlação positiva é verificada entre as medidas de fração de ejeção pela RMC basal e pelo ECO ($r=0,799$, $p<0,001$; equação da reta de regressão: $y = 0,73x + 6,4$; intervalo de confiança de 95% do coeficiente b de 0,60 a 0,85 e desvio padrão dos resíduos de 6,22; $p < 0,001$) (Figura 11).

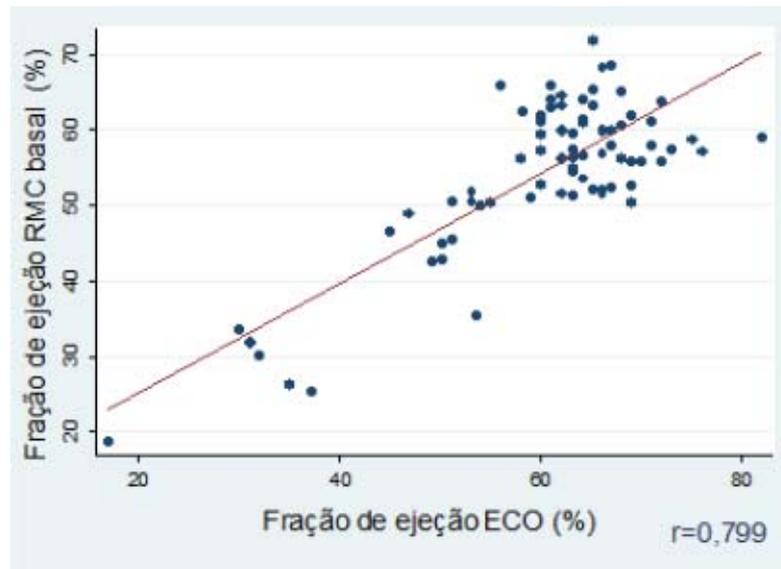


Figura 11 - Relação entre fração de ejeção pela RMC basal e fração de ejeção pelo ecocardiograma

Tabela 7 - Características clínicas e da RMC dos pacientes segundo a classificação da fração de ejeção pela RMC

Características	Fração de ejeção		p ¹
	Alterada n=13	Normal n=63	
Idade (anos)	19,2 ± 3,9	11,8 ± 3,3	<0,001
CK (UI)	2682 ± 2603	11552 ± 7040	<0,001
Duchenne	11 (84,6%)	59 (93,6%)	0,271
Becker	2 (15,4%)	4 (6,3%)	
Usa cadeira de rodas	11 (84,6%)	38 (60,3%)	0,096
Idade cadeira de rodas (anos)	10,8 ± 2,1	12,4 ± 2,5	0,045
ECG (anormal)	11 (84,6%)	20 (31,7%)	<0,001
Raio X (anormal)	6 (46,1%)	0 (0,0%)	<0,001
Arritmia (sim)	6 (46,1%)	7 (11,1%)	0,002
Uso de esteroides	8 (61,5%)	44 (69,8%)	0,558
Fibrose RMC basal	13 (100,0%)	42 (66,7%)	0,014
Fibrose RMC seguimento	11 (100,0%)	44 (69,8%)	0,035
Alteração de contratilidade RMC basal	13 (100,0%)	27 (42,9%)	<0,001
Alteração de contratilidade RMC seguimento	11 (100,0%)	37 (58,7%)	<0,001
Nº de segmentos com fibrose RMC basal	7,5 ± 2,9	3,1 ± 2,9	<0,001
Nº de segmentos com fibrose RMC seguimento	8,9 ± 2,7	4,4 ± 3,4	<0,001
Massa de fibrose RMC basal (g)	30,0 ± 14,9	8,6 ± 9,9	<0,001
Massa de fibrose RMC seguimento (g)	35,5 ± 20,2	12,5 ± 11,6	<0,001
Volume de fibrose RMC basal (ml)	28,9 ± 14,1	8,3 ± 9,5	<0,001
Volume de fibrose RMC seguimento (ml)	34,9 ± 19,1	11,9 ± 11,1	<0,001
Percentual de fibrose RMC basal (%)	32,5 ± 9,2	18,9 ± 17,7	0,006
Percentual de fibrose RMC seguimento (%)	40,6 ± 9,4	24,2 ± 18,8	0,009
Eventos	5 (38,4%)	3 (4,8%)	0,001
Óbito	3 (23,1%)	1 (1,6%)	0,002

Legenda: ¹ Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson.

5.4 Fibrose miocárdica

Do total de pacientes, 72,4% tinham fibrose miocárdica presente na RMC basal e 74,3% na RMC de seguimento (Tabela 3). Na RMC basal, a massa da fibrose foi de $12,3 \pm 13,5$ g, equivalente a $21,2 \pm 17,3\%$ da massa do VE (Tabela 6). Exemplos de fibrose miocárdica pela RMC são demonstradas na Figura 12.

Na comparação entre os grupos com fibrose miocárdica presente x ausente, verifica-se diferença significativa com maior idade, peso, altura e proporção de pacientes em cadeira de rodas no grupo com fibrose miocárdica. Os valores de CK foram significativamente menores no grupo com fibrose miocárdica. (Tabela 8).

Em relação aos parâmetros do ecocardiograma bidimensional com Doppler a cores, verifica-se que os pacientes com fibrose miocárdica apresentaram menor fração de ejeção e maior massa ventricular. Quanto aos parâmetros da RMC basal, os pacientes com fibrose miocárdica apresentaram menor FEVE, maior índice de volume sistólico final e índice de massa miocárdica do VE (Tabela 8).

Tabela 8 - Características clínicas, do ecocardiograma e da RMC dos pacientes segundo classificação presença de fibrose miocárdica

	Fibrose miocárdica RMC basal		p ¹
	Presente n=55	Ausente n=21	
Idade (anos)	13,8 ± 4,3	11,2 ± 4,2	0,021
Peso (kg)	48,3 ± 15,8	38,6 ± 16,1	0,019
Altura (m)	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,002
IMC (kg/m ²)	19,9 ± 4,2	18,9 ± 4,8	0,358
CK (UI)	8110 ± 6060	15077 ± 8005	0,001
Biópsia muscular	34 (61,8%)	9 (42,9%)	0,136
DNA	32 (58,1%)	17 (80,9%)	0,064
Duchenne	50 (90,9%)	20 (95,2%)	0,531
Becker	5 (9,1%)	1 (4,8%)	
Usa cadeira de rodas	41 (74,5%)	8 (38,1%)	0,003
Idade cadeira de rodas (anos)	11,1 ± 2,3	11,1 ± 2,2	0,997
ECG (anormal)	25 (45,4%)	6 (28,6%)	0,180
Raio X (anormal)	6 (10,9%)	0 (0,0%)	0,115
ECO (anormal – FEVE < 50%)	12 (21,8%)	0 (0,0%)	0,020
Arritmia (sim)	11 (20,0%)	2 (9,5%)	0,278
Uso de esteroides	38 (69,1%)	14 (66,7%)	0,839
FEVE ECO (%)	58,4 ± 12,5	65,0 ± 4,3	0,047
IVDF ECO (ml/m ²)	65,0 ± 29,9	52,5 ± 13,6	0,061
IVSF ECO (ml/m ²)	29,4 ± 26,4	18,5 ± 6,2	0,065
Índice MASSA ECO (g/m ²)	69,2 ± 35,2	51,3 ± 15,4	0,028
FEVE RCM basal (%)	52,7 ± 11,3	59,3 ± 4,2	0,012
IVDF RCM basal (ml/m ²)	75,0 ± 36,3	59,6 ± 16,6	0,067
IVSF RCM basal (ml/m ²)	37,7 ± 32,1	23,6 ± 5,2	0,049
Índice MASSA RCM basal (g/m ²)	62,9 ± 22,3	46,6 ± 14,6	0,003
Eventos	8 (14,5%)	0 (0,0%)	0,065
Óbito	4 (7,3%)	0 (0,0%)	0,204

Legenda: ¹ Teste não- paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson.

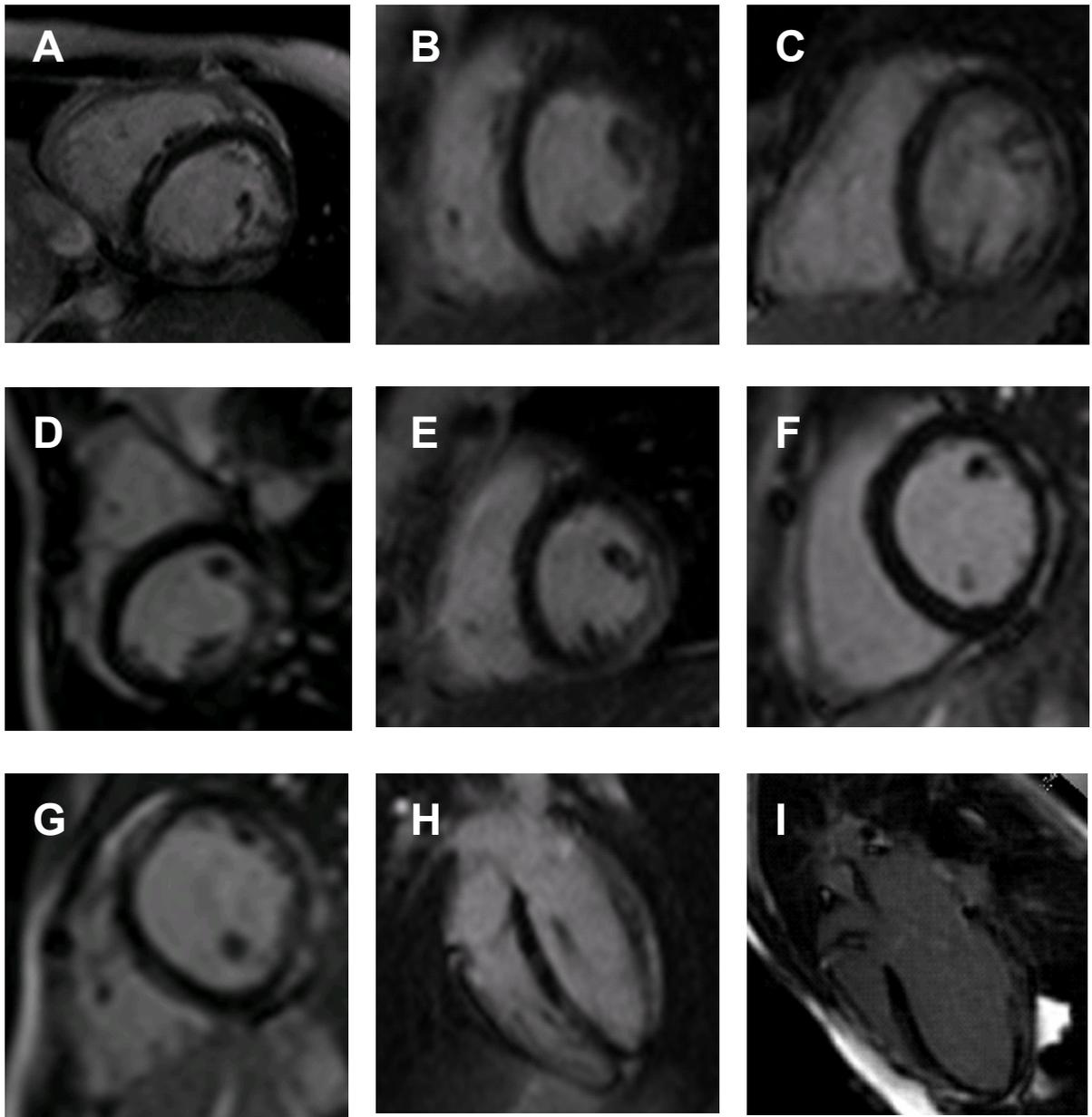


Figura 12 - Imagens de pacientes portadores de fibrose miocárdica pela RMC. Imagens A,B,C,D e E são de pacientes com distrofia muscular de Duchenne e F, G, H e I são de pacientes com Becker.

A Tabela 9 demonstra os parâmetros de fibrose miocárdica na RMC basal, de seguimento e a diferença na magnitude de fibrose nestes dois pontos no tempo. Apesar da maior massa e volume de fibrose na RMC basal no grupo randomizado e tratado, não houve diferença no parâmetro de percentual de fibrose do VE (fibrose normalizada para a massa do VE). Na RMC de seguimento, o grupo randomizado com fibrose e não tratado praticamente dobrou a sua massa de fibrose, passando a não mais apresentar diferença significativa em relação ao grupo tratado. Não houve redução da fibrose miocárdica em nenhum dos grupos analisados. Todos os grupos apresentaram progressão da fibrose miocárdica. No grupo com ausência de disfunção sistólica e fibrose na RMC basal, 2 (9,5%) pacientes passaram a apresentar fibrose miocárdica na RMC de seguimento (Tabela 3).

Para comparar a evolução das medidas que quantificam a fibrose miocárdica segundo os grupos (Geral, D, SDSF, SDF-NT e SDF-T) na RMC basal e na RMC de seguimento (Tabela 10), consideraram-se apenas os pacientes que tinham informação em ambos os momentos (n=74). Avaliando a progressão da fibrose miocárdica do momento basal para o seguimento, observou-se aumento significativamente maior no grupo randomizado com fibrose e não tratado do que no grupo randomizado com fibrose e tratado com IECA (Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18).

Tabela 9 - Características da fibrose miocárdica obtida pela RMC basal e de seguimento segundo os grupos D (disfunção sistólica - FEVE < 50%), SDSF (sem disfunção sistólica - FEVE ≥ 50% e sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado)

Características	Geral n=76	D n=13	SDSF n=21	SDF-NT n=21	SDF-T n=21	p ¹	p ²	p ³
RMC BASAL								
Massa de fibrose (g)	12,3 ± 13,5	30,0 ± 14,9	0,0 ± 0,0	8,7 ± 5,6	17,2 ± 10,8	<0,001	0,003	0,022
Volume de fibrose (ml)	11,9 ± 12,9	28,9 ± 14,1	0,0 ± 0,0	8,4 ± 5,4	16,5 ± 10,3	<0,001	0,003	0,017
Percentual de fibrose (%)	21,2 ± 17,3	32,5 ± 9,2	0,0 ± 0,0	23,8 ± 13,6	32,8 ± 13,7	<0,001	0,061	0,873
Nº de segmentos com fibrose	3,9 ± 3,3	7,5 ± 2,9	0,0 ± 0,0	4,5 ± 2,1	4,8 ± 2,5	<0,001	0,849	0,007
RMC SEGUIMENTO								
Massa de fibrose (g)	15,9 ± 15,4	35,5 ± 20,2	1,5 ± 3,7	15,7 ± 7,8	20,3 ± 12,0	<0,001	0,273	0,006
Volume de fibrose (ml)	15,4 ± 14,9	34,9 ± 19,1	1,4 ± 3,5	15,1 ± 7,5	19,3 ± 11,5	<0,001	0,279	0,005
Percentual de fibrose (%)	26,7 ± 18,5	40,6 ± 9,4	3,0 ± 6,8	33,8 ± 12,4	35,9 ± 13,7	<0,001	0,642	0,416
Nº de segmentos com fibrose	5,1 ± 3,6	8,9 ± 2,7	0,4 ± 1,4	6,4 ± 1,7	6,5 ± 2,3	<0,001	0,949	0,019
DIFERENÇA								
DIF Massa (g)	4,5 ± 6,8	8,5 ± 13,0	1,5 ± 3,5	7,1 ± 4,5	3,1 ± 5,0	0,025	0,009	0,226
DIF Volume (ml)	4,4 ± 6,6	8,8 ± 12,4	1,4 ± 3,4	6,7 ± 4,4	2,8 ± 4,9	0,001	0,008	0,112
DIF Percentual (%)	5,9 ± 7,8	9,0 ± 9,9	3,0 ± 6,4	10,0 ± 6,2	3,1 ± 7,4	0,031	0,001	0,047
DIF nº de segmentos	1,4 ± 1,9	1,6 ± 2,1	0,6 ± 1,5	1,8 ± 1,8	1,7 ± 1,9	0,041	0,856	0,778

Legenda: Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson; ¹ Comparação D versus SDSF; ² Comparação SDF-NT versus SDF-T; ³ Comparação D versus SDF-T.

Tabela 10 - Comparação da evolução da fibrose miocárdica na RMC basal e de seguimento dentro de cada grupo segundo classificação D (disfunção sistólica FEVE < 50%), SDSF (sem disfunção sistólica – FEVE ≥ 50% e sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) e SDF-T (randomizado com fibrose tratado)

Características	Geral n=74	D n=11	SDSF n=21	SDF-NT n=21	SDF-T n=21
Massa de fibrose (g)					
RMC basal	11,3 ± 12,2	26,9 ± 13,0	0,0 ± 0,0	8,7 ± 5,6	17,2 ± 10,8
RMC seguimento	15,9 ± 15,4	35,5 ± 20,2	1,5 ± 3,7	15,7 ± 7,8	20,3 ± 12,0
p ¹	<0,001	0,021	0,083	<0,001	0,011
Volume de fibrose (ml)					
RMC basal	11,0 ± 11,7	26,1 ± 12,4	0,0 ± 0,0	8,4 ± 5,4	16,5 ± 10,3
RMC seguimento	15,3 ± 14,9	34,9 ± 19,1	1,4 ± 3,6	15,1 ± 7,5	19,3 ± 11,5
p ¹	<0,001	0,021	0,083	<0,001	0,017
Percentual de fibrose (%)					
RMC basal	20,8 ± 17,3	31,6 ± 9,6	0,0 ± 0,0	23,8 ± 13,6	32,8 ± 13,7
RMC seguimento	26,6 ± 18,7	40,6 ± 9,4	3,0 ± 6,8	33,8 ± 13,4	35,9 ± 13,7
p ¹	<0,001	0,013	0,059	<0,001	0,071
Nº de segmentos com fibrose					
RMC basal	3,7 ± 3,3	7,3 ± 3,1	0,0 ± 0,0	4,5 ± 2,1	4,8 ± 2,5
RMC seguimento	5,1 ± 3,6	8,9 ± 2,7	0,4 ± 1,4	6,4 ± 1,7	6,5 ± 2,3
p ¹	<0,001	0,031	0,165	<0,001	0,001

Legenda: Teste não- paramétrico de Wilcoxon; ¹ Comparação RMC basal versus RMC seguimento.

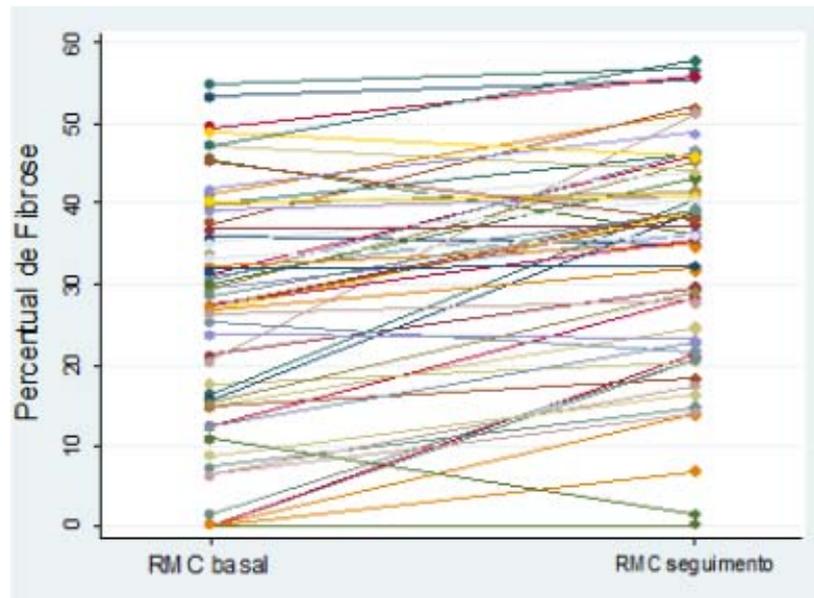


Figura 13 - Progressão do percentual de fibrose de todos os pacientes (n=76)

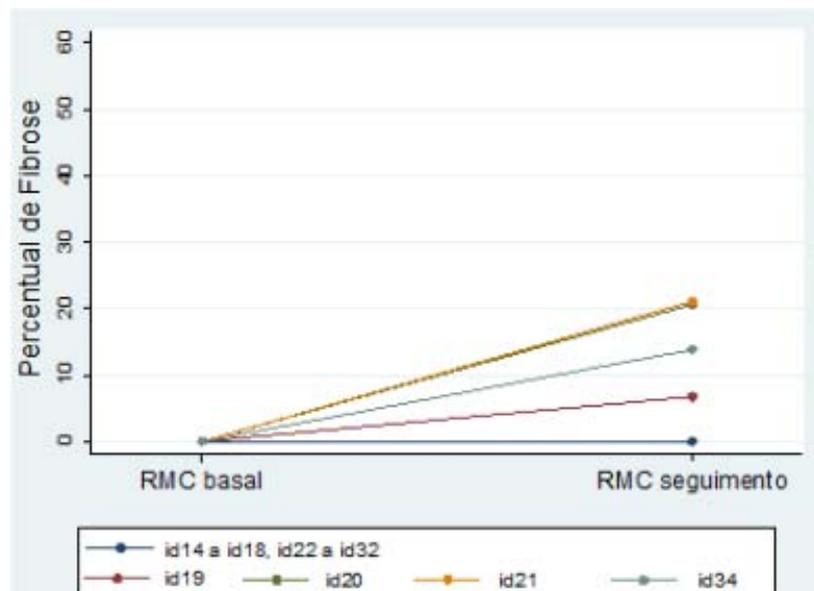


Figura 14 - Progressão do percentual de fibrose dos pacientes do grupo SDSF (sem cardiomiopatia) (n=21)

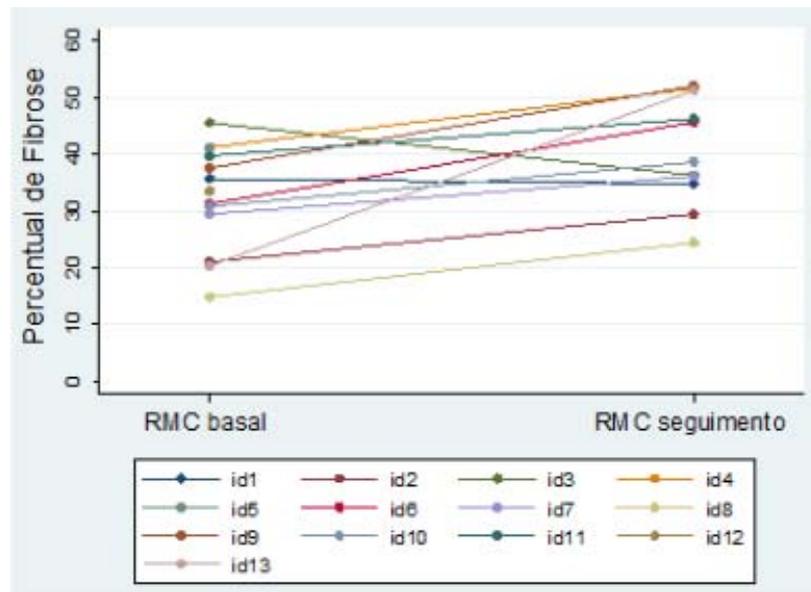


Figura 15 - Progressão do percentual de fibrose dos pacientes do grupo D (n=13)

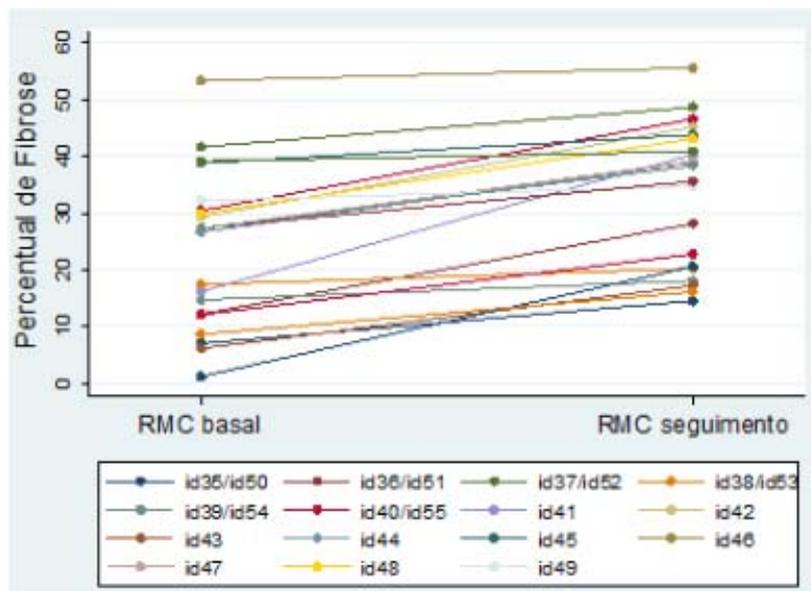


Figura 16 - Progressão do percentual de fibrose dos pacientes do grupo SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado) (n=21)

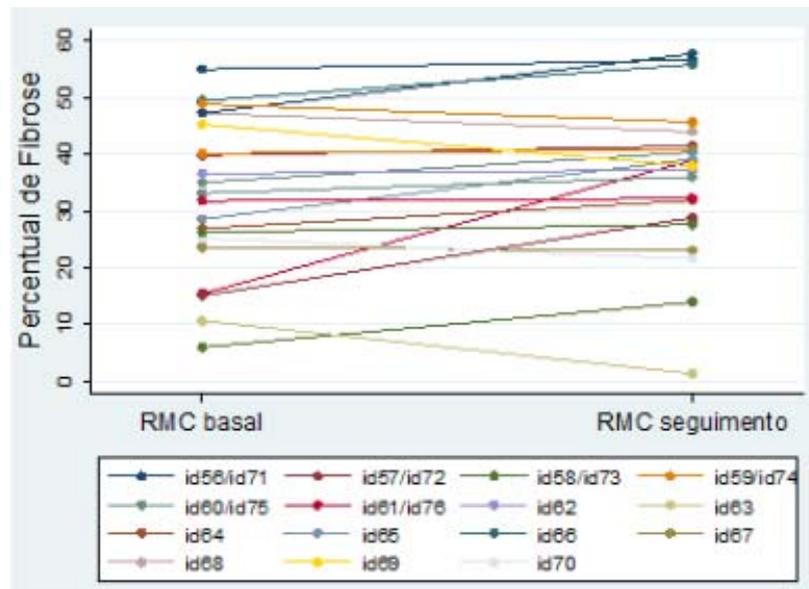


Figura 17 - Progressão do percentual de fibrose dos pacientes do grupo SDF-T (randomizado com fibrose tratado) (n=21)

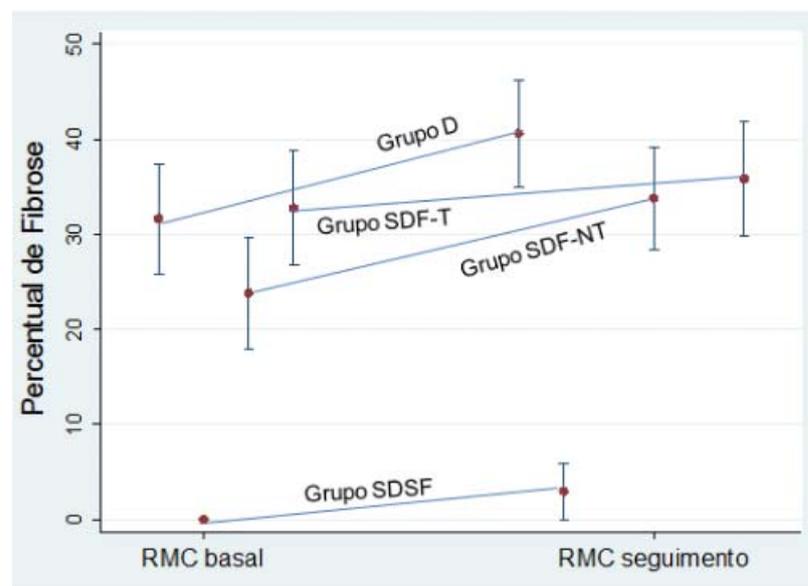


Figura 18 - Progressão da média do percentual de fibrose segundo os grupos D (disfunção sistólica - FEVE < 50 %), SDSF (sem disfunção sistólica – FEVE ≥ 50% e sem fibrose), SDF-NT (randomizado com fibrose não tratado), SDF-T (randomizado com fibrose tratado)

5.4.1 Análise de regressão múltipla

5.4.1.1 Em todos os pacientes

Com o objetivo de investigar quais fatores foram preditores na progressão da fibrose miocárdica, utilizamos a análise de regressão linear multivariada, com seleção das variáveis por *backward stepwise*, incluindo no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total e o uso de IECA (modelo 1). Obtivemos como resultado que o valor de CK total e uso de IECA foram preditores independentes da progressão da fibrose miocárdica (percentual) em toda a nossa população (Tabela 11).

Para investigar os preditores da fração ejeção na RMC de seguimento de todos os pacientes, utilizamos a análise de regressão multivariada linear, com seleção das variáveis por *backward stepwise*, incluindo no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total e o uso de IECA (modelo 1). Neste modelo a fibrose na RMC basal em percentual ($p=0,027$) e o uso de IECA ($p=0,007$) foram preditores independentes da fração de ejeção do VE no seguimento (Tabela 12).

Para investigar os preditores da fração ejeção na RMC de seguimento (classificação normal x alterada) de todos os pacientes, utilizamos análise de regressão logística multivariada, com seleção das variáveis por *backward stepwise*, incluindo no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual e o valor de CK total (modelo 1). Neste modelo a idade e o percentual de fibrose foram

preditores independentes da fração de ejeção do VE alterada na RMC seguimento. O aumento da idade (OR = 1,30) e percentual de fibrose (OR = 1,05) na RMC basal aumentaram a chance do paciente ter fração de ejeção do VE alterada no seguimento (Tabela 13).

5.4.1.2 No grupo randomizado

Com o objetivo de investigar quais fatores foram preditores na progressão da fibrose miocárdica (percentual), utilizamos a análise de regressão linear multivariada, com seleção das variáveis por *backward stepwise*, incluindo no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total e o grupo randomizado tratado e não tratado (modelo 2). Obtivemos como resultado que todas as variáveis (idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total) incluindo o grupo randomizado tratado foram preditores da progressão da fibrose de forma independente ($p=0,039$) (Tabela 11).

Para investigar quais fatores foram preditores da fração de ejeção na RMC de seguimento, que consideramos como o fator mais relacionado ao prognóstico na evolução, utilizamos processo estatístico semelhante e incluímos no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total e o grupo randomizado tratado e não tratado (modelo 2). Os resultados indicaram que o grupo de tratamento foi preditor da fração de ejeção do VE na RMC de seguimento, porém com p indicando uma tendência estatística ($p=0,093$) (Tabela 12).

Para investigar os preditores da fração ejeção na RMC de seguimento (classificação normal x alterada), utilizamos regressão logística multivariada, com seleção das variáveis por *backward stepwise* e incluímos no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total e o grupo randomizado tratado e não tratado (modelo 2). O grupo de tratamento não foi preditor independente da classificação da fração de ejeção do VE no seguimento ($p=0,102$) (Tabela 13).

5.4.1.3 No grupo de pacientes com mutação em exons

Com o objetivo de investigar quais fatores foram preditores na progressão da fibrose miocárdica (percentual), utilizamos a análise de regressão linear multivariada e incluímos no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total e a classificação dos exons (menor que o exon 45 x maior ou igual ao exon 45) (modelo 3). Obtivemos como resultado que a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual ($p= 0,033$) e o valor de CK total ($p=0,008$) foram preditores da progressão da fibrose (percentual) de forma independente. As demais variáveis incluídas no modelo, como a classificação dos exons ($p=0,855$), não foram associadas à progressão da fibrose miocárdica (Tabela 11).

Para investigar quais fatores foram preditores da fração de ejeção na RMC de seguimento, que consideramos como o fator mais relacionado ao

prognóstico na evolução da doença, utilizamos processo estatístico semelhante e incluímos no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total e a classificação dos exons (menor que o exon 45 x maior ou igual ao exon 45) (modelo 3). Os resultados indicaram que a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual ($p=0,011$) foi preditora da fração de ejeção do VE na RMC de seguimento. As demais variáveis incluídas no modelo, como a classificação dos exons ($p=0,628$), não foram associadas à progressão da fibrose miocárdica (Tabela 12).

Para investigar os preditores da fração ejeção na RMC de seguimento (classificação normal x alterada), utilizamos regressão logística multivariada, com seleção das variáveis por *backward stepwise* e incluímos no modelo inicial a idade, a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual, o valor de CK total e a classificação dos exons (menor que o exon 45 x maior ou igual ao exon 45) (modelo 3). Apenas a fibrose miocárdica na RMC basal em percentual foi preditora da fração de ejeção alterada do VE na RMC de seguimento ($p=0,025$). O aumento de 1 ponto percentual na fibrose miocárdica na RMC aumenta em 1,08 vezes a chance do paciente ter fração ejeção alterada na RMC seguimento (Tabela 13).

Tabela 11 - Fatores preditores da progressão da fibrose miocárdica em percentual

		Coeficiente	Erro padrão	p	Desvio-padrão dos resíduos	r ²
PREDITORES DA PROGRESSÃO DE FIBROSE						
Modelo 1 (n=74)	Intercepto	13,10	1,96	<0,001	7,19	17,3%
	CK (UI)	-0,0005	0,0001	<0,001		
	Uso de IECA (sim)	-4,55	1,96	0,015		
Modelo 2 (n=42)	Intercepto	29,63	6,61	<0,001	6,11	34,9%
	Grupo randomizado (SDF-T)	-4,51	2,11	0,039		
	Idade	-0,94	0,45	0,041		
	CK (UI)	-0,0005	0,0002	0,017		
	Percentual de fibrose RMC basal (%)	-0,16	0,07	0,026		
Modelo 3 (n= 38)	Intercepto	15,55	6,25	0,018	6,3	21,6
	Percentual de fibrose RMC basal (%)	0,25	0,11	0,033		
	CK (UI)	-0,0006	0,0002	0,008		
	Idade	-0,18	0,32	0,572		
	Classificação Exons (exons < 45)	-0,45	2,43	0,855		

Legenda: Regressão linear múltipla; r² - coeficiente de determinação; Modelo 1 inclui todos os pacientes (n=74); Modelo 2 inclui somente os pacientes randomizados (n=42); Modelo 3 inclui somente os pacientes com mutação em exons (n=38).

Tabela 12 - Fatores preditores da fração de ejeção da RMC seguimento

		Coeficiente	Erro padrão	p	Desvio-padrão dos resíduos	r ²
PREDITORES FEVE NA RMC SEGUIMENTO						
Modelo 1 (n=74)	Intercepto	54,40	2,37	<0,001	7,71	40,0%
	Percentual de fibrose RMC basal (%)	-0,14	0,06	0,027		
	Uso de IECA (sim)	-6,19	2,24	0,007		
Modelo 2 (n=42)	Intercepto	53,93	1,38	<0,001	6,31	6,9%
	Grupo randomizado (SDF-T)	-3,35	1,95	0,093		
Modelo 3 (n = 38)	Intercepto	58,62	3,30	<0,001	8,7	37,2
	Idade	-0,25	0,44	0,568		
	Percentual de fibrose RMC basal (%)	-0,28	0,10	0,011		
	CK (UI)	0,0003	0,0003	0,254		
	Classificação Exons (exons < 45)	-1,65	3,38	0,628		

Legenda: Regressão linear múltipla; r² - coeficiente de determinação; Modelo 1 inclui todos os pacientes (n=74); Modelo 2 inclui somente os pacientes randomizados (n=42); Modelo 3 inclui somente os pacientes com mutação em exons (n=38).

Tabela 13 - Fatores preditores da fração de ejeção (classificação normal x alterada) da RMC seguimento

		OR	IC 95%	p	r ²
PREDITORES DA CLASSIFICAÇÃO DA FEVE NA RMC SEGUIMENTO					
Modelo 1 (n=74)	Percentual de fibrose	1,05	1,01 – 1,09	0,007	27,4
	Idade (anos)	1,30	1,10 – 1,54	0,002	
Modelo 2 (n=42)	Grupo randomizado (SDF-T)	3,18	0,79-12,8	0,102	5,5
Modelo 3 (n=38)	Percentual de fibrose RMC basal (%)	1,08	1,01 – 1,16	0,025	0,4
	CK (UI)	1,00	0,99 – 1,01	0,964	
	Idade	1,36	0,96 – 1,92	0,083	
	Classificação Exons (exons < 45)	2,05	0,24 – 17,60	0,513	

Legenda: Regressão logística múltipla; r² - coeficiente de determinação (Pseudo R2); OR – *odds ratio*; IC 95% - Intervalo de confiança de 95%; Modelo 1 inclui todos os pacientes (n=74); Modelo 2 inclui somente os pacientes randomizados (n=42). Modelo 3 inclui somente os pacientes com mutação em exons (n=38).

5.4.2 Relação entre idade, fibrose miocárdica e CK

Verifica-se que as medidas que quantificam a fibrose diferem-se entre as várias faixas etárias (Tabela 14). Observa-se uma tendência de aumento da média da massa e volume de fibrose da RMC basal com o aumento das faixas etárias ($p < 0,001$). Há uma tendência de aumento para volume, percentual e número de segmentos com fibrose na RMC basal e seguimento e para massa de fibrose na RMC seguimento até a faixa etária de 15 a 16 anos, uma vez que os pacientes entre 17 e 28 anos apresentam medidas próximas aos pacientes da faixa anterior. Todas as faixas etárias estudadas apresentaram fibrose miocárdica.

Verifica-se uma correlação positiva e significativa entre idade (em anos) e os parâmetros da fibrose (Tabela 15): massa, volume, percentual de fibrose e número de segmentos com fibrose tanto na RMC basal como na RMC seguimento.

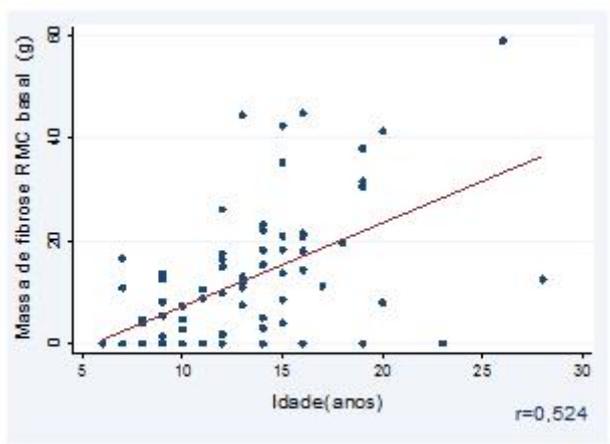
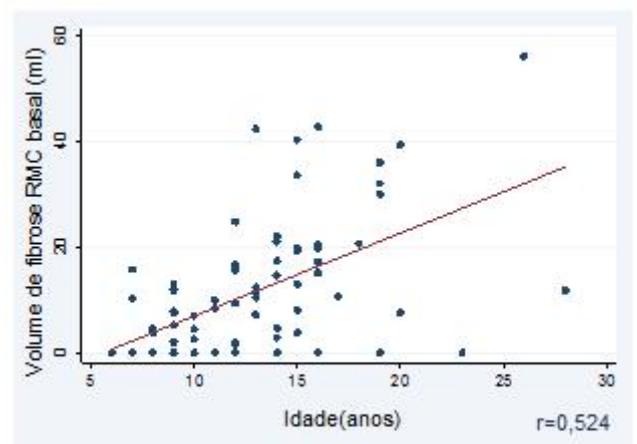
Tabela 14 - Características da fibrose miocárdica obtida pela RMC basal e de seguimento segundo faixa etária

Faixa etária	6 a 9 n=18	10 a 12 n=20	13 a 14 n=13	15 a 16 n=13	17 a 28 n=12	p ¹
RMC BASAL						
Massa de fibrose (g)	4,7 ± 5,6	6,1 ± 7,6	13,4 ± 12,0	20,2 ± 13,6	24,1 ± 18,4	<0,001 a,b,c,d
Volume de fibrose (ml)	4,4 ± 5,3	5,9 ± 7,4	12,8 ± 11,4	19,5 ± 12,9	23,4 ± 17,6	<0,001 a,b,c,d
Percentual de fibrose (%)	13,6 ± 15,3	16,7 ± 17,4	25,3 ± 18,4	29,7 ± 16,3	26,6 ± 15,1	0,054
Nº de segmentos com fibrose	2,7 ± 2,7	2,6 ± 2,6	4,1 ± 3,6	5,8 ± 3,5	5,2 ± 3,6	0,015 a,c
RMC SEGUIMENTO						
Massa de fibrose (g)	7,3 ± 8,1	9,7 ± 9,3	20,1 ± 11,2	25,9 ± 23,9	25,3 ± 15,2	<0,001 a,b,c,d
Volume de fibrose (ml)	7,0 ± 7,7	9,4 ± 9,1	19,2 ± 10,7	25,0 ± 22,9	25,0 ± 15,0	<0,001 a,b,c,d
Percentual de fibrose (%)	18,5 ± 18,6	21,5 ± 18,6	34,1 ± 15,6	34,5 ± 20,2	32,2 ± 14,3	0,053
Nº de segmentos com fibrose	3,5 ± 3,4	4,2 ± 3,4	4,9 ± 2,8	7,9 ± 3,9	6,4 ± 3,3	0,008 a,c
DIFERENÇA						
DIF Massa (g)	2,5 ± 4,0	3,6 ± 4,4	6,7 ± 5,9	7,0 ± 12,5	4,3 ± 6,6	0,315
DIF Volume (ml)	2,4 ± 3,7	3,4 ± 4,2	6,4 ± 5,6	6,7 ± 12,3	4,3 ± 6,3	0,334
DIF Percentual (%)	4,9 ± 7,3	4,8 ± 6,0	8,8 ± 8,4	5,7 ± 10,9	6,2 ± 8,2	0,671
DIF nº de segmentos	1,0 ± 1,2	1,5 ± 1,7	0,8 ± 2,4	2,4 ± 1,7	1,4 ± 2,4	0,210

Legenda: ¹ Teste não-paramétrico de Kruskal Wallis; Comparações múltiplas – método de Bonferroni - diferenças com significância estatística: (a) 6 a 9 ≠ 15 a 16; (b) 6 a 9 ≠ 17 a 28; (c) 10 a 12 ≠ 15 a 16; (d) 10 a 12 ≠ 17 a 28 .

Tabela 15 - Relação entre as medidas de fibrose miocárdica obtida pela RMC basal e de seguimento e idade

	Equação de regressão	Erro padrão do coeficiente b	Desvio-padrão dos resíduos	Coefficiente de correlação	P
RMC BASAL					
Massa de fibrose (g)	$y = 1,63x - 9,1$	0,30	11,4	0,524	<0,001
Volume de fibrose (ml)	$y = 1,57x - 8,7$	0,29	11,0	0,524	<0,001
Percentual de fibrose	$y = 1,11x + 6,6$	0,44	16,6	0,338	0,014
Nº de segmentos com fibrose	$y = 0,24x + 0,67$	0,08	3,2	0,344	0,005
RMC SEGUIMENTO					
Massa de fibrose (g)	$y = 1,55x - 4,1$	0,40	14,1	0,503	<0,001
Volume de fibrose (ml)	$y = 1,53x - 4,3$	0,38	13,6	0,509	<0,001
Percentual de fibrose	$y = 1,28x + 10,4$	0,50	17,9	0,315	0,006
Nº de segmentos com fibrose	$y = 0,28x + 1,45$	0,10	3,5	0,342	0,003

**Figura 19** - Relação entre massa de fibrose pela RMC basal e idade**Figura 20** - Relação entre volume de fibrose pela RMC basal e idade

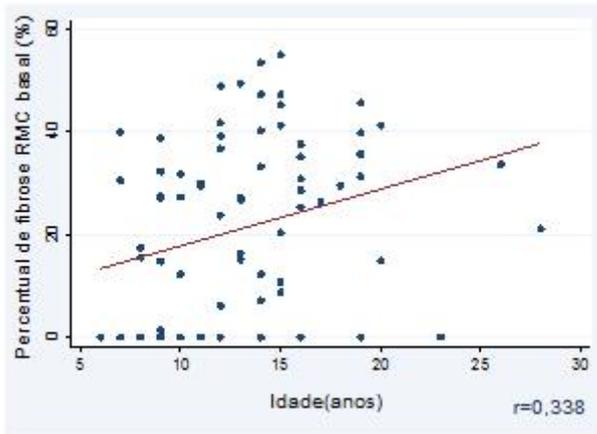


Figura 21 - Relação entre percentual de fibrose pela RMC basal e idade.

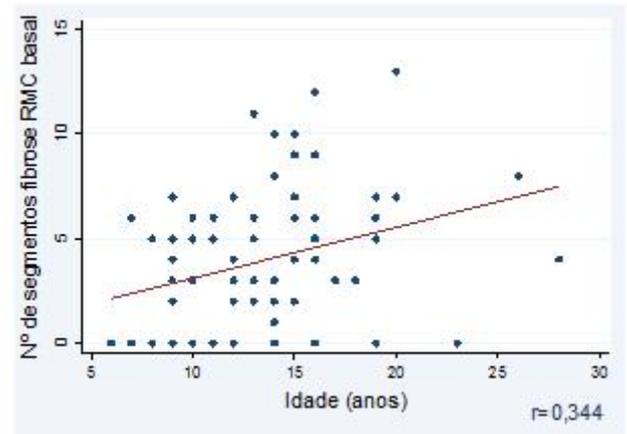


Figura 22 - Relação entre nº de segmentos com fibrose pela RMC basal e idade.

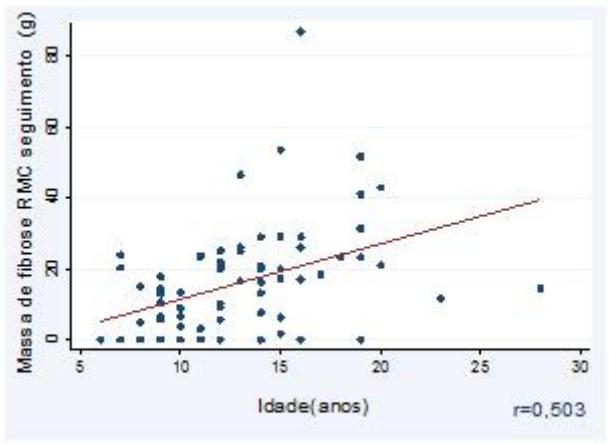


Figura 23 - Relação entre massa de fibrose pela RMC seguimento e idade.

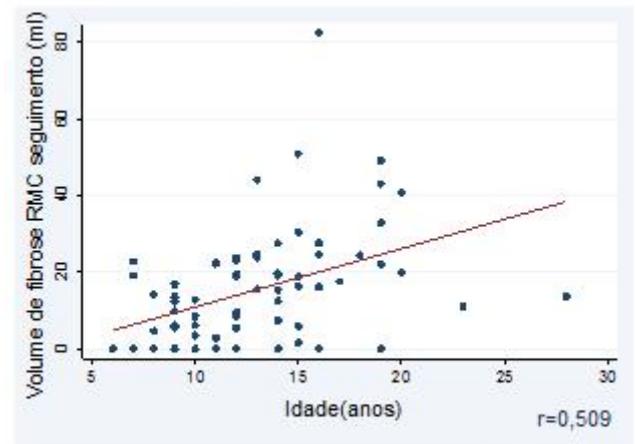


Figura 24 - Relação entre volume de fibrose pela RMC seguimento e idade.

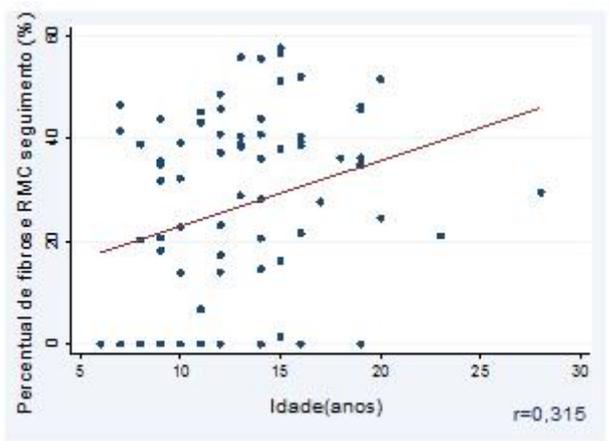


Figura 25 - Relação entre percentual de fibrose pela RMC seguimento e idade

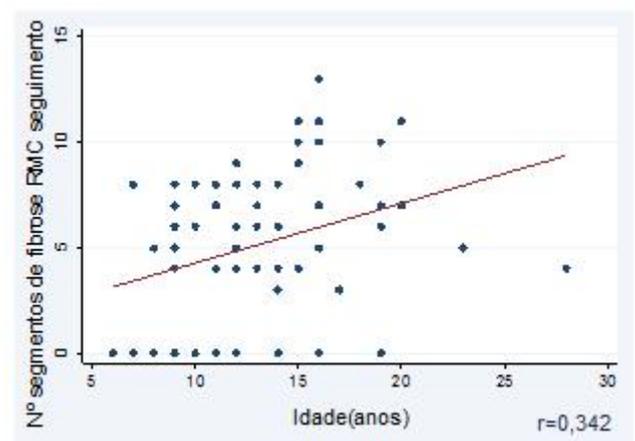


Figura 26 - Relação entre nº de segmentos de fibrose pela RMC seguimento e idade

Verifica-se uma correlação negativa e significativa entre idade (em anos) e valores de CK, $r=-0,693$, $p<0,001$; equação da linha de regressão: $y = -1066,7 + 24000,8x$; intervalo de confiança de 95% do coeficiente b de -1363,8 a -769,6 e desvio padrão dos resíduos de 5654,8; $p < 0,001$) (Figura 27).

Observa-se uma diminuição da média dos valores de CK com o aumento da faixa etária ($p<0,001$). Pacientes entre 6 e 10 anos e de 11 a 12 anos apresentam, em média, maiores valores de CK que os pacientes entre 13 e 15 anos e de 16 a 28 anos (Figura 28).

A relação observada entre idade e valores de CK e idade e percentual de fibrose na RMC basal são inversas, enquanto CK diminui com o aumento da faixa etária, o percentual de fibrose tende a aumentar (Figura 29).

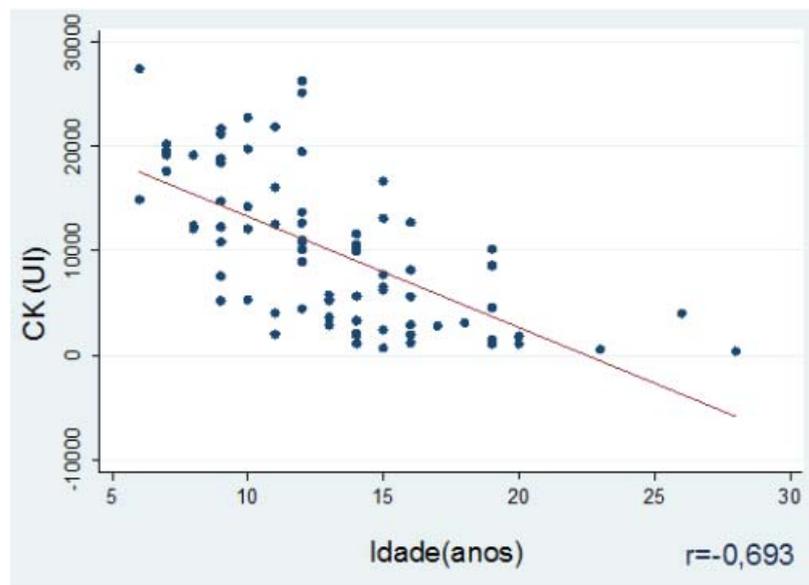


Figura 27 - Relação entre valores de CK (UI) e idade (anos)

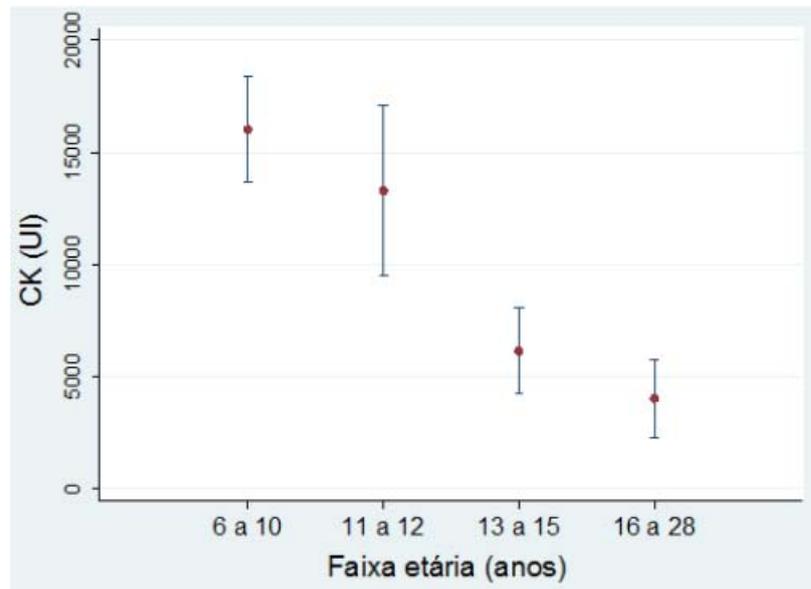


Figura 28 - Relação entre média dos valores de CK e distribuição das faixas etárias

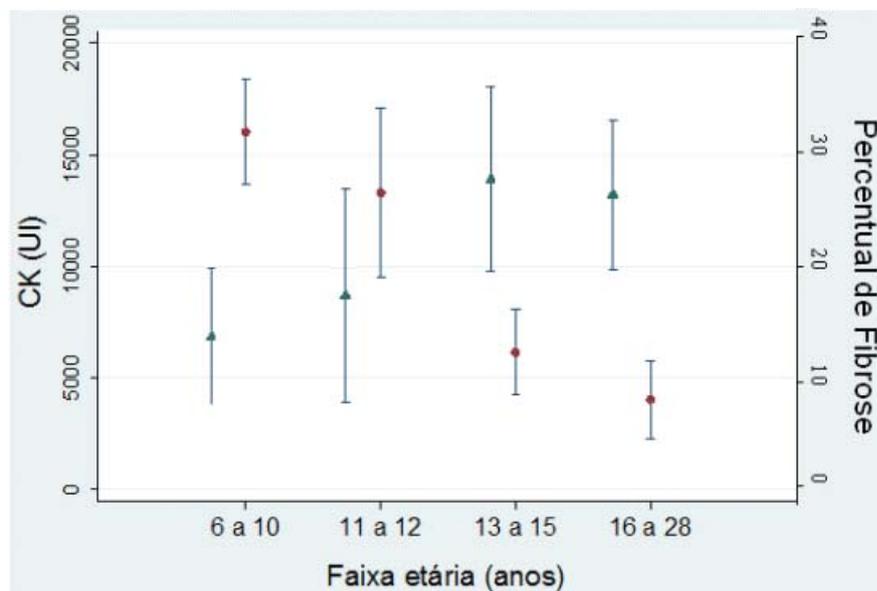


Figura 29 - Relação entre média de valores de CK (círculo), média do percentual de fibrose (triângulo) na RMC basal e distribuição nas faixas etárias

5.4.3 Fibrose miocárdica segmentar e alteração da contratilidade segmentar (classificação da AHA)

Para comparar as proporções de pacientes com fibrose segmentar e alteração de contratilidade segmentar na RMC basal e RMC de seguimento consideraram-se apenas os indivíduos que tinham informação em ambos os momentos (n=74). A tabela detalhada dos resultados dos segmentos do AHA com fibrose e alteração de contratilidade na RMC basal e de seguimento é apresentada no apêndice.

Os segmentos laterais do VE com maior frequência e os segmentos inferiores com uma frequência um pouco menor foram significativamente mais acometidos do que os demais segmentos com relação à presença de fibrose miocárdica e alteração contrátil, como demonstradas nas Figuras 31 e 32. Observou-se, também, de forma clara, a progressão do envolvimento miocárdico no exame de RMC de seguimento, no que diz respeito ao número de segmentos com fibrose miocárdica ou com alteração contrátil.

Verifica-se associação entre a classificação dos segmentos com fibrose segmentar (presente e ausente) e contratilidade segmentar (normal e anormal) para todos os segmentos estudados, com exceção apenas dos segmentos 13 e 17 na RMC basal e 1 e 15 na RMC seguimento (Tabela 16).

O padrão da fibrose miocárdica foi predominantemente meso-epicárdica, sendo que este padrão esteve presente em 81,7% dos segmentos na RMC basal e em 75% dos segmentos na RMC de seguimento ($p<0,05$) (Figura 33).

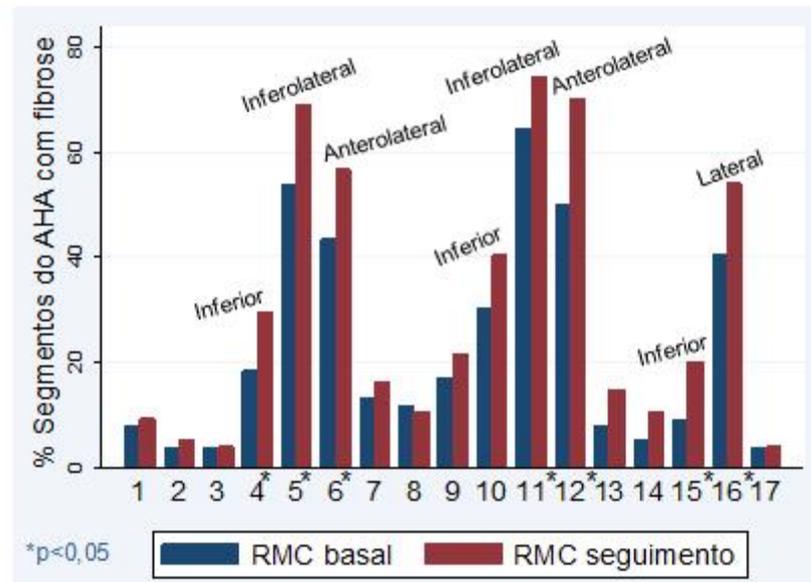


Figura 30 - Distribuição de frequência dos segmentos do AHA com fibrose (segmentos 1 a 6: porções basais do VE; segmentos 7 a 12: porções mediais; segmentos 13 a 17: porções apicais)

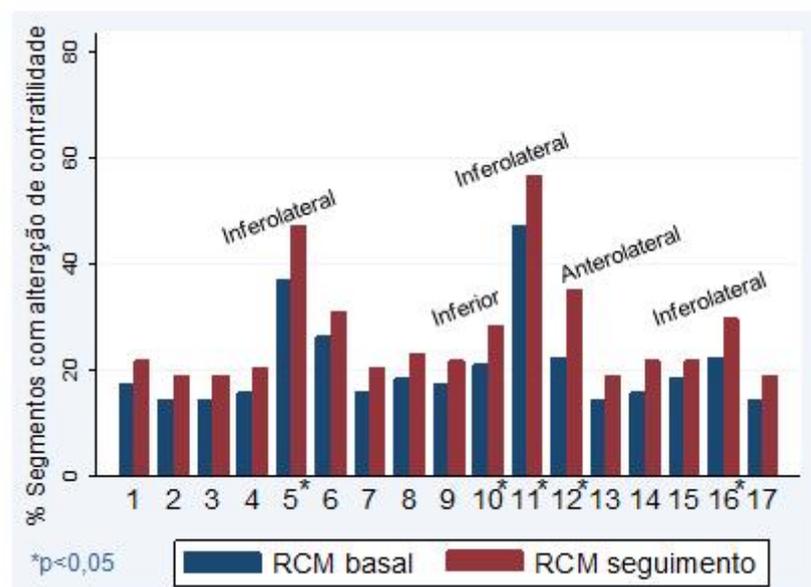


Figura 31 - Distribuição de frequência dos segmentos do AHA com alteração de contratilidade (segmentos 1 a 6: porções basais do VE; segmentos 7 a 12: porções mediais; segmentos 13 a 17: porções apicais)

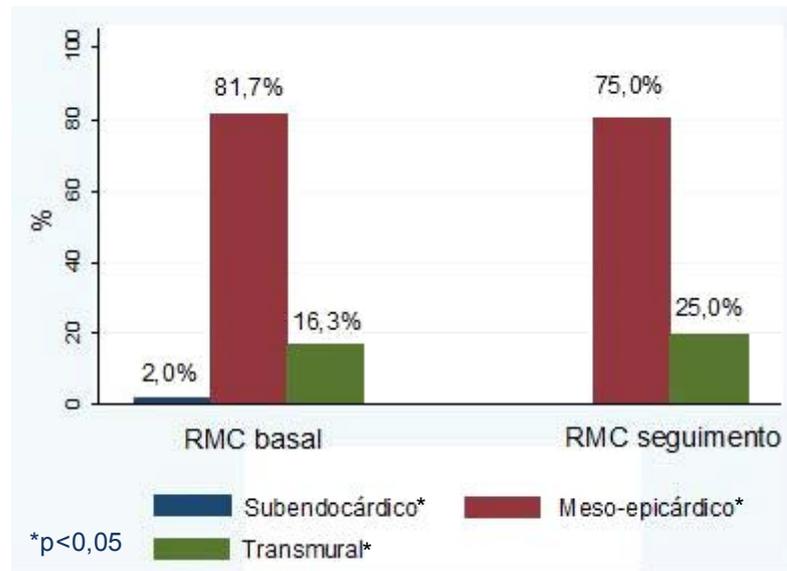


Figura 32 - Distribuição de frequência dos segmentos do AHA com fibrose segundo classificação subendocárdico, meso-epicárdico e transmural

Tabela 16 - Distribuição de frequência e comparação entre a classificação dos segmentos com fibrose segmentar (presente e ausente) com contratilidade segmentar (normal e anormal)

Segmento	Fibrose segmentar	Contratilidade segmentar RMC basal (n = 76)			Contratilidade segmentar RMC seguimento (n = 74)		
		Normal n (%)	Anormal n (%)	p ¹	Normal n (%)	Anormal n (%)	p ¹
		1	Ausente	61 (85,9%)	10 (14,0%)	0,008	54 (80,5%)
	Presente	2 (40,0%)	3 (60,0%)		4 (57,1%)	3 (42,8%)	
2	Ausente	65 (89,0%)	8 (10,9%)	<0,001	59 (84,2%)	11 (15,7%)	0,003
	Presente	0 (0,0%)	3 (100,0%)		1 (25,0%)	3 (75,0%)	
3	Ausente	63 (87,5%)	9 (12,5%)	0,038	58 (81,6%)	13 (18,3%)	0,515
	Presente	2 (50,0%)	2 (50,0%)		2 (66,6%)	1 (33,3%)	
4	Ausente	58 (95,0%)	3 (4,91%)	<0,001	46 (88,4%)	6 (11,5%)	0,004
	Presente	6 (40,0%)	9 (60,0%)		13 (59,0%)	9 (40,9%)	
5	Ausente	33 (94,2%)	2 (5,71%)	<0,001	23 (95,8%)	1 (4,16%)	<0,001
	Presente	15 (36,5%)	26 (63,4%)		16 (32,0%)	34 (68,0%)	
6	Ausente	41 (95,3%)	2 (4,65%)	<0,001	29 (90,6%)	3 (9,37%)	<0,001
	Presente	15 (45,4%)	18 (54,5%)		22 (52,3%)	20 (47,6%)	
7	Ausente	60 (89,5%)	7 (10,4%)	<0,001	54 (87,0%)	8 (12,9%)	<0,001
	Presente	4 (44,4%)	5 (55,5%)		5 (41,6%)	7 (58,3%)	
8	Ausente	59 (88,0%)	8 (11,9%)	<0,001	54 (81,8%)	12 (18,1%)	0,005
	Presente	3 (33,3%)	6 (66,6%)		3 (37,5%)	5 (62,5%)	
9	Ausente	56 (90,3%)	6 (9,67%)	<0,001	49 (84,4%)	9 (15,5%)	0,015
	Presente	7 (50,0%)	7 (50,0%)		9 (56,2%)	7 (43,7%)	
10	Ausente	49 (92,4%)	4 (7,54%)	<0,001	40 (88,8%)	5 (11,1%)	<0,001
	Presente	11 (47,8%)	12 (52,1%)		13 (44,8%)	16 (55,1%)	
11	Ausente	26 (96,2%)	1 (3,70%)	<0,001	20 (100,0%)	0 (0,0%)	<0,001
	Presente	14 (28,5%)	35 (71,4%)		12 (22,2%)	42 (77,7%)	
12	Ausente	38 (95,0%)	2 (5,0%)	<0,001	21 (95,4%)	1 (4,54%)	<0,001
	Presente	21 (58,3%)	15 (41,6%)		27 (51,9%)	25 (48,0%)	
13	Ausente	61 (87,1%)	9 (12,8%)	0,171	56 (88,8%)	7 (11,1%)	<0,001
	Presente	4 (66,6%)	2 (33,3%)		4 (36,3%)	7 (63,6%)	
14	Ausente	63 (87,5%)	9 (12,5%)	0,001	56 (84,8%)	10 (15,1%)	<0,001
	Presente	1 (25,0%)	3 (75,0%)		2 (25,0%)	6 (75,0%)	
15	Ausente	58 (86,5%)	9 (13,4%)	0,002	49 (83,0%)	10 (16,9%)	0,053
	Presente	4 (44,4%)	5 (55,5%)		9 (60,0%)	6 (40,0%)	
16	Ausente	42 (89,3%)	5 (10,6%)	0,002	30 (88,2%)	4 (11,7%)	0,002
	Presente	17 (58,6%)	12 (41,3%)		22 (55%)	18 (45%)	
17	Ausente	63 (88,7%)	8 (11,2%)	0,252	59 (83,0%)	12 (16,9%)	0,031
	Presente	2 (66,6%)	1 (33,3%)		1 (33,3%)	2 (66,6%)	

Legenda: ¹ Teste Qui-quadrado de Pearson.

5.5 Comparação dos pacientes com mutação em exons menores que o exon 45 e maiores ou igual ao exon 45

De todos os pacientes, apenas 40 apresentaram informação para os exons (mutação detectável no gene da distrofina). Destes, 15 (37,5%) foram classificados como apresentando mutações nos exons < 45.

Pacientes com mutação em exons < 45 apresentaram maior acometimento miocárdico, em média menor fração de ejeção obtida pelo ECO ($52,1 \pm 15,7$ % x $61,6 \pm 7,3$ %; $p=0,021$) e maior IVSF ($43,3 \pm 42,5$ ml/m² x $22,5 \pm 9,5$ ml/m²; $p=0,040$). Este mesmo grupo de pacientes (exons < 45), apresentou maior número de segmentos com fibrose, maior volume de fibrose, massa de fibrose e percentual de fibrose na RMC basal do que o grupo com mutação em exons ≥ 45 . A fração de ejeção avaliada por meio da RMC basal foi inferior a 50% (com média de $48,8 \pm 14,5$ %) nos pacientes com exons < 45 (Tabela 17).

Na RMC seguimento, IVDF, o número de segmentos com fibrose e o percentual de fibrose também foi significativamente maior no grupo com mutação em exons < 45 do que no grupo com mutação nos exons ≥ 45 . A diferença nas medidas de fibrose entre as duas ressonância não apresentou significância nos dois grupos de classificação dos exons. (Tabela 18).

Tabela 17 - Características clínicas do ecocardiograma e da RMC dos pacientes segundo classificação exons - menores que o exon 45 e maiores ou igual ao exon 45

	Classificação exons		P
	Exons < 45 n=15	Exons ≥ 45 n=25	
Idade (anos)	13,5 ± 5,0	13,2 ± 5,5	0,736
Usa cadeira de rodas	7 (46,7%)	16 (64,0%)	0,283
Idade cadeira de rodas (anos)	10,6 ± 2,1	11,3 ± 2,3	0,436
ECG (anormal)	8 (53,3%)	10 (40,0%)	0,412
Raio X (anormal)	2 (13,3%)	2 (8,0%)	0,586
ECO (anormal)	4 (26,7%)	4 (16,0%)	0,414
Arritmia (sim)	4 (26,7%)	4 (16,0%)	0,414
FEVE ECO (%)	52,1 ± 15,7	61,6 ± 7,3	0,021
IVDF ECO (ml/m ²)	78,2 ± 44,7	58,3 ± 14,7	0,184
IVSF ECO (ml/m ²)	43,3 ± 42,5	22,5 ± 9,5	0,040
Índice MASSA ECO (g/m ²)	84,9 ± 55,2	61,4 ± 21,3	0,379
RMC BASAL			
FEVE (%)	48,8 ± 14,5	56,1 ± 7,9	0,078
IVDF (ml/m ²)	87,9 ± 58,1	69,8 ± 19,4	0,364
IVSF (ml/m ²)	50,7 ± 53,6	29,0 ± 10,7	0,108
Índice MASSA (g/m ²)	66,6 ± 21,2	55,5 ± 20,0	0,059
Fibrose	12 (80,0%)	13 (52,0%)	0,077
Nº de segmentos com fibrose	5,6 ± 4,4	2,5 ± 2,8	0,019
Alteração de contratilidade	9 (60,0%)	9 (36,0%)	0,140
Nº de segmentos com alteração de contratilidade	5,6 ± 7,3	3,1 ± 6,2	0,093
Massa de fibrose (g)	20,9 ± 19,3	6,4 ± 8,2	0,012
Volume de fibrose (ml)	18,9 ± 18,4	6,3 ± 8,3	0,013
Percentual de fibrose (%)	27,9 ± 18,4	12,1 ± 13,4	0,006

Legenda: Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson.

Tabela 18 - Características clínicas, do ecocardiograma e da RMC dos pacientes segundo classificação exons - menores que exon 45 e maiores ou igual ao exon 45 (continuação)

	Classificação exons		P
	Exons < 45 n=15	Exons ≥ 45 n=25	
RMC SEGUIMENTO			
FEVE (%)	49,4 ± 12,3	55,3 ± 10,1	0,242
IVDF (ml/m ²)	88,9 ± 32,6	67,6 ± 17,6	0,014
IVSF (ml/m ²)	43,9 ± 29,0	31,3 ± 15,4	0,088
Índice MASSA (g/m ²)	85,1 ± 28,3	73,0 ± 23,9	0,288
Fibrose	10 (76,9%)	15 (60,0%)	0,297
Nº de segmentos com fibrose	6,5 ± 4,1	3,4 ± 3,3	0,012
Alteração de contratilidade	10 (76,9%)	12 (48,0%)	0,087
Nº de segmentos com alteração de contratilidade	6,7 ± 7,4	4,6 ± 7,2	0,129
Massa de fibrose (g)	24,3 ± 25,0	10,4 ± 10,6	0,065
Volume de fibrose (ml)	23,1 ± 23,8	10,1 ± 10,4	0,063
Percentual de fibrose (%)	33,1 ± 21,1	18,8 ± 16,9	0,024
DIFERENÇA			
DIF Massa (g)	7,4 ± 11,2	4,0 ± 5,5	0,317
DIF Volume (ml)	7,0 ± 10,7	3,9 ± 4,8	0,332
DIF Percentual (%)	6,7 ± 7,5	6,7 ± 7,1	0,851
DIF nº de segmentos	1,5 ± 2,5	1,1 ± 1,6	0,503
Eventos	3 (20,0%)	4 (16,0%)	0,747
Óbito	2 (13,3%)	1 (4,0%)	0,327

Legenda: Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson.

5.6 Avaliação prognóstica

A inclusão dos pacientes iniciou-se em 1/0/2009 e a última RMC de seguimento nesta análise foi realizada em 1/6/2012. Dos 76 pacientes, quatro foram a óbito (5,3%) durante o período de acompanhamento. Todos os pacientes que morreram tinham fibrose miocárdica pela RMC. Além disso, estes pacientes eram mais velhos; 3 deles tinham maior disfunção sistólica na RMC basal e maior magnitude da fibrose miocárdica, com diferenças estatisticamente significativas (Tabela 19).

Tabela 19 - Características clínicas dos pacientes que foram a óbito e dos sobreviventes

Características	Óbitos n=4	Sobreviventes n=72	P
Idade (anos)	19,0 ± 5,0	12,8 ± 4,1	0,005
Duchenne	3 (75,0%)	67 (93,1%)	0,192
Becker	1 (25,0%)	5 (6,9%)	
FEVE RMC basal (%)	35,9 ± 16,3	55,5 ± 9,0	<0,001
Nº de segmentos com fibrose	7,5 ± 1,0	3,7 ± 3,3	0,024
Massa de fibrose RMC basal (g)	36,4 ± 16,2	11,0 ± 12,1	<0,001
Volume de fibrose RMC basal (ml)	35,5 ± 15,1	10,6 ± 11,5	<0,001
Percentual de fibrose RMC basal (%)	35,3 ± 4,2	20,6 ± 17,3	0,095

Legenda: Teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Teste Qui-quadrado de Pearson.

Nas Figuras 33, 34 e 35 é apresentada a análise de sobrevida (Kaplan-Meier). Verifica-se que a sobrevida dos pacientes com fração de ejeção normal e alterada (p=0,002) e dos grupos D, SDSF, SDF-NT, SDF-T (p=0,011) não foi semelhante. Já os pacientes com fibrose presente e

ausente apresentaram uma sobrevida semelhante ($p = 0,210$). Quando considerados os eventos combinados, resultados semelhantes foram observados para a fração de ejeção normal e alterada ($p < 0,001$) e nos grupos D, SDSF, SDF-NT, SDF-T ($p < 0,001$), cujos pacientes não apresentaram uma sobrevida semelhante. Verificamos que os pacientes com fibrose presente e ausente não apresentaram uma sobrevida semelhante ($p = 0,041$). Figuras 36, 37 e 38.

Entre os 4 óbitos observados, um paciente com DMB apresentou quadro de insuficiência cardíaca associada a tromboembolismo pulmonar (Figura 39). Dois pacientes com DMD apresentaram insuficiência cardíaca grave, insuficiência respiratória e edema agudo pulmonar. O quarto paciente apresentava fibrose miocárdica sem disfunção sistólica, mas fazia uso de IECA. Este paciente apresentava leve insuficiência respiratória agravada no evento final por quadro infeccioso pulmonar.

Com relação aos demais eventos cardiovasculares maiores monitorizados neste estudo, foram identificados 8 pacientes com quadro de arritmia cardíaca importante necessitando avaliação e/ou internação. Não foi observado nenhum outro evento cardiovascular maior como internação por insuficiência cardíaca, infarto miocárdico fatal e não fatal ou acidente vascular cerebral.

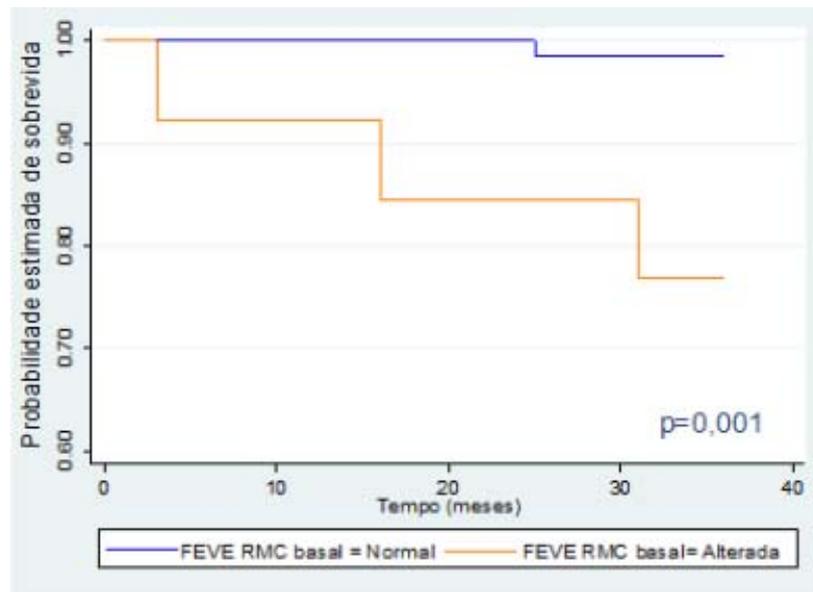


Figura 33 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes com fração de ejeção normal e alterada na RMC basal

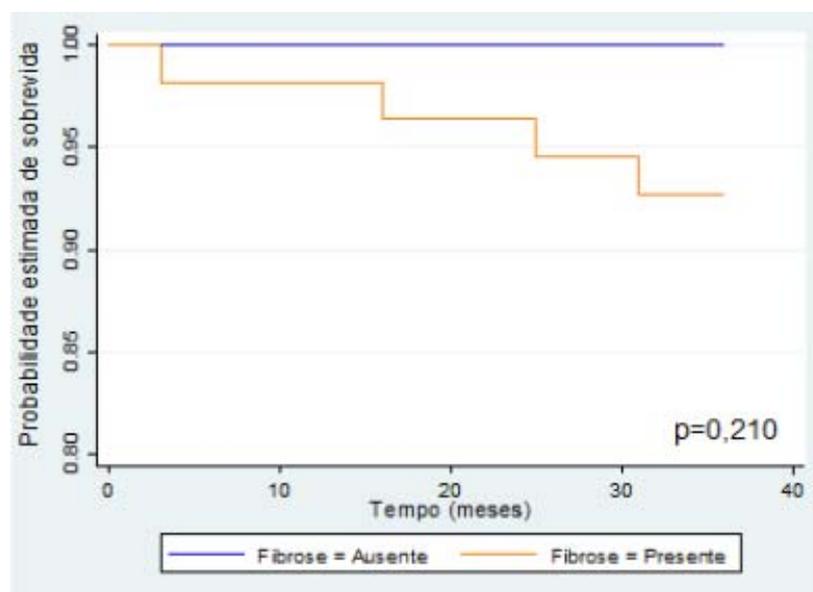


Figura 34 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes com fibrose presente e ausente

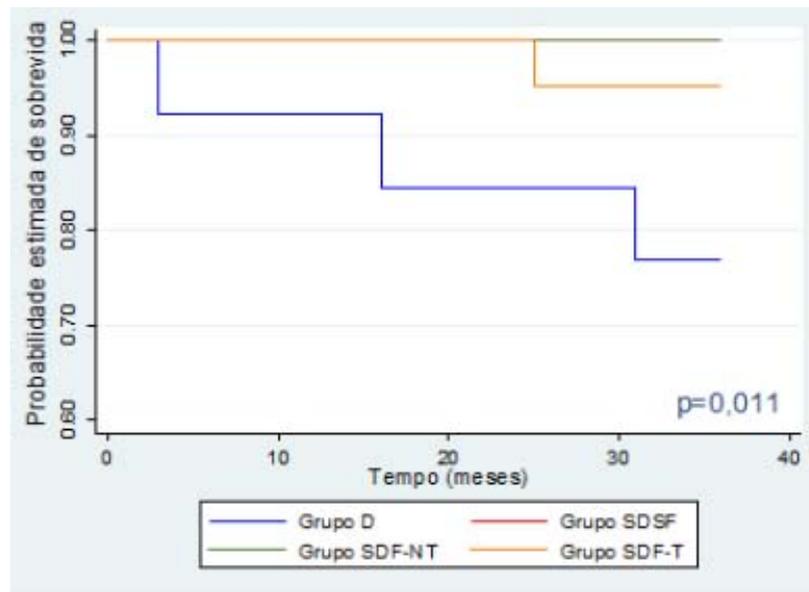


Figura 35 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes segundo os grupos D, SDSF, SDF-NT, SDF-T

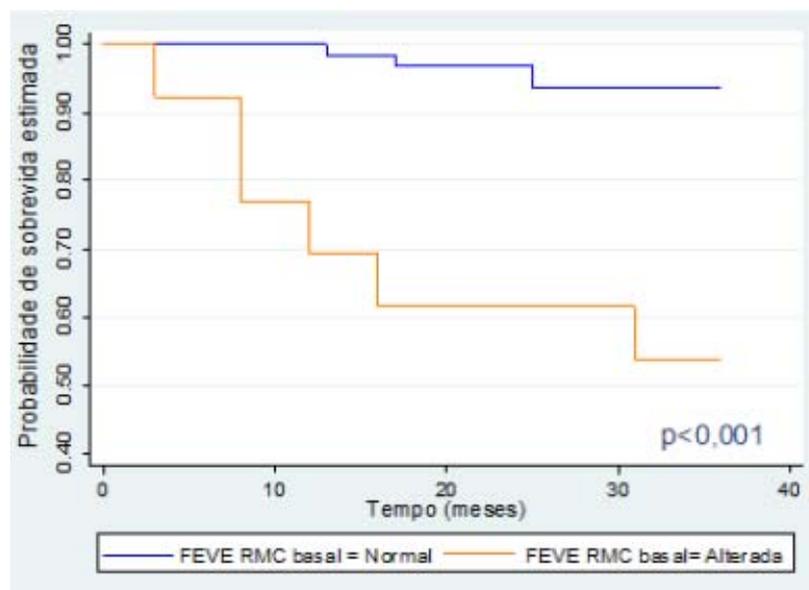


Figura 36 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida, em relação aos eventos combinados, dos pacientes com fração de ejeção normal e alterada na RMC basal

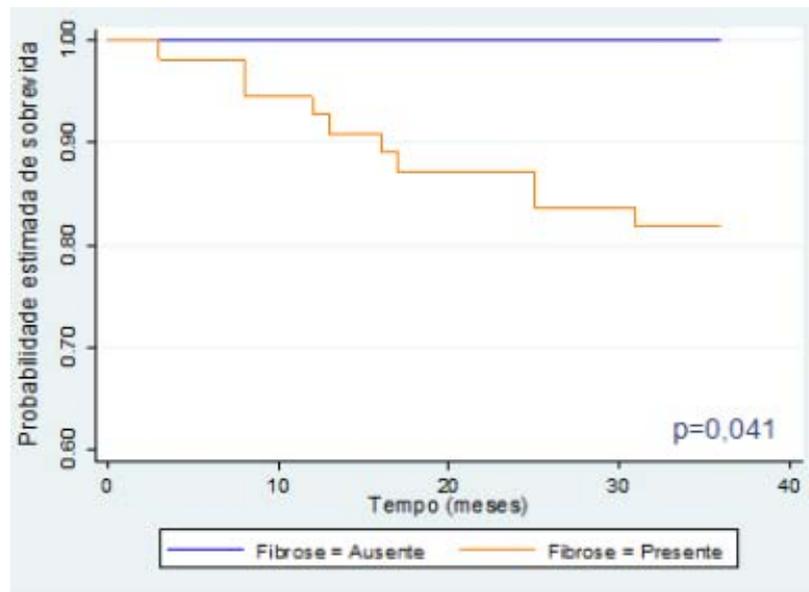


Figura 37 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes com fibrose presente e ausente em relação aos eventos combinados

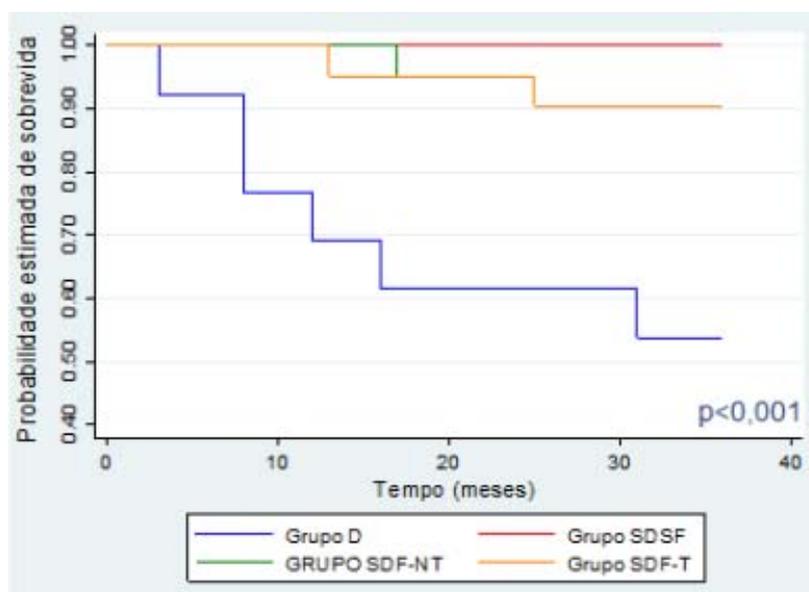


Figura 38 - Gráfico de Kaplan-Meier comparando a sobrevida dos pacientes segundo os grupos D, SDSF, SDF-NT, SDF-T, em relação aos eventos combinados

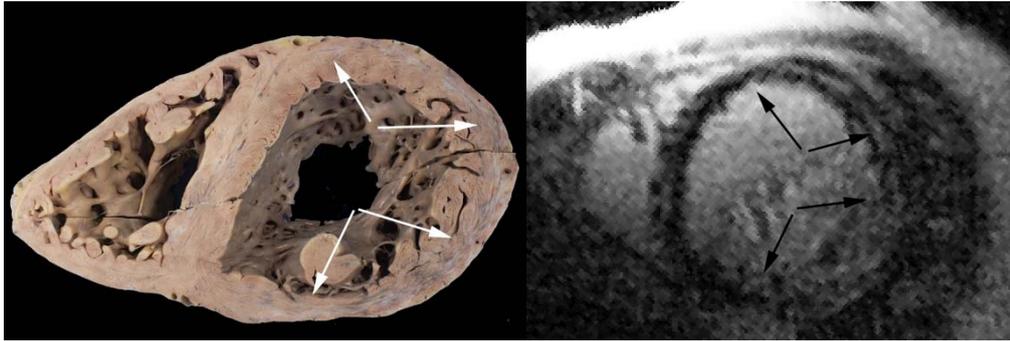


Figura 39 - Imagens de paciente portador de distrofia muscular de Becker que foi a óbito demonstrando fibrose miocárdica no mesmo corte e segmento na peça de anatomia patológica e RMC – predomínio dos segmentos laterais

6 Discussão

No presente estudo, utilizando a análise de imagens produzidas pela ressonância magnética cardíaca através das técnicas de cine ressonância e de realce tardio, demonstramos que é possível diagnosticar precocemente o acometimento miocárdico na distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker. Pela quantificação da fibrose miocárdica notada na ressonância magnética cardíaca, demonstramos que a fibrose está presente em todas as faixas etárias e evolui significativamente até a faixa etária de 15 a 16 anos sendo que após esta faixa, a evolução é menos significativa. Demonstramos ainda que os pacientes com fibrose miocárdica e sem disfunção sistólica apresentaram menor evolução da fibrose quando tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina do que os pacientes com fibrose e sem disfunção sistólica não tratados. Finalmente, demonstramos uma correlação entre o local da mutação e o acometimento cardíaco. Os pacientes com mutação nos exons menores que 45 apresentaram maior acometimento miocárdico (FEVE reduzida e parâmetros de fibrose) e os pacientes com exons maiores ou iguais ao 45 apresentaram possível cardioproteção.

6.1 Distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker e envolvimento cardíaco

Como relatado anteriormente, estudos clínicos de cardiomiopatia têm demonstrado que o processo de acometimento cardíaco nestes tipos de distrofia aparece muito antes do aparecimento de sinais de insuficiência cardíaca^{9,23,25,92}, sendo que a maior parte dos pacientes em cadeiras de rodas não apresenta sintomas de acometimento cardíaco. O envolvimento cardíaco desenvolve-se insidiosamente durante a primeira década de vida e, mesmo com disfunção sistólica acentuada, a ausência de manifestações clínicas pode se estender até a segunda década de vida em alguns pacientes devido a importante restrição de mobilidade a que estão sujeitos^{24,27,21}. Este fato dificulta sobremaneira qualquer tentativa de enquadrar os pacientes na classificação funcional do NYHA, baseadas nos sintomas de ICC relacionados ao esforço.

Estudo em 328 pacientes, com avaliação clínica, eletrocardiográfica, radiográfica e ecocardiográfica por um período de 3 a 11 anos demonstrou que 75 % dos pacientes não apresentaram sinais de cardiomiopatia antes dos 18 anos e que após 18 anos todos apresentam algum sinal de comprometimento cardíaco. Notou-se, contudo, que somente 57% dos pacientes com sinais de comprometimento cardíaco apresentaram sintomas de doença cardíaca²⁴. Estudo realizado com avaliação ecocardiográfica em pacientes com DMD, demonstrou que 21% dos pacientes com idade superior a 14 anos apresentaram redução da fração de ejeção, não se

relacionando porém com a gravidade dos sintomas musculoesqueléticos³². Em estudo com 28 pacientes com DMD, a prevalência de anormalidades ao ECG foi de 71%¹³⁹. Em outro estudo, entre 30 pacientes com DMD, somente 7 pacientes revelaram aumento do índice cardiotorácico no estágio final da doença¹⁴⁰.

No presente estudo, 49% dos pacientes fizeram uso da cadeira de rodas por volta de 12 anos em concordância com a literatura¹⁸. Estes pacientes tiveram significativa presença de fibrose miocárdica, mas não há associação entre a idade do início do uso da cadeira de rodas e a queda da FEVE, que ocorre mais tardiamente (conhecida ausência de associação entre o acometimento cardíaco detectado por meio de alterações eletrocardiográficas, ecocardiográficas e acometimento musculoesquelético^{32,141}). Do grupo de pacientes com disfunção sistólica (FEVE < 50%), 84,6% já usavam cadeira de rodas, estando estes pacientes em faixa etária mais avançada. Quanto à significativa presença de fibrose miocárdica nos pacientes em uso da cadeira de rodas, acreditamos estar relacionada também com a faixa etária em que estes pacientes se situaram. Este estudo demonstrou que as medidas quantificadoras da fibrose miocárdica evoluíram significativamente até a faixa etária de 15-16 anos, idade em que a maioria dos pacientes já fazia uso de cadeira de rodas e em que o processo distrófico já estava bastante avançado. Até o presente momento não há estudo publicado correlacionando a idade em que os pacientes iniciam o uso da cadeira de rodas e a fibrose miocárdica notada na RMC. No presente

estudo, não há relação significativa entre o uso de cadeiras de rodas e a classificação da mutação (exons acometidos).

O eletrocardiograma foi alterado em 40,8% dos pacientes, a maioria no grupo com disfunção sistólica, prevalência inferior a estudo publicado anteriormente em que o número foi de 71%¹³⁹. Os eletrocardiogramas no nosso estudo foram realizados em diversos locais de acordo com a disponibilidade do SUS em atender estes pacientes. A radiografia de tórax apresentou índice cardiotorácico superior a 50% em 7,9 % dos pacientes, em concordância com a literatura¹⁴⁰.

Quanto à fração de ejeção do ventrículo esquerdo, avaliada por meio do ecocardiograma bidimensional com Doppler colorido convencional (com ausência de estudo de Doppler tecidual), no nosso estudo houve alteração em 15,78 % dos pacientes, acometendo o grupo com idade em torno de 18 anos. Não houve alteração de contratilidade segmentar pelo ecocardiograma bidimensional com Doppler colorido convencional. Houve concordância com estudos publicados quanto à faixa etária, mas a frequência da redução da fração de ejeção foi um pouco menor^{24,32}. Ressalte-se que, usando técnicas de Doppler tecidual e taxas de deformidade miocárdica, estudos publicados sugerem distúrbios contráteis segmentares ocultos em pacientes com DMD e DMB^{93,94}. O ecocardiograma porém, depende da janela acústica e os pacientes com DMD apresentam deformidade torácica progressiva dificultando a realização de um exame de qualidade, principalmente para diagnóstico de alteração da contratilidade segmentar²¹.

No nosso estudo, houve correlação positiva entre as medidas da FEVE pela RMC basal e pelo ECO bidimensional com Doppler colorido, sendo que os pacientes com disfunção sistólica apresentaram idade média de 19 anos, concordando com descrição prévia na literatura ^{24,32}. Notamos ausência de disfunção sistólica (FEVE < 50%) entre 6 e 14 anos.

Ashford *et al.* estudaram pacientes com DMD e demonstraram disfunção cardíaca oculta por meio da técnica *myocardial tagging* da RMC com alteração de contratilidade segmentar principalmente nas paredes lateral e inferior ²³. Estudo prévio realizado por nosso grupo em 10 pacientes demonstrou alteração de contratilidade segmentar por meio da RMC em 14% dos segmentos avaliados, acometendo principalmente as paredes inferior e lateral ⁹. No presente estudo, com uma amostra muito mais significativa, 52,6% dos pacientes apresentaram alteração de contratilidade segmentar, sendo que entre os pacientes com FEVE alterada, 100 % apresentaram esta alteração e entre os pacientes com FEVE normal, 66% apresentaram alteração de contratilidade segmentar. Os segmentos mais acometidos foram principalmente os das paredes lateral e inferior. Outros estudos foram publicados nos três últimos anos e também confirmaram estes achados ^{90,92,142}. A alteração de contratilidade segmentar já demonstra significativa presença de acometimento miocárdico, por meio da técnica de cine ressonância, em pacientes com FEVE normal na distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker.

6.2 Avaliação da fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca

Estudos prévios investigaram o envolvimento cardíaco em DMD e DMB e demonstraram, por meio de análises anatomopatológicas, que o envolvimento cardíaco nestas patologias é representado pela substituição de fibras cardíacas por tecido conectivo e gorduroso^{29,30}. Estudos histológicos têm demonstrado que fibras cardíacas de Purkinje apresentam necrose similar à notada nos músculos esqueléticos^{31,60}. Estudo anatomopatológico realizado por Frankel *et al* demonstraram evidências de fibrose epimiocárdica na parede livre do ventrículo esquerdo pela microscopia¹⁴³.

Como descrito anteriormente, a ressonância magnética cardíaca, usando a técnica de realce tardio, é precisa na caracterização tecidual miocárdica em regiões com infarto e/ou fibrose, identificando até mesmo pequenas áreas de infarto, não detectadas por outros métodos de imagem, devido à sua alta resolução espacial^{81,101,102,112,113,114}. O estudo do realce tardio miocárdico por meio da RMC passou a ser utilizado também em várias outras cardiomiopatias não isquêmicas, fornecendo importante contribuição no diagnóstico diferencial destas doenças^{9,10,83,86,103,104,105,106,107,108,109}. Na distrofia muscular progressiva, nosso grupo publicou o primeiro estudo na literatura mundial demonstrando fibrose miocárdica pela RMC nestes pacientes⁹. No presente estudo, utilizamos a ressonância magnética com a técnica de realce tardio para identificar a fibrose miocárdica e programa específico de computação para quantificá-la nos pacientes com distrofia

muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker. Avaliamos, também, a progressão da fibrose miocárdica com intervalo de 2 anos quando a segunda RMC foi realizada.

A presença de fibrose miocárdica, predominantemente em segmentos laterais e inferiores e de padrão meso-epicárdico, detectada pela ressonância magnética em jovens pacientes com diagnóstico de DMD e DMB com ausência de sinais de acometimento cardíaco pelos métodos tradicionais, foi pioneiramente demonstrada por nosso grupo em 2007⁹. Puchalski *et al.* em 2009, estudando 74 pacientes com DMD, e média de idade de 13 anos, demonstraram que 32% dos pacientes apresentaram fibrose miocárdica, diagnosticada por meio da ressonância magnética, envolvendo a região posterolateral com distribuição subepicárdica⁹⁰.

Nossos dados foram consistentes para demonstrar a presença de fibrose miocárdica, diagnosticada por meio da técnica de realce tardio da ressonância magnética cardíaca em 72,3 % dos pacientes com maior acometimento dos pacientes em faixas etárias mais altas, notando-se, porém, que todas as faixas etárias estudadas apresentaram fibrose miocárdica. Houve uma forte relação entre faixa etária e presença de fibrose miocárdica, em concordância com alguns estudos publicados^{9,90}. O padrão de fibrose foi predominantemente meso-epicárdico, sendo que este padrão esteve presente em 81,7% dos segmentos na RMC basal em concordância com trabalho publicado por nosso grupo que identificou padrão atípico (meso- epicárdico) em 89% dos segmentos com fibrose⁹. Quanto à fibrose segmentar, demonstramos que os segmentos laterais do ventrículo

esquerdo com maior frequência, e os segmentos inferiores com menor frequência, foram mais acometidos. Estes segmentos com fibrose apresentaram também maior alteração de contratilidade segmentar, em concordância com trabalhos prévios publicados^{9,90}.

Em um estudo envolvendo 68 pacientes com DMB, Nigro *et al.* (1995)²⁷ demonstraram que por volta dos 30 anos, todos os pacientes apresentaram evidências clínicas ou subclínicas de envolvimento cardíaco, sendo que 44% apresentaram cardiomiopatia dilatada. Yilmaz *et al.* (2008)⁹², estudaram 15 pacientes com DMB por meio da RMC, com média de idade de 37 anos e notou que 73,3% dos pacientes apresentaram fibrose miocárdica. No nosso estudo, dos 6 pacientes com DMB, apenas 1 (23 anos) não apresentou fibrose miocárdica nos dois exames de RMC. A frequência de fibrose miocárdica nestes pacientes foi de 83,3%. Ressalte-se, porém, que o pequeno número de pacientes com DMB pode não dar significância para nossos achados.

Dos 55 pacientes que apresentaram fibrose miocárdica na RMC basal, somente 13 (27,3%) apresentaram fração de ejeção alterada ao ecocardiograma, estando esses pacientes na faixa etária superior a 15 anos. Como na prática clínica o ecocardiograma alterado (FEVE < 50%) é considerado como gatilho para início do tratamento da cardiomiopatia na DMD e DMB, 72,7 % dos pacientes com acometimento miocárdico, notado apenas por meio da técnica de realce tardio da RMC, não receberiam tratamento precoce, visando retardar o remodelamento miocárdico negativo.

6.3 Evolução do fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca

Neste estudo, fazendo-se a análise comparativa das faixas etárias, notamos que a fibrose diagnosticada por meio da técnica de realce tardio da ressonância magnética cardíaca evoluiu significativamente até a faixa etária de 15 a 16 anos. Dos 17 aos 28 anos a evolução da fibrose apresentou médias próximas às da faixa etária anterior. Uma provável explicação para estes achados é a presença de maior volume de músculo em pacientes mais jovens, que sofrem o processo degenerativo próprio da falta de distrofina (essencial para regenerar as fibras musculares). Não há estudos anteriores relacionando a evolução da fibrose miocárdica com as diversas faixas etárias. Esta hipótese é corroborada pelo comportamento dos valores da enzima CK na DMD, que é resultado da progressiva eliminação de fibras musculares distróficas - fonte de elevada concentração desta enzima^{70 71}. Como consequência da degeneração muscular progressiva, há um acentuado aumento dos valores da enzima CK nos primeiros anos de vida e um decréscimo do aumento com o passar dos anos^{70,71}. Os achados do nosso estudo são concordantes com os estudos prévios e demonstram tendência significativa para a diminuição da média dos valores de CK com o aumento da faixa etária, sendo que os pacientes entre 6 e 12 anos apresentaram valores de CK bastante elevados.

Em análise de regressão linear múltipla demonstramos que a fibrose na RMC basal e os valores de CK total foram preditores independentes da

progressão da fibrose miocárdica em toda a nossa população, sendo que os valores de CK apresentaram coeficiente negativo. Estes achados corroboram os estudos que descreveram o decréscimo nos valores de CK com o avançar da idade ^{70,71} e os nossos dados demonstram correlação negativa entre os valores de CK e a progressão da fibrose miocárdica diagnosticada por meio da RMC.

6.4 Relação da fibrose miocárdica com a mutação nos exons menores que o 45 e maiores ou igual ao 45

Jefferies *et al.* (2005) estudaram 47 pacientes com DMD e DMB, com mutação no estudo genético do DNA, e relataram significativa associação entre a cardiomiopatia diagnosticada pela queda da fração de ejeção ao ecocardiograma e o tipo de mutação genética. A cardiomiopatia esteve significativamente associada à mutação nos exons 12 e de 14 a 17 e houve tendência de associação à mutação entre os exons 31 a 42. Este estudo sugeriu, também, possível cardioproteção associada à mutação nos exons 51 e 52, sendo que nenhum dos pacientes com mutação nos exons 53, 54, 68 e 71 teve cardiomiopatia. Vários estudos têm relacionado as isoformas da distrofina ao padrão de expressão nos diversos tecidos e demonstraram que as isoformas Dp 140 e Dp 116 não se expressam no miocárdio. A Dp 140 é transcrita a partir do exon 45 e a Dp 116 é transcrita a partir do exon 56

Como muitos pacientes deste estudo apresentaram mutação em vários exons e, com base nos importantes achados citados anteriormente, arbitramos por classificar os pacientes com mutações no exame de DNA em dois grupos, um abaixo do exon 45 e outro maior ou igual ao exon 45.

Os pacientes com mutação em exons < 45 apresentaram maiores medidas que quantificam a fibrose miocárdica do que os pacientes com mutação nos exons ≥ 45 tanto na RMC basal quanto na segunda RMC. A média da fração de ejeção avaliada pelo ecocardiograma e pela ressonância magnética foi menor nos pacientes com mutação nos exons menores que 45. Não houve relação entre o uso de cadeira de rodas e o tipo de mutação com a presença de óbitos e eventos.

Os nossos dados demonstram que 21 (27,7%) pacientes não apresentaram fibrose miocárdica, diagnosticada por meio da técnica de realce tardio da ressonância cardíaca, estando 16 na faixa etária de 6 a 12 anos e 5 na faixa etária de 13 a 28 anos, sendo que 12 destes 21 pacientes apresentaram DNA com mutação em exon ≥ 45 . Como descrito anteriormente, todas as faixas etárias apresentaram fibrose miocárdica e isto nos leva a supor a provável cardioproteção nestes casos.

De todos os pacientes, 3 irmãos com DMD e alterações musculoesqueléticas importantes não apresentaram fibrose miocárdica, aferida por meio da técnica de realce tardio da ressonância cardíaca, não havendo correlação nestes casos, com a baixa faixa etária, pois dois deles tinham 16 e 19 anos, idade em que a maioria dos pacientes apresentou fibrose miocárdica. Esta família apresentou deleção nos exons 63 a 76. Não

temos dados suficientes para relacionar cada grupo de exons com a fibrose miocárdica, mas baseado na descrição prévia de cardioproteção por Jefferies *et al.* ⁴⁹ e na nossa classificação de mutação dos exons e sua relação com fibrose miocárdica, podemos inferir que esta família provavelmente apresenta cardioproteção.

6.5 Resposta ao tratamento de pacientes com fibrose miocárdica

Os IECA constituem um grupo de fármacos com comprovados benefícios na evolução de pacientes com insuficiência cardíaca, tanto em relação à morbidade como à mortalidade (III Diretriz Brasileira de IC Crônica, 2009). As ações que mais se associam aos seus efeitos cardiovasculares resultam na diminuição da formação da angiotensina II (vasoconstrictor) e do acúmulo de bradicinina (vasodilatador). Uma das consequências diretas da diminuição da angiotensina II inclui o efeito trófico na musculatura lisa dos vasos, nas células miocárdicas e fibroblastos ¹⁴⁴. Vários estudos têm sugerido o uso do IECA como importante ferramenta para prevenir a perda da função contrátil do ventrículo esquerdo na distrofia muscular progressiva ^{49,119,145}, mas a época ideal para o início do tratamento ainda não foi bem definida, provavelmente pela falta de métodos sensíveis para identificar o acometimento cardíaco precoce como sugeriu Duboc *et al.* em 2005 ¹¹⁹. O presente estudo usou a ressonância magnética cardíaca, por meio da técnica de realce tardio, como importante ferramenta para diagnosticar

fibrose miocárdica, mesmo em pequenas quantidades, em todas as faixas etárias. Acrescente-se a isto o fato que a ressonância magnética cardíaca nos possibilitou avaliar a função ventricular esquerda mesmo em pacientes com deformidades torácicas acentuadas. Estes achados nos possibilitaram selecionar os pacientes que tinham fibrose miocárdica e não tinham disfunção sistólica e dividirmos em dois grupos randomizados para tratamento e com ausência de tratamento, como descritos anteriormente. O grupo que recebeu IECA em dose otimizada por 2 anos, com idade média de 13 anos, apresentou menor evolução nos parâmetros que quantificam a fibrose miocárdica do que o grupo que não recebeu tratamento. Não há descrição prévia de tratamento randomizado relacionado com a evolução da fibrose miocárdica diagnosticada pela ressonância magnética. O nosso estudo vem confirmar a importância da ressonância magnética cardíaca como método para identificar os sinais de acometimento miocárdico precoce e demonstra a importância do tratamento precoce na DMD e DMB. Estudo em 56 pacientes, publicado em 2007 por Duboc *et al.*¹²⁰, que administrou perindopril (IECA) a um grupo de 28 pacientes com FEVE normal no estudo cintilográfico, comparou com um grupo de 29 pacientes que usaram placebo e após 10 anos de follow-up demonstrou que houve queda significativa ($p = 0,02$) da mortalidade no grupo que fez uso de perindopril. A faixa etária inicial deste estudo foi de 9,5 – 13 anos. Duboc demonstrou a importância do tratamento precoce na redução da mortalidade nos pacientes com DMD, mas como no nosso estudo demonstramos que 27,6 % dos pacientes não apresentaram fibrose miocárdica, torna-se importante a identificação dos

pacientes com acometimento cardíaco, por meio da RMC, para tratarmos apenas os pacientes com cardiomiopatia.

Fizemos uma análise pareada para avaliar a evolução da fibrose em cada grupo, por meio da RMC de seguimento após 2 anos da primeira RMC, e observamos que a fibrose evoluiu significativamente no grupo com disfunção sistólica, sendo que estes pacientes receberam carvedilol, IECA e em poucos casos em que a FEVE foi inferior a 30%, espirolactona. Notamos, também, que não houve melhora significativa da fração de ejeção do ventrículo esquerdo neste período de seguimento. A fibrose miocárdica extensa determinou um remodelamento miocárdico desfavorável neste grupo de pacientes e o tratamento não interferiu na sua evolução. Quanto ao grupo randomizado tratado, a evolução do percentual de fibrose não apresentou significância estatística após 2 anos de tratamento. A evolução do percentual de fibrose no grupo não tratado foi significativamente maior que no grupo tratado.

Em análise de regressão linear múltipla, demonstramos que o grupo randomizado e tratado com IECA é preditor da progressão da fibrose, mas com coeficiente negativo – o uso de IECA prediz a redução da progressão da fibrose miocárdica. Em análise de regressão logística, demonstramos que o progredir da idade e o aumento do percentual de fibrose aumentam a chance de todos os pacientes apresentarem fração de ejeção alterada. Os pacientes do grupo randomizado e tratado apresentaram menor chance de FEVE alterada com um p de tendência. Estes dados sugerem que a progressão da fibrose miocárdica e a fração de ejeção de VE alterada se

correlacionam positivamente com o avançar dos anos, e que os pacientes tratados com IECA são beneficiados com a menor evolução da fibrose miocárdica e da disfunção sistólica.

Quanto ao uso de glicocorticóides, 68,4% dos pacientes do nosso estudo fizeram uso deste tipo de medicamento, mas não houve interferência na evolução da fibrose em discordância com estudo publicado por Markham *et al.* em 2005 que pesquisou retrospectivamente 111 pacientes com idade média de 21 anos e concluiu que os pacientes que receberam glicocorticóides apresentaram maior fração de ejeção ao ecocardiograma do que os que não receberam ¹⁴⁶. Outro estudo retrospectivo publicado por Hor *et al.* em 2011 em 171 pacientes, sugeriu que o uso de glicocorticóides associado ao uso de IECA é ineficaz para a prevenção da disfunção sistólica em pacientes com DMD ¹⁴⁷. Este estudo de Hor *et al.* é concordante e se assemelha mais ao presente estudo, pois usou a ressonância magnética cardíaca com técnica de *strain* para avaliar a função miocárdica.

6.6 Relação da fibrose miocárdica com óbitos e eventos

Oito pacientes apresentaram eventos cardiovasculares e quatro pacientes foram a óbito durante o período deste estudo (36 meses). Todos os pacientes apresentaram fibrose miocárdica, sendo que três deles têm disfunção sistólica acentuada. Um dos pacientes estava no grupo randomizado tratado e apresentou redução do percentual de fibrose em

relação à primeira RMC. No entanto, apresentava insuficiência respiratória leve que foi agravada por infecção pulmonar no evento final.

Estudos têm demonstrado redução da mortalidade por causa respiratória, com o incremento da função respiratória por meio do uso de ventilação noturna e cirurgias na coluna, e aumento por causas cardíacas^{2,8,19,148}. No nosso estudo, o número de óbitos foi muito pequeno, mas a maioria apresentou disfunção sistólica acentuada, agravada por outras comorbidades em aparente concordância com os estudos citados. Entretanto, a amostragem dos nossos pacientes é oriunda de hospital público, muitos habitam em zona rural, dependem dos benefícios do SUS e poucos têm acesso à ventilação noturna como também às práticas cirúrgicas mais complexas. Além do pequeno número de óbitos no presente estudo, apenas um dos pacientes que foi a óbito usava ventilação noturna e nenhum deles fez cirurgia na coluna, impossibilitando a comparação entre duas causas de mortalidade.

7 Conclusões

1. O ensaio clínico randomizado de pacientes com distrofia muscular progressiva nas formas de Duchenne e Becker com fibrose miocárdica e FEVE preservada, diagnosticada pela ressonância magnética cardíaca, demonstrou progressão significativamente maior de fibrose miocárdica no período de 2 anos nos pacientes sem tratamento com inibidor da enzima conversora da angiotensina II, quando comparados aos pacientes tratados.
2. A mutação em exons menores que 45 do gene da distrofina associou-se a maior extensão da fibrose miocárdica e menor fração de ejeção ventricular esquerda, diagnosticadas pela ressonância magnética cardíaca, quando comparadas aos pacientes com mutação em exons maiores ou iguais ao 45.
3. As alterações eletrocardiográficas, radiográficas e ecocardiográficas em conjunto apresentaram sensibilidade (47%) e valor preditivo negativo (34%), baixos para detecção de envolvimento miocárdico definido como presença de realce tardio pela ressonância magnética cardíaca. As alterações foram mais frequentes na presença de disfunção sistólica do VE.

8 Anexos

Tabela 20 - Análise descritiva das características clínicas dos pacientes

Características	
Idade (anos)	13,1 ± 4,4
Peso (kg)	45,6 ± 16,4
Altura (m)	1,5 ± 0,2
IMC (kg/m ²)	19,6 ± 4,4
CK (UI)	10035 ± 7305
Biópsia muscular	43 (56,6%)
DNA	49 (64,5%)
Duchenne	70 (92,1%)
Becker	6 (7,9%)
Usa cadeira de rodas	49 (64,5%)
Idade cadeira de rodas (anos)	11,1 ± 2,3
ECG (anormal)	31 (40,8%)
Raio X (anormal)	6 (7,9%)
ECO (anormal)	12 (15,78%)
Arritmia (sim)	13 (17,1%)
Uso de esteroides	52 (68,4%)
Eventos	8 (10,5%)
Óbito	4 (5,3%)

Tabela 21 - Análise descritiva dos parâmetros do ecocardiograma e RMC basal

Características	
ECOCARDIOGRAMA	
FEVE (%)	60,2 ± 11,3
IVDF (ml/m ²)	61,5 ± 26,2
IVSF (ml/m ²)	26,4 ± 23,1
Índice MASSA (g/m ²)	64,3 ± 32,0
DDF (mm)	42,4 ± 8,6
DSF (mm)	29,1 ± 9,5
PPVE (mm)	6,6 ± 1,5
SIV (mm)	6,6 ± 1,4
RMC BASAL	
FEVE (%)	54,5 ± 10,3
IVDF (ml/m ²)	70,7 ± 32,7
IVSF (ml/m ²)	33,8 ± 28,1
Índice MASSA (g/m ²)	58,4 ± 21,7
DDF (mm)	43,8 ± 9,3
DSF (mm)	31,8 ± 10,4
PPVE (mm)	7,1 ± 1,6
SIV (mm)	7,2 ± 1,2
Fibrose	55 (72,4%)
Nº de segmentos com fibrose	3,9 ± 3,3
Alteração de contratilidade	40 (52,6%)
Nº de segmentos com alteração de Contratilidade	3,5 ± 5,8
Massa de fibrose (g)	12,3 ± 13,5
Volume de fibrose (ml)	11,9 ± 12,9
Percentual de fibrose (%)	21,2 ± 17,3

Tabela 22 - Análise descritiva dos parâmetros do RMC seguimento

Características	
RMC SEGUIMENTO	
FEVE (%)	52,2 ± 9,9
IVDF (ml/m ²)	74,0 ± 26,1
IVSF (ml/m ²)	36,1 ± 21,7
Índice MASSA (g/m ²)	75,7 ± 26,8
DDF (mm)	45,5 ± 9,5
DSF (mm)	34,0 ± 8,7
PPVE (mm)	7,1 ± 1,4
SIV (mm)	7,0 ± 1,3
Fibrose	56 (75,7%)
Nº de segmentos com fibrose	5,1 ± 3,6
Alteração de contratilidade	48 (64,9%)
Nº de segmentos com alteração de Contratilidade	4,5 ± 6,4
Massa de fibrose (g)	15,9 ± 15,4
Volume de fibrose (ml)	15,4 ± 14,9
Percentual de fibrose (%)	26,7 ± 18,5

Tabela 23 - Análise de correlação entre idade e alguns parâmetros indicativos de doença mais avançada

	Correlação de Spearman (Idade)	P
FEVE ECO(%)	-0,451	<0,001
IVDF ECO (ml/m ²)	0,101	0,387
IVSF ECO (ml/m ²)	0,238	0,038
Índice MASSA ECO(g/m ²)	0,247	0,031
DDF ECO (mm)	0,617	<0,001
DSF ECO (mm)	0,579	<0,001
FEVE RCM basal (%)	-0,572	<0,001
IVDF RCM basal (ml/m ²)	0,266	0,020
IVSF RCM basal (ml/m ²)	0,446	<0,001
Índice MASSA RCM basal (g/m ²)	0,146	0,208
DDF RCM basal (mm)	0,655	<0,001
DSF RCM basal (mm)	0,692	<0,001
Nº de segmentos fibrose RCM basal	0,344	0,002
Nº de segmentos contratilidade RCM basal	0,488	<0,001
Massa de fibrose RCM basal (g)	0,524	<0,001
Volume de fibrose RCM basal (ml)	0,524	<0,001
Percentual de fibrose RCM basal (%)	0,338	0,012

Tabela 24 - Comparação de médias da idade segundo óbito, eventos, cadeira de roda e presença de fibrose RMC basal

	Média ± desvio-padrão	valor-p
Óbito		
Não	12,8 ± 4,1	0,013
Sim	19,0 ± 5,0	
Eventos		
Não	12,8 ± 4,4	0,012
Sim	15,9 ± 2,5	
Está na cadeira de rodas?		
Não	12,9 ± 4,5	0,006
Sim	13,4 ± 4,2	
Fibrose RMC basal		
Não	11,2 ± 4,2	0,008
Sim	13,8 ± 4,3	

Legenda: ¹Teste t para comparação médias.

Tabela 25 - Distribuição de frequência e comparação dos segmentos do AHA com fibrose

	Segmentos do AHA com fibrose RMC basal (n =74)		Segmentos do AHA com fibrose RMC seguimento (n = 74)		p ¹
	Ausente (%)	Presente (%)	Ausente (%)	Presente (%)	
1	93,2	6,8	90,5	9,5	0,500
2	96,0	4,0	94,6	5,4	1,000
3	96,0	4,0	95,9	4,1	1,000
4	82,4	17,6	70,3	29,7	0,035
5	47,3	52,7	32,5	67,5	0,001
6	58,1	41,9	43,2	56,8	0,007
7	89,2	10,8	83,8	16,2	0,219
8	89,2	10,8	89,2	10,8	1,000
9	83,8	16,2	78,4	21,6	0,289
10	71,6	28,4	60,8	39,2	0,076
11	36,5	63,5	27,0	73,0	0,016
12	51,3	48,7	29,7	70,3	<0,001
13	91,9	8,1	85,1	14,9	0,125
14	94,6	5,4	89,2	10,8	0,219
15	90,5	9,5	79,7	20,3	0,039
16	60,8	39,2	45,9	54,1	0,001
17	95,9	4,1	95,9	4,1	1,000

Legenda: ¹Teste McNamer.

Tabela 26 - Distribuição de frequência dos segmentos (classificação da AHA) com alteração de contratilidade

	Segmentos com alteração de contratilidade RMC basal (n =74)		Segmentos com alteração de contratilidade RMC seguimento (n = 74)		p ¹
	Normal (%)	Anormal (%)	Normal (%)	Anormal (%)	
1	85,1	14,9	78,4	21,6	0,062
2	87,8	12,2	81,1	18,9	0,062
3	87,8	12,2	81,1	18,9	0,062
4	86,5	13,5	79,7	20,3	0,062
5	64,9	35,1	52,7	47,3	0,004
6	75,7	24,3	68,9	31,1	0,062
7	86,5	13,5	79,7	20,3	0,062
8	83,8	16,2	77,0	23,0	0,125
9	85,1	14,9	78,4	21,6	0,062
10	81,1	18,9	71,6	28,4	0,016
11	54,1	45,9	43,2	56,8	0,021
12	79,7	20,3	64,9	35,1	0,003
13	87,9	12,1	81,1	18,9	0,062
14	86,5	13,5	78,4	21,6	0,031
15	83,8	16,2	78,4	21,6	0,219
16	79,7	20,3	70,3	29,7	0,016
17	87,8	12,2	81,1	18,9	0,062

Legenda : ¹Teste McNamer.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

Para pacientes de 4-18 anos incompletos

1.NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO: BAIRRO:

CIDADE CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO: BAIRRO:

CIDADE: CEP:

TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Diagnóstico da Cardiomiopatia na Distrofia Muscular Progressiva por Ressonância Magnética Cardiovascular – Correlação com Tratamento, Prognóstico e Preditores Genéticos.

PESQUISADOR : .Carlos Eduardo Rochitte.....

CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente da Coordenação de Diagnóstico por Imagem

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .70296.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Diagnóstico por Imagem do Instituto do Coração – InCor – HCFMUSP

PESQUISADOR: Marly Conceição Silva

CARGO/FUNÇÃO: Aluna da pós-graduação do InCor – HCFMUSP e Médica ecocardiografista e do setor de Tomografia e Ressonância Magnética da clínica Axial Centro de Imagem, em Belo Horizonte - MG

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL - CREMEMGE Nº 17261

UNIDADE DO HC-FMUSP: Divisão de Diagnóstico por Imagem do Instituto do Coração – InCor – HCFMUSP.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses.....

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

O propósito deste estudo é ver o mais cedo possível as alterações do coração que estão presentes nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva, como é o caso do seu filho, nas formas de Duchenne e Becker, usando o exame de ressonância magnética do coração. São estas alterações que levam ao comprometimento da função do coração em bombear o sangue quando o seu filho está na adolescência. Com o diagnóstico destas alterações o mais cedo possível começaremos o tratamento dos pacientes antes mesmos deles apresentarem qualquer queixa cardíaca e estamos testando se este tratamento precoce vai melhorar a qualidade e tempo de vida destes pacientes. O exame de ressonância do coração é um exame não invasivo e não provoca danos para o seu filho. O único transtorno é que precisamos que o paciente fique quieto durante o exame que é um pouco demorado. O seu filho estará participando de uma pesquisa. Ele foi selecionado para esta pesquisa porque tem diagnóstico através de DNA ou biópsia muscular de Distrofia Muscular Progressiva e o seu médico está preocupado com o futuro do coração do seu filho. O objetivo deste formulário é esclarecer as razões da pesquisa e explicar em detalhes tudo que será realizado durante o estudo. A participação do seu filho neste estudo é voluntária e caso deseje sair ou desistir de participar, basta informar-nos a qualquer momento. Isto não trará nenhum problema para o seu acompanhamento ou para o tratamento da sua doença.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados e propósitos:

Para a realização do exame de ressonância do coração é necessário um jejum prévio de pelo menos 4 horas e a punção de uma veia no braço para a injeção de contraste (Gadolinio) que muito raramente pode ter algum efeito não desejado para o seu filho. Depois o seu filho ficará deitado numa maca por aproximadamente 40 minutos, que entrará dentro de um túnel para fazer o exame. Durante o exame o seu filho precisará prender a respiração por alguns segundos, algumas vezes. A Ressonância Magnética não pode ser realizada em pacientes que usem marca-passo, tenham pequenos pedaços de metal nos olhos, clips de aneurisma ou usem um aparelho chamado desfibrilador. É muito importante, para uma boa qualidade do exame, que durante todo o período, o seu filho não se movimente e colabore para parar a respiração toda vez que lhe for solicitado. Durante todo o exame o seu filho será acompanhado por um médico que irá se comunicar com ele, diretamente ou através de um microfone instalado no interior da Ressonância. O senhor (a) poderá ficar com o seu filho dentro da sala de exame e o mesmo será interrompido caso ocorram dificuldades mais importantes. A qualquer momento, o(a) senhor (a) e o seu filho também poderão conversar com o médico examinador, através desse microfone, para tirar qualquer dúvida.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

Conforme dito anteriormente, será necessário pegar uma veia no braço do seu filho para injeção de contraste durante o exame. Este procedimento é realizado por pessoal de enfermagem treinado (enfermeiro ou auxiliar de enfermagem), com chances mínimas de complicações como dor local, formação de hematomas, vazamento do líquido infundido para a pele, sendo mais rara ainda a chance de infecção.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:

Radiação: A ressonância é um exame que não utiliza radiação ionizante, portanto sem risco para a saúde.

Contraste: O contraste é um líquido que injetamos na veia do paciente para melhorar ainda mais a imagem do coração feita pela ressonância. Será injetada na veia do seu filho uma pequena quantidade deste líquido. Caso seu filho sinta qualquer desconforto, por favor nos informe. Este líquido raramente pode provocar reações alérgicas na imensa maioria muito leves como dor de cabeça ou náusea e frio no local da veia. Reações mais importantes, como pressão baixa, são extremamente raras, com frequência de 1 em 500.000 pacientes. Caso aconteça qualquer reação uma equipe de médicos está disponível para prestar todo atendimento necessário.

Medicação: Os efeitos não desejados dos remédios: inibidor de IECA (captopril), betabloqueador (carvedilol) e espironolactona são raros. Reações indesejáveis ao captopril incluem: pressão baixa, tontura e tosse. Reações não desejáveis ao carvedilol podem ser: broncoespasmo e hipotensão. Reação não desejável à espironolactona inclui o aumento do volume da mama. É importante saber que estes medicamentos são usados rotineiramente em pacientes com insuficiência cardíaca e pressão alta em adultos e crianças e seus benefícios para o coração já são conhecidos.

5 – Benefícios para o participante:

Este exame poderá propiciar ao seu filho um diagnóstico precoce de alterações no coração e um consequente tratamento mais precoce destas alterações, tentando promover benefícios para uma melhor qualidade de vida e, possivelmente, mais longa. Até hoje, o diagnóstico de doenças cardíacas tem sido feito com o ecocardiograma, que apresenta alguns problemas como a falta de capacidade em detectar alterações mais precoces no coração do seu filho. A ressonância magnética do coração pode fazer este diagnóstico mais cedo. Iremos repetir o exame de ressonância novamente após dois anos de tratamento, que será prescrito pelo seu médico, para avaliarmos se as alterações que por acaso existam no coração do seu filho vão melhorar. Se a primeira ressonância for normal, também iremos fazer uma segunda ressonância para ver se alguma coisa nova apareceu neste período. O seu médico será informado de todos os resultados destes exames e poderá alterar o

tratamento quando achar necessário. Será fornecido ao(a) senhor (a) um laudo completo com o resultado do exame.

É possível que no futuro, esta pesquisa torne a ressonância magnética do coração o método mais útil para o diagnóstico de alterações cardíacas nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva e que o tratamento destas alterações seja feito logo quando houver o diagnóstico. A participação do seu filho nesta pesquisa pode ajudá-lo e a outros meninos no futuro

6 – Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:

O seu filho não precisa participar deste estudo para receber o tratamento para a provável doença do coração. Caso não queira fazer parte deste estudo, a alternativa é continuar com o tratamento padrão estabelecido pelo seu médico.

7 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, o(a) Senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Carlos Eduardo Rochitte que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 andar AB – Setor de Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada Cardiovascular. Cerqueira César/ SP. Telefone(s): (11) 3069-5587. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

O(a) Senhor(a) poderá, a qualquer momento do estudo, retirar o seu consentimento ou fazer seu filho deixar de participar da pesquisa, sem trazer prejuízo à continuidade do atendimento do seu filho.

09 – Direito de confidencialidade:

Todo e qualquer dado obtido neste estudo seguirá critérios de sigilo, privacidade e confidencialidade.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas:

O(a) senhor(a) terá, a qualquer tempo, acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, para esclarecer qualquer dúvida a respeito da pesquisa e também às informações sobre resultados parciais da pesquisa, em especial, se estas informações forem de utilidade no tratamento clínico de seu filho.

11 – Despesas e compensações:

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação de seu filho. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. - Os dados desta pesquisa serão utilizados apenas para publicação de artigos científicos relacionados a este projeto. Para nenhum outro fim serão utilizados os dados deste projeto.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Diagnóstico da Cardiomiopatia na Distrofia Muscular Progressiva por Ressonância Magnética Cardiovascular – Correlação com Tratamento, Prognóstico e Preditores Genéticos”.

Eu discuti com o Dr. Carlos Eduardo Rochitte ou Dra. Marly Conceição Silva sobre a decisão de meu filho participar nesse estudo. Ficaram claros para mim, quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do meu filho é isenta de despesas e que ele tem garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em autorizar meu filho a participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu filho possa ter adquirido, ou no atendimento do meu filho neste Serviço.

Assinatura do representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL-**

Para pacientes maiores de 18 anos

1.NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO: BAIRRO:

CIDADE CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO: BAIRRO:

CIDADE: CEP:

TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Diagnóstico da Cardiomiopatia na Distrofia Muscular Progressiva por Ressonância Magnética Cardiovascular – Correlação com Tratamento, Prognóstico e Preditores Genéticos.

PESQUISADOR : .Carlos Eduardo Rochitte.....

CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente da Coordenação de Diagnóstico por Imagem

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .70296.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Diagnóstico por Imagem do Instituto do Coração – InCor – HCFMUSP

PESQUISADOR: Marly Conceição Silva

CARGO/FUNÇÃO: Aluna da pós-graduação do InCor – HCFMUSP e Médica ecocardiografista e do setor de Tomografia e Ressonância Magnética da clínica Axial Centro de Imagem, em Belo Horizonte - MG

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL - CREMEMGE Nº 17261

UNIDADE DO HC-FMUSP: Divisão de Diagnóstico por Imagem do Instituto do Coração – InCor – HCFMUSP.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO <input checked="" type="checkbox"/>	RISCO MÉDIO <input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO <input type="checkbox"/>	RISCO MAIOR <input type="checkbox"/>

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses.....

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

O propósito deste estudo é ver o mais cedo possível as alterações do coração que estão presentes nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva, como é o caso do seu filho, nas formas de Duchenne e Becker, usando o exame de ressonância magnética do coração. São estas alterações que levam ao comprometimento da função do coração em bombear o sangue quando o seu filho está na adolescência. Com o diagnóstico destas alterações o mais cedo possível começaremos o tratamento dos pacientes antes mesmos deles apresentarem qualquer queixa cardíaca e estamos testando se este tratamento precoce vai melhorar a qualidade e tempo de vida destes pacientes. O exame de ressonância do coração é um exame não invasivo e não provoca danos para o seu filho. O

único transtorno é que precisamos que o paciente fique quieto durante o exame que é um pouco demorado. O seu filho estará participando de uma pesquisa. Ele foi selecionado para esta pesquisa porque tem diagnóstico através de DNA ou biópsia muscular de Distrofia Muscular Progressiva e o seu médico está preocupado com o futuro do coração do seu filho. O objetivo deste formulário é esclarecer as razões da pesquisa e explicar em detalhes tudo que será realizado durante o estudo. A participação do seu filho neste estudo é voluntária e caso deseje sair ou desistir de participar, basta informar-nos a qualquer momento. Isto não trará nenhum problema para o seu acompanhamento ou para o tratamento da sua doença.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados e propósitos:

Para a realização do exame de ressonância do coração é necessário um jejum prévio de pelo menos 4 horas e a punção de uma veia no braço para a injeção de contraste (Gadolinio) que muito raramente pode ter algum efeito não desejado para o seu filho. Depois o seu filho ficará deitado numa maca por aproximadamente 40 minutos, que entrará dentro de um túnel para fazer o exame. Durante o exame o seu filho precisará prender a respiração por alguns segundos, algumas vezes. A Ressonância Magnética não pode ser realizada em pacientes que usem marca-passo, tenham pequenos pedaços de metal nos olhos, clips de aneurisma ou usem um aparelho chamado desfibrilador. É muito importante, para uma boa qualidade do exame, que durante todo o período, o seu filho não se movimente e colabore para parar a respiração toda vez que lhe for solicitado. Durante todo o exame o seu filho será acompanhado por um médico que irá se comunicar com ele, diretamente ou através de um microfone instalado no interior da Ressonância. O senhor (a) poderá ficar com o seu filho dentro da sala de exame e o mesmo será interrompido caso ocorram dificuldades mais importantes. A qualquer momento, o(a) senhor (a) e o seu filho também poderão conversar com o médico examinador, através desse microfone, para tirar qualquer dúvida.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

Conforme dito anteriormente, será necessário pegar uma veia no braço do seu filho para injeção de contraste durante o exame. Este procedimento é realizado por pessoal de enfermagem treinado (enfermeiro ou auxiliar de enfermagem), com chances mínimas de complicações como dor local, formação de hematomas, vazamento do líquido infundido para a pele, sendo mais rara ainda a chance de infecção.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:

Radiação: A ressonância é um exame que não utiliza radiação ionizante, portanto sem risco para a saúde.

Contraste: O contraste é um líquido que injetamos na veia do paciente para melhorar ainda mais a imagem do coração feita pela ressonância. Será injetada na veia do seu filho uma pequena quantidade deste líquido. Caso seu filho sinta qualquer desconforto, por favor nos informe. Este líquido raramente pode provocar reações alérgicas na imensa maioria muito leves como dor de cabeça ou náusea e frio no local da veia. Reações mais importantes, como pressão baixa, são extremamente raras, com frequência de 1 em 500.000 pacientes. Caso aconteça qualquer reação uma equipe de médicos está disponível para prestar todo atendimento necessário.

Medicação: Os efeitos não desejados dos remédios: inibidor de IECA (captopril), betabloqueador (carvedilol) e espironolactona são raros. Reações indesejáveis ao captopril incluem: pressão baixa, tontura e tosse. Reações não desejáveis ao carvedilol podem ser: broncoespasmo e hipotensão. Reação não desejável à espironolactona inclui o aumento do volume da mama. É importante saber que estes medicamentos são usados rotineiramente em pacientes com insuficiência cardíaca e pressão alta em adultos e crianças e seus benefícios para o coração já são conhecidos.

5 – Benefícios para o participante:

Este exame poderá propiciar ao seu filho um diagnóstico precoce de alterações no coração e um consequente tratamento mais precoce destas alterações, tentando promover benefícios para uma melhor qualidade de vida e, possivelmente, mais longa. Até hoje, o diagnóstico de doenças cardíacas tem sido feito com o ecocardiograma, que apresenta alguns problemas como a falta de capacidade em detectar alterações mais precoces no coração do seu filho. A ressonância magnética do coração pode fazer este diagnóstico mais cedo. Iremos repetir o exame de ressonância novamente após dois anos de tratamento, que será prescrito pelo seu médico, para avaliarmos se as alterações que por acaso existam no coração do seu filho vão melhorar. Se a primeira ressonância for normal, também iremos fazer uma segunda ressonância para ver se alguma coisa nova apareceu neste período. O seu médico será informado de todos os resultados destes exames e poderá alterar o tratamento quando achar necessário. Será fornecido ao(a) senhor (a) um laudo completo com o resultado do exame.

É possível que no futuro, esta pesquisa torne a ressonância magnética do coração o método mais útil para o diagnóstico de alterações cardíacas nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva e que o tratamento destas alterações seja feito logo quando houver o diagnóstico. A participação do seu filho nesta pesquisa pode ajudá-lo e a outros meninos no futuro

6 – Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:

O seu filho não precisa participar deste estudo para receber o tratamento para a provável doença do coração. Caso não queira fazer parte deste estudo, a alternativa é continuar com o tratamento padrão estabelecido pelo seu médico.

7 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, o(a) Senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Carlos Eduardo Rochitte que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 andar AB – Setor de Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada Cardiovascular. Cerqueira César/ SP. Telefone(s): (11) 3069-5587. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

O(a) Senhor(a) poderá, a qualquer momento do estudo, retirar o seu consentimento ou fazer seu filho deixar de participar da pesquisa, sem trazer prejuízo à continuidade do atendimento do seu filho.

09 – Direito de confidencialidade:

Todo e qualquer dado obtido neste estudo seguirá critérios de sigilo, privacidade e confidencialidade.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas:

O(a) senhor(a) terá, a qualquer tempo, acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, para esclarecer qualquer dúvida a respeito da pesquisa e também às informações sobre resultados parciais da pesquisa, em especial, se estas informações forem de utilidade no tratamento clínico de seu filho.

11 – Despesas e compensações:

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à

participação de seu filho. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. - Os dados desta pesquisa serão utilizados apenas para publicação de artigos científicos relacionados a este projeto. Para nenhum outro fim serão utilizados os dados deste projeto.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Diagnóstico da Cardiomiopatia na Distrofia Muscular Progressiva por Ressonância Magnética Cardiovascular – Correlação com Tratamento, Prognóstico e Preditores Genéticos”.

Eu discuti com o Dr. Carlos Eduardo Rochitte ou Dra. Marly Conceição Silva sobre a decisão de meu filho participar nesse estudo. Ficaram claros para mim, quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do meu filho é isenta de despesas e que ele tem garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em autorizar meu filho a participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu filho possa ter adquirido, ou no atendimento do meu filho neste Serviço.

Assinatura do representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – FACULDADE
DE MEDICINA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

7-12anos

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL

LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M () F ()
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DA PESQUISA

DIAGNÓSTICO DA CARDIOMIOPATIA NA DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA
POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA CARDIOVASCULAR - CORRELAÇÃO COM
TRATAMENTO, PROGNÓSTICO E PREDITORES GENÉTICOS

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa

O propósito deste estudo é diagnosticar o mais cedo possível as alterações cardíacas que estão presentes nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva nas formas de Duchenne e Becker. Estas alterações levam ao comprometimento da função do coração em bombear o

sangue quando estes pacientes estão na adolescência. Com este diagnóstico mais cedo possível de alterações no coração, começaremos o tratamento dos pacientes antes mesmos deles apresentarem queixas. Estamos testando se este tratamento precoce vai melhorar a vida do seu filho. Este é um exame não invasivo e não provoca danos para o seu filho. O único transtorno é que precisamos que o paciente fique quieto durante o exame que é um pouco demorado. A participação do seu filho neste estudo é voluntária e caso deseje sair ou desistir de participar, basta informar-nos a qualquer momento, sendo que ele (ou você) continuará a receber o tratamento nos ambulatórios de forma usual, sem qualquer prejuízo.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

Para a realização da ressonância magnética é necessário um jejum de pelo menos 4 horas e a punção de uma veia no braço para a infusão de contraste gadolínio que raramente pode fazer mal para o paciente. Depois o seu filho (ou você) ficará deitado numa maca dentro do aparelho de ressonância magnética por aproximadamente 40 minutos. O exame não pode ser realizado em pacientes que usem marca-passo, tenham pequenos pedaços de metal nos olhos ou usem um aparelho chamado desfibrilador. É muito importante, para uma boa qualidade do exame, que durante todo o período do exame o seu filho não se movimente e colabore para parar a respiração toda vez que for solicitado. Durante todo o exame o seu filho será acompanhado por um médico que irá se comunicar com o seu filho diretamente ou através de um microfone instalado no interior da Ressonância. Você poderá ficar com o seu filho dentro da sala de exame e o mesmo será interrompido caso haja dificuldades mais importantes. A qualquer momento o seu filho também poderá conversar com o médico através desse microfone.

3. Desconfortos e riscos esperados

- **Punção venosa:** Conforme dito anteriormente, será necessário “pegar” uma veia no braço do seu filho para a injeção de contraste necessário ao o exame. Este procedimento é realizado por pessoal treinado, com chances mínimas de complicações como dor local, formação de hematomas, vazamento do líquido infundido para a pele, sendo mais rara ainda a chance de infecção.

- **Radiação:** A Ressonância é um exame que não utiliza radiação.

- **Contraste:** O contraste é um líquido que injetamos na veia do paciente para melhorar ainda mais a imagem do coração feita pela ressonância. Será injetada na veia do seu filho uma pequena quantidade deste líquido e vai fazer um friozinho na veia e durante a injeção e seu filho poderá sentir um gosto metálico na boca. Caso seu filho sinta qualquer dor, por favor nos informe. Este líquido raramente pode provocar reações alérgicas, a frequência de

reações é de 1 em 500.000 pacientes. Caso aconteça qualquer reação a equipe está preparada para prestar todo atendimento ágil necessário para evitar riscos à vida do seu filho.

- Medicação: Será empregada a mesma medicação indicada para os casos nos quais o coração apresenta alteração na função do músculo cardíaco (função contrátil). A ressonância poderá detectar alterações no coração antes de se verificar estas alterações nos exames convencionais, que são o EcoDoppler, ECG e Rx de tórax. Assim, o medicamento inicialmente empregado nos pacientes com áreas de fibrose no músculo cardíaco identificadas na ressonância, mas ainda sem alteração da função do músculo cardíaco, será o perindopril. Esse medicamento pode provocar cefaléia, distúrbios do humor e (ou) do sono, fraqueza. Os distúrbios digestivos são pouco específicos; foram relatados distúrbios do paladar, vertigens e câimbras. Algumas erupções cutâneas localizadas foram mencionadas. A tosse pode ocorrer nos pacientes adultos, mas é menos freqüente nas crianças. A pressão arterial deverá ser medida, porque poderá ocasionar diminuição da mesma, devendo-se iniciar com baixa dose. Os pacientes com alteração da função do músculo cardíaco serão tratados com medicamentos indicados, que incluem espironolactona e carvedilol.

4. Benefícios que podem ser obtidos:

A ressonância magnética do coração irá propiciar ao seu filho um diagnóstico precoce de alterações no coração e um consequente tratamento mais precoce, tentando obter benefícios para uma vida de melhor qualidade e mais longa. Até hoje o diagnóstico de alteração cardíaca tem sido feito através do Ecocardiograma que apresenta alguns problemas como a falta de capacidade em detectar alterações mais precoces no coração do seu filho. A Ressonância Magnética pode fazer este diagnóstico mais cedo. Iremos repetir o exame novamente após dois anos de acompanhamento clínico ou tratamento, para avaliarmos se as alterações no coração do seu filho vão melhorar. O seu médico será informado de todos os resultados destes exames e poderá alterar o tratamento quando achar necessário. Será fornecido um laudo completo com o resultado do exame .

É possível que no futuro esta pesquisa torne a Ressonância Magnética Cardíaca o método mais importante para o diagnóstico de alterações cardíacas nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva e que o tratamento seja feito logo que se detectar as alterações cardíacas. A participação do seu filho nesta pesquisa poderá ajudá-lo e a outros meninos no futuro.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

O seu filho não precisa participar deste estudo para receber o tratamento padronizado adotado no Serviço para a doença do coração, se houver. Se seu filho não quiser participar deste estudo, ele receberá a mesma atenção e tratamento indicados para o seu caso.

6. Sigilo dos dados

Todos as informações e resultados de exames serão anotados em formulário específico da pesquisa sob responsabilidade dos pesquisadores e poderão ser divulgados em congressos e revistas médicas, mas o sigilo está garantido, ou seja não será possível a identificação do seu filho.

EM CASO DE NECESSIDADE DE ESCLARECIMENTOS ENTRAR EM CONTATO COM:**1. PESQUISADORES:**

Dra. Zilda Maria Alves Meira – endereço: Avenida Alfredo Balena, 190 – Bairro Santa Efigênia – Fone: (31) 32489772

Dra. Juliana Gurgel Giannetti – endereço Avenida Alfredo Balena, 190 – Bairro Santa Efigênia – Fone: (31) 32489772

Dra. Marly Conceição Silva - Endereço: Avenida Bernardo Monteiro, 1472. Belo Horizonte - MG – CEP 30 -Telefone: (31)3237-1212

COEP/UFMG:

Endereço: Av Antonio Carlos, 66270 – Unidade administrativa 2 – Campus UFMG

Sala 2005 – CEP 31270-901 – Belo Horizonte - MG

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Belo Horizonte , de de

assinatura do responsável legal

assinatura do pesquisador responsável
(carimbo ou nome legível)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – FACULDADE
DE MEDICINA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

13-18 anos

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL

LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DA PESQUISA

DIAGNÓSTICO DA CARDIOMIOPATIA NA DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA CARDIOVASCULAR - CORRELAÇÃO COM TRATAMENTO,
PROGNÓSTICO E PREDITORES GENÉTICOS

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa

O propósito deste estudo é diagnosticar o mais cedo possível as alterações cardíacas que estão presentes nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva nas formas de Duchenne e Becker. Estas alterações levam ao comprometimento da função do coração em bombear o sangue quando estes pacientes estão na adolescência. Com este diagnóstico mais cedo possível de alterações no coração, começaremos o tratamento dos pacientes antes mesmos deles apresentarem queixas. Estamos testando se este tratamento

precoce vai melhorar a sua vida. Este é um exame não invasivo e não provoca danos para você. O único transtorno é que precisamos que o paciente fique quieto durante o exame que é um pouco demorado. A sua participação neste estudo é voluntária e caso deseje sair ou desistir de participar, basta informar-nos a qualquer momento, sendo que ou você continuará a receber o tratamento nos ambulatórios de forma usual, sem qualquer prejuízo.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

Para a realização da ressonância magnética é necessário um jejum de pelo menos 4 horas e a punção de uma veia no braço para a infusão de contraste gadolínio que raramente pode fazer mal para o paciente. Depois você ficará deitado numa maca dentro do aparelho de ressonância magnética por aproximadamente 40 minutos. O exame não pode ser realizado em pacientes que usem marca-passo, tenham pequenos pedaços de metal nos olhos ou usem um aparelho chamado desfibrilador. É muito importante, para uma boa qualidade do exame, que durante todo o período do exame você não se movimente e colabore para parar a respiração toda vez que for solicitado. Durante todo o exame você será acompanhado por um médico que irá se comunicar com você diretamente ou através de um microfone instalado no interior da Ressonância. Um acompanhante poderá ficar com você dentro da sala de exame e o mesmo será interrompido caso haja dificuldades mais importantes. A qualquer momento você também poderá conversar com o médico através desse microfone.

3. Desconfortos e riscos esperados

- **Punção venosa:** Conforme dito anteriormente, será necessário “pegar” uma veia no seu braço para a injeção de contraste necessário ao o exame. Este procedimento é realizado por pessoal treinado, com chances mínimas de complicações como dor local, formação de hematomas, vazamento do líquido infundido para a pele, sendo mais rara ainda a chance de infecção.

- **Radiação:** A Ressonância é um exame que não utiliza radiação.

- **Contraste:** O contraste é um líquido que injetamos na veia do paciente para melhorar ainda mais a imagem do coração feita pela ressonância. Será injetada na sua veia uma pequena quantidade deste líquido e vai fazer um friozinho na veia e durante a injeção você poderá sentir um gosto metálico na boca. Caso você sinta qualquer dor, por favor nos informe. Este líquido raramente pode provocar reações alérgicas, a frequência de reações é de 1 em 500.000 pacientes. Caso aconteça qualquer reação a equipe está preparada para prestar todo atendimento ágil necessário para evitar riscos à sua vida.

- Medicação: Será empregada a mesma medicação indicada para os casos nos quais o coração apresenta alteração na função do músculo cardíaco (função contrátil). A ressonância poderá detectar alterações no coração antes de se verificar estas alterações nos exames convencionais, que são o EcoDoppler, ECG e Rx de tórax. Assim, o medicamento inicialmente empregado nos pacientes com áreas de fibrose no músculo cardíaco identificadas na ressonância, mas ainda sem alteração da função do músculo cardíaco, será o perindopril. Esse medicamento pode provocar cefaléia, distúrbios do humor e (ou) do sono, fraqueza. Os distúrbios digestivos são pouco específicos; foram relatados distúrbios do paladar, vertigens e câimbras. Algumas erupções cutâneas localizadas foram mencionadas.. A tosse pode ocorrer nos pacientes adultos, mas é menos freqüente nas crianças. A pressão arterial deverá ser medida, porque poderá ocasionar diminuição da mesma, devendo-se iniciar com baixa dose. Os pacientes com alteração da função do músculo cardíaco serão tratados com medicamentos indicados, que incluem espironolactona e carvedilol.

4. Benefícios que podem ser obtidos:

A ressonância magnética do coração irá propiciar a você um diagnóstico precoce de alterações no coração e um conseqüente tratamento mais precoce, tentando obter benefícios para uma vida de melhor qualidade e mais longa. Até hoje o diagnóstico de alteração cardíaca tem sido feito através do Ecocardiograma que apresenta alguns problemas como a falta de capacidade em detectar alterações mais precoces no seu coração. A Ressonância Magnética pode fazer este diagnóstico mais cedo. Iremos repetir o exame novamente após dois anos de acompanhamento clínico ou tratamento, para avaliarmos se as alterações no seu coração vão melhorar. O seu médico será informado de todos os resultados destes exames e poderá alterar o tratamento quando achar necessário. Será fornecido um laudo completo com o resultado do exame .

É possível que no futuro esta pesquisa torne a Ressonância Magnética Cardíaca o método mais importante para o diagnóstico de alterações cardíacas nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva e que o tratamento seja feito logo que se detectar as alterações cardíacas. A sua participação nesta pesquisa poderá ajudá-lo e a outros adolescentes no futuro.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

Você não precisa participar deste estudo para receber o tratamento padronizado adotado no Serviço para a doença do coração, se houver. Se você não quiser participar deste estudo, você receberá a mesma atenção e tratamento indicados para o seu caso.

6. Sigilo dos dados

Todos as informações e resultados de exames serão anotados em formulário específico da pesquisa sob responsabilidade dos pesquisadores e poderão ser divulgados em congressos e revistas médicas, mas o sigilo está garantido, ou seja não será possível a sua identificação.

EM CASO DE NECESSIDADE DE ESCLARECIMENTOS ENTRAR EM CONTATO COM:

1. PESQUISADORES:

Dra. Zilda Maria Alves Meira – endereço: Avenida Alfredo Balena, 190 – Bairro Santa Efigênia – Fone: (31) 32489772

Dra Juliana Gurgel Giannetti – endereço Avenida Alfredo Balena, 190 – Bairro Santa Efigênia – Fone: (31) 32489772 -

Dra Marly Conceição Silva - Endereço: Avenida Bernardo Monteiro, 1472. Belo Horizonte - MG – CEP 30 -Telefone: (31)3237-1212

COEP/UFMG:

**Endereço: Av Antonio Carlos, 66270 – Unidade administrativa 2 – Campus UFMG
Sala 2005 – CEP 31270-901 – Belo Horizonte - MG**

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Belo Horizonte , de

assinatura do participante ou responsável assinatura do pesquisador responsável
(carimbo ou nome legível)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – FACULDADE
DE MEDICINA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pais ou responsável pelo adolescente

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL

LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M () F ()
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DA PESQUISA

DIAGNÓSTICO DA CARDIOMIOPATIA NA DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA
POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA CARDIOVASCULAR - CORRELAÇÃO COM
TRATAMENTO, PROGNÓSTICO E PREDITORES GENÉTICOS

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa

O propósito deste estudo é diagnosticar o mais cedo possível as alterações cardíacas que estão presentes nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva nas formas de Duchenne e Becker. Estas alterações levam ao comprometimento da função do coração em bombear o sangue quando estes pacientes estão na adolescência. Com este diagnóstico mais cedo possível de alterações no coração, começaremos o tratamento dos pacientes antes mesmos deles apresentarem queixas. Estamos testando se este tratamento precoce vai melhorar a vida do seu filho . Este é um exame não invasivo e não provoca danos para o seu filho. O único transtorno é que precisamos que o paciente fique quieto durante o exame que é um pouco demorado. A participação do seu filho neste estudo é voluntária e caso deseje sair ou desistir de participar, basta informar-nos a qualquer momento, sendo que ele (ou você) continuará a receber o tratamento nos ambulatórios de forma usual, sem qualquer prejuízo.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

Para a realização da ressonância magnética é necessário um jejum de pelo menos 4 horas e a punção de uma veia no braço para a infusão de contraste gadolínio que raramente pode fazer mal para o paciente. Depois o seu filho (ou você) ficará deitado numa maca dentro do aparelho de ressonância magnética por aproximadamente 40 minutos. O exame não pode ser realizado em pacientes que usem marca-passo, tenham pequenos pedaços de metal nos olhos ou usem um aparelho chamado desfibrilador. É muito importante, para uma boa qualidade do exame, que durante todo o período do exame o seu filho não se movimente e colabore para parar a respiração toda vez que for solicitado. Durante todo o exame o seu filho será acompanhado por um médico que irá se comunicar com o seu filho diretamente ou através de um microfone instalado no interior da Ressonância. Você poderá ficar com o seu filho dentro da sala de exame e o mesmo será interrompido caso haja dificuldades mais importantes. A qualquer momento o seu filho também poderá conversar com o médico através desse microfone.

3. Desconfortos e riscos esperados

- **Punção venosa:** Conforme dito anteriormente, será necessário “pegar” uma veia no braço do seu filho para a injeção de contraste necessário ao o exame. Este procedimento é realizado por pessoal treinado, com chances mínimas de complicações como dor local, formação de hematomas, vazamento do líquido infundido para a pele, sendo mais rara ainda a chance de infecção.

- **Radiação:** A Ressonância é um exame que não utiliza radiação.

- Contraste: O contraste é um líquido que injetamos na veia do paciente para melhorar ainda mais a imagem do coração feita pela ressonância. Será injetada na veia do seu filho uma pequena quantidade deste líquido e vai fazer um friozinho na veia e durante a injeção e seu filho poderá sentir um gosto metálico na boca. Caso seu filho sinta qualquer dor, por favor nos informe. Este líquido raramente pode provocar reações alérgicas, a frequência de reações é de 1 em 500.000 pacientes. Caso aconteça qualquer reação a equipe está preparada para prestar todo atendimento ágil necessário para evitar riscos à vida do seu filho.

- Medicação: Será empregada a mesma medicação indicada para os casos nos quais o coração apresenta alteração na função do músculo cardíaco (função contrátil). A ressonância poderá detectar alterações no coração antes de se verificar estas alterações nos exames convencionais, que são o EcoDoppler, ECG e Rx de tórax. Assim, o medicamento inicialmente empregado nos pacientes com áreas de fibrose no músculo cardíaco identificadas na ressonância, mas ainda sem alteração da função do músculo cardíaco, será o perindopril. Esse medicamento pode provocar cefaléia, distúrbios do humor e (ou) do sono, fraqueza. Os distúrbios digestivos são pouco específicos; foram relatados distúrbios do paladar, vertigens e câimbras. Algumas erupções cutâneas localizadas foram mencionadas.. A tosse pode ocorrer nos pacientes adultos, mas é menos freqüente nas crianças. A pressão arterial deverá ser medida, porque poderá ocasionar diminuição da mesma, devendo-se iniciar com baixa dose. Os pacientes com alteração da função do músculo cardíaco serão tratados com medicamentos indicados, que incluem espironolactona e carvedilol.

4. Benefícios que podem ser obtidos:

A ressonância magnética do coração irá propiciar ao seu filho um diagnóstico precoce de alterações no coração e um consequente tratamento mais precoce, tentando obter benefícios para uma vida de melhor qualidade e mais longa. Até hoje o diagnóstico de alteração cardíaca tem sido feito através do Ecocardiograma que apresenta alguns problemas como a falta de capacidade em detectar alterações mais precoces no coração do seu filho. A Ressonância Magnética pode fazer este diagnóstico mais cedo. Iremos repetir o exame novamente após dois anos de acompanhamento clínico ou tratamento, para avaliarmos se as alterações no coração do seu filho vão melhorar. O seu médico será informado de todos os resultados destes exames e poderá alterar o tratamento quando achar necessário. Será fornecido um laudo completo com o resultado do exame .

É possível que no futuro esta pesquisa torne a Ressonância Magnética Cardíaca o método mais importante para o diagnóstico de alterações cardíacas nos pacientes com Distrofia Muscular Progressiva e que o tratamento seja feito logo que se detectar as

alterações cardíacas. A participação do seu filho nesta pesquisa poderá ajudá-lo e a outros meninos no futuro.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

O seu filho não precisa participar deste estudo para receber o tratamento padronizado adotado no Serviço para a doença do coração, se houver. Se seu filho não quiser participar deste estudo, ele receberá a mesma atenção e tratamento indicados para o seu caso.

6. Sigilo dos dados

Todas as informações e resultados de exames serão anotados em formulário específico da pesquisa sob responsabilidade dos pesquisadores e poderão ser divulgados em congressos e revistas médicas, mas o sigilo está garantido, ou seja não será possível a identificação do seu filho.

EM CASO DE NECESSIDADE DE ESCLARECIMENTOS ENTRAR EM CONTATO

COM:

1. PESQUISADORES:

Dra Zilda Maria Alves Meira – endereço: Avenida Alfredo Balena, 190 – Bairro Santa Efigênia – Fone: (31) 32489772

Dra Juliana Gurgel Giannetti – endereço Avenida Alfredo Balena, 190 – Bairro Santa Efigênia – Fone: (31) 32489772 -

Dra Marly Conceição Silva - Endereço: Avenida Bernardo Monteiro, 1472. Belo Horizonte - MG – CEP 30 -Telefone: (31)3237-1212

COEP/UFMG:

Endereço: Av Antonio Carlos, 66270 – Unidade administrativa 2 – Campus

UFMG

Sala 2005 – CEP 31270-901 – Belo Horizonte - MG

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Belo Horizonte , de

assinatura do responsável legal ou

assinatura do pesquisador responsável
(carimbo ou nome legível)

IV – TERMO DE COMPROMISSO

Termo de Compromisso do pesquisador responsável em cumprir os termos da Resolução 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res.CNS 196/96 e suas Complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.

ASSINATURA

9 Referências

1. Zundel WS, Tyler FH. The muscular dystrophies. *N Engl J Med*. 1965;273:537-543 CONTD.
2. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord*. 1991;1:19-29.
3. Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987;51:919-928.
4. Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve*. 2000;23:1456-1471.
5. Zatz M, Lange K, Spence MA. Frequency of Duchenne muscular dystrophy carriers. *Lancet*. 1977;1:759.
6. Zatz M. A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. *Cienc Saúde Coletiva*. 2002;7:85-99.
7. Muntoni F. Cardiac complications of childhood myopathies. *J Child Neurol*. 2003;18:191-202.
8. Eagle M, Bourke J, Bullock R, Gibson M, Mehta J, Giddings D, Straub V, Bushby K. Managing Duchenne muscular dystrophy--the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul Disord*. 2007;17:470-475.
9. Silva MC, Meira ZM, Gurgel Giannetti J, da Silva MM, Campos AF, Barbosa M de M, Starling Filho GM, Ferreira Rde A, Zatz M, Rochitte CE. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with muscular dystrophy. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1874-1879.
10. Silva MC, Meira ZMA, Giannetti JG, Zatz M, Rochitte CE. Myocardial late enhancement in Duchenne and Becker individuals in the clinical milieu - reply. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:2020-2020.
11. Meryon E. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. *Med Chir Trans*. 1852;35:73-84 71.

12. Duchenne. The pathology of paralysis with muscular degeneration (paralysie myosclerotique), or paralysis with apparent hypertrophy. *Br Med J*. 1867;2:541-542.
13. Becker PE, Kiener F. [A new x-chromosomal muscular dystrophy]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z G Neurol Psychiatr*. 1955;193(4):427-448.
14. Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the xp21 locus. *Circulation*. 1993;87:1854-1865.
15. Conte G GL. Scrofola del systema muscolare. *Ann Clin Osp Incurabili Napoli*. 1836:66.
16. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C, Group DMDCCW. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: Diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurology*. 2010;9:77-93.
17. Emery AE. Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscul Disord*. 2002;12:343-349.
18. Dubowitz V. *Muscle Disorders in Childhood*. London: Saunders; 1995.
19. Gozal D. Pulmonary manifestations of neuromuscular disease with special reference to Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Pediatr Pulmonol*. 2000;29:141-150.
20. Rapaport D, Passos-Bueno MR, Takata RI, Campiotto S, Eggers S, Vainzof M, Makover A, Nudel U, Yaffe D, Zartz M. A deletion including the brain promoter of the Duchenne muscular dystrophy gene is not associated with mental retardation. *Neuromuscul Disord*. 1992;2:117-120.
21. American Academy of Pediatrics Section on Cardiology and Cardiac Surgery. Cardiovascular health supervision for individuals affected by Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2005;116:1569-1573.
22. Hunsaker RH, Fulkerson PK, Barry FJ, Lewis RP, Leier CV, Unverferth DV. Cardiac function in Duchenne's muscular dystrophy.

- Results of 10-year follow-up study and noninvasive tests. *Am J Med.* 1982;73:235-238.
23. Ashford MW, Jr., Liu W, Lin SJ, Abraszewski P, Caruthers SD, Connolly AM, Yu X, Wickline SA. Occult cardiac contractile dysfunction in dystrophin-deficient children revealed by cardiac magnetic resonance strain imaging. *Circulation.* 2005;112:2462-2467.
 24. Nigro G, Comi LI, Politano L, Bain RJ. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol.* 1990;26:271-277.
 25. Cox GF, Kunkel LM. Dystrophies and heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 1997;12:329-343.
 26. England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB, Davies KE. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature.* 1990;343:180-182.
 27. Nigro G, Comi LI, Politano L, Limongelli FM, Nigro V, De Rimini ML, Giugliano MA, Petretta VR, Passamano L, Restucci B, et al. Evaluation of the cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 1995;18:283-291.
 28. Quinlivan RM, Dubowitz V. Cardiac transplantation in Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1992;2:165-167.
 29. Maeda M, Nakao S, Miyazato H, Setoguchi M, Arima S, Higuchi I, Osame M, Taira A, Nomoto K, Toda H, et al. Cardiac dystrophin abnormalities in Becker muscular dystrophy assessed by endomyocardial biopsy. *Am Heart J.* 1995;129:702-707.
 30. Moriuchi T, Kagawa N, Mukoyama M, Hizawa K. Autopsy analyses of the muscular dystrophies. *Tokushima J Exp Med.* 1993;40:83-93.
 31. Nomura H, Hizawa K. Histopathological study of the conduction system of the heart in Duchenne progressive muscular dystrophy. *Acta Pathol Jpn.* 1982;32:1027-1033.
 32. Farah MG, Evans EB, Vignos PJ Jr. Echocardiographic evaluation of left ventricular function in Duchenne's muscular dystrophy. *Am J Med.* 1980;69:248-254.

33. Bushby K, Muntoni F, Bourke JP. 107th ENMC international workshop: The management of cardiac involvement in muscular dystrophy and myotonic dystrophy. 7th-9th june 2002, Naarden, the Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2003;13:166-172.
34. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002;359:687-695.
35. Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet.* 1991;337:1022-1024.
36. Greenstein RM, Reardon MP, Chan TS, Middleton AB, Mulivor RA, Greene AE, Coriell LL. An (x;11) translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy. Repository identification No. GM1695. *Cytogenet Cell Genet.* 1980;27:268.
37. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurology.* 2003;2:731-740.
38. Zachi EC. *Avaliação neuropsicológica de pacientes com distrofia muscular de Duchenne [tese].* São Paulo: Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo; 2009.
39. Taylor PJ, Betts GA, Maroulis S, Gilissen C, Pedersen RL, Mowat DR, Johnston HM, Buckley MF. Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PloS One.* 2010;5:e8803.
40. Emery A. Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease. *Lancet.* 2001;357:1529.
41. Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32:277-307.
42. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cdnas for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature.* 1986;323:646-650.
43. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.* 1987;50:509-517.

44. Kunkel LM, Monaco AP, Hoffman E, Koenig M, Feener C, Bertelson C. Molecular studies of progressive muscular dystrophy (Duchenne). *Enzyme*. 1987;38:72-75.
45. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: Dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet*. 1991;49:54-67.
46. Dubowitz V. *Muscle Biopsy -a practical approach*. Philadelphia: Saunders; 2007.
47. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*. 1988;2:90-95.
48. Bulman DE, Murphy EG, Zubrzycka-Gaarn EE, Worton RG, Ray PN. Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotypes with amino- and carboxy-terminal antisera specific for dystrophin. *Am J Hum Genet*. 1991;48:295-304.
49. Jefferies JL, Eidem BW, Belmont JW, Craigen WJ, Ware SM, Fernbach SD, Neish SR, Smith EO, Towbin JA. Genetic predictors and remodeling of dilated cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Circulation*. 2005;112:2799-2804.
50. Byers TJ, Kunkel LM, Watkins SC. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol*. 1991;115:411-421.
51. Matsumura K, Ohlendieck K, Ionasescu VV, Tome FM, Nonaka I, Burghes AH, Mora M, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP. The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord*. 1993;3:533-535.
52. Arahata K, Sugita H. [The pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy--defects of the membrane cytoskeleton "dystrophin"]. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*. 1989;47:1857-1864.
53. Alderton JM, Steinhardt RA. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem*. 2000;275:9452-9460.

54. Terasaki M, Miyake K, McNeil PL. Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca²⁺-dependent vesicle-vesicle fusion events. *J Cell Biol.* 1997;139:63-74.
55. Hutter OF. The membrane hypothesis of Duchenne muscular dystrophy: Quest for functional evidence. *J Inherit Metab Dis.* 1992;15:565-577.
56. Turner PR, Schultz R, Ganguly B, Steinhardt RA. Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J Membr Biol.* 1993;133:243-251.
57. Emery A. Genetic heterogeneity in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet.* 1987;26:235-236.
58. Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 1988;318:1363-1368.
59. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron.* 1989;2:1019-1029.
60. Bies RD, Friedman D, Roberts R, Perryman MB, Caskey CT. Expression and localization of dystrophin in human cardiac Purkinje fibers. *Circulation.* 1992;86:147-153.
61. Lohan J, Culligan K, Ohlendieck K. Deficiency in cardiac dystrophin affects the abundance of the alpha/ beta-dystroglycan complex. *J Biomed Biotechnol.* 2005;2005:28-36.
62. Klietsch R, Ervasti JM, Arnold W, Campbell KP, Jorgensen AO. Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. *Circ Res.* 1993;72:349-360.
63. Hopf FW, Turner PR, Steinhardt RA. Calcium misregulation and the pathogenesis of muscular dystrophy. *Sub-Cell Biochem.* 2007;45:429-464.
64. Lapidos KA, Chen YE, Earley JU, Heydemann A, Huber JM, Chien M, Ma A, McNally EM. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest.* 2004;114:1577-1585.

65. Bia BL, Cassidy PJ, Young ME, Rafael JA, Leighton B, Davies KE, Radda GK, Clarke K. Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:1857-1862.
66. Sanders DB, Kelley T, Larson D. The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion.* 2000;15:97-104.
67. Zatz M, Frota-Pessoa O, Levy JA, Peres CA. Creatine-phosphokinase (cpk) activity in relatives of patients with x-linked muscular dystrophies: A Brazilian study. *J Genet Hum.* 1976;24:153-168.
68. Muntoni F, Bushby K, van Ommen G. 128th ENMC International Workshop on 'preclinical optimization and phase i/ii clinical trials using antisense oligonucleotides in Duchenne muscular dystrophy' 22-24 October 2004, Naarden, the Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2005;15:450-457.
69. Zatz M, Shapiro LJ, Campion DS, Kaback MM, Otto PA. Serum pyruvate-kinase (PK) and creatine-phosphokinase (CPK) in female relatives and patients with x-linked muscular dystrophies (Duchenne and Becker). *J Neurol Sci.* 1980;46:267-279.
70. Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Bortolini ER, Pavanello Rde C, Peres CA. Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 1991;102:190-196.
71. Ozawa E, Hagiwara Y, Yoshida M. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem.* 1999;190:143-151.
72. Beggs AH, Kunkel LM. Improved diagnosis of Duchenne and Becker muscular-dystrophy. *J Clin Invest.* 1990;85:613-619.
73. Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: Potential and pitfalls. *Neurogenetics.* 2005;6:29-35.
74. Towbin JA, Chamberlain JS, Wu DR, Pillers DA, Seltzer WK, McCabe ER. Dxs28 (c7) maps centromeric to dxs68 (11-4) and dxs67 (b24) by deletion analysis. *Genomics.* 1990;7:442-444.

75. Lalic T, Vossen RH, Coffa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D, Djuriscic M, Breuning MH, White SJ, den Dunnen JT. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:1231-1234.
76. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e57.
77. Vainzof M, Pavanello RC, Pavanello Filho I, Passos-Bueno MR, Rapaport D, Hsi CT, Zatz M. Dystrophin immunostaining in muscles from patients with different types of muscular dystrophy: A Brazilian study. *J Neurol Sci.* 1990;98:221-233.
78. Vainzof M, Takata RI, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Zatz M. Is the maintenance of the C-terminus domain of dystrophin enough to ensure a milder Becker muscular dystrophy phenotype? *Hum Mol Genet.* 1993;2:39-42.
79. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:4350-4354.
80. Dubowitz V. Muscle Biopsy--technical and diagnostic aspects. *Ann Clin Res.* 1974;6:69-79.
81. Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen EL, Parker MA, Simonetti O, Klocke FJ, Bonow RO, Judd RM. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *N Engl J Med.* 2000;343:1445-1453.
82. Rochitte CE, Tassi EM, Shiozaki AA. The emerging role of MRI in the diagnosis and management of cardiomyopathies. *Curr Cardiol Rep.* 2006;8:44-52.
83. Shiozaki AA, Kim RJ, Parga JR, Tassi EM, Arteaga E, Rochitte CE. Cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88:243-248.
84. Nigri M, Azevedo CF, Rochitte CE, Schraibman V, Tarasoutchi F, Pommerantzeff PM, Brandão CM, Sampaio RO, Parga JR, Avila LF, Spina GS, Grinberg M. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging identifies focal regions of intramyocardial fibrosis in patients

- with severe aortic valve disease: Correlation with quantitative histopathology. *Am Heart J*. 2009;157:361-368.
85. Nigri M, Rochitte CE, Grinberg M. Magnetic resonance is useful in heart valvular disease. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87:e213-214.
86. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, Meinhardt G, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Fritz P, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: A comparison to histology and molecular pathology. *Circulation*. 2004;109:1250-1258.
87. Finsterer J, Stollberger C, Avanzini M, Bastovansky A, Wexberg P. Late gadolinium enhancement as subclinical myocardial involvement in a manifesting Duchenne carrier. *Int J Cardiol*. 2011;146:231-232.
88. Guillaume MD, Phoon CK, Chun AJ, Srichai MB. Delayed enhancement cardiac magnetic resonance imaging in a patient with Duchenne muscular dystrophy. *Tex Heart Inst J*. 2008;35:367-368.
89. Petrie CJ, Mark PB, Dargie HJ. Cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy--does regional fibrosis mimic infarction? *J Cardiovasc Magn Reson*. 2005;7:823-825.
90. Puchalski MD, Williams RV, Askovich B, Sower CT, Hor KH, Su JT, Pack N, Dibella E, Gottliebson WM. Late gadolinium enhancement: Precursor to cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy? *Int J Cardiovasc Imaging*. 2009;25:57-63.
91. Varghese A, Pennell DJ. Late gadolinium enhanced cardiovascular magnetic resonance in Becker muscular dystrophy. *Heart*. 2004;90:e59
92. Yilmaz A, Gdynia HJ, Baccouche H, Mahrholdt H, Meinhardt G, Basso C, Thiene G, Sperfeld AD, Ludolph AC, Sechtem U. Cardiac involvement in patients with Becker muscular dystrophy: New diagnostic and pathophysiological insights by a CMR approach. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2008;10:50.
93. Giglio V, Pasceri V, Messano L, Parisi Q, Rinelli G, Pasquini L, Dello Russo A, Broccolini A, Galluzzi G, Pescatori M, Mirabella M, Gidaro T, Mangiola F, Ricci E. Integrated backscatter in Becker muscular dystrophy patients with functionally normal heart: Myocardial ultrasound tissue characterization study. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:686-688.

94. Mertens L, Ganame J, Claus P, Goemans N, Thijs D, Eyskens B, Van Laere D, Bijnens B, D'Hooge J, Sutherland GR, Buyse G. Early regional myocardial dysfunction in young patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008;21:1049-1054.
95. Castillo E, Lima JA, Bluemke DA. Regional myocardial function: Advances in MR imaging and analysis. *Radiographics*. 2003;23 Spec No:S127-140.
96. Rochitte CE, Lima JA, Bluemke DA, Reeder SB, McVeigh ER, Furuta T, Becker LC, Melin JA. Magnitude and time course of microvascular obstruction and tissue injury after acute myocardial infarction. *Circulation*. 1998;98:1006-1014.
97. Amado LC, Gerber BL, Gupta SN, Rettmann DW, Szarf G, Schock R, Nasir K, Kraitchman DL, Lima JA. Accurate and objective infarct sizing by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a canine myocardial infarction model. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:2383-2389.
98. Azevedo CF, Amado LC, Kraitchman DL, Gerber BL, Osman NF, Rochitte CE, Edvardsen T, Lima JA. Persistent diastolic dysfunction despite complete systolic functional recovery after reperfused acute myocardial infarction demonstrated by tagged magnetic resonance imaging. *Eur Heart J*. 2004;25:1419-1427.
99. Kim RJ, Chen EL, Lima JA, Judd RM. Myocardial gad-dtpa kinetics determine MRI contrast enhancement and reflect the extent and severity of myocardial injury after acute reperfused infarction. *Circulation*. 1996;94:3318-3326.
100. Lima JA, Judd RM, Bazille A, Schulman SP, Atalar E, Zerhouni EA. Regional heterogeneity of human myocardial infarcts demonstrated by contrast-enhanced MRI. Potential mechanisms. *Circulation*. 1995;92:1117-1125.
101. Schmidt A, Azevedo CF, Cheng A, Gupta SN, Bluemke DA, Foo TK, Gerstenblith G, Weiss RG, Marban E, Tomaselli GF, Lima JA, Wu KC. Infarct tissue heterogeneity by magnetic resonance imaging identifies enhanced cardiac arrhythmia susceptibility in patients with left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2007;115:2006-2014.
102. Bondarenko O, Beek AM, Hofman MB, Kuhl HP, Twisk JW, van Dockum WG, Visser CA, van Rossum AC. Standardizing the definition of hyperenhancement in the quantitative assessment of

- infarct size and myocardial viability using delayed contrast-enhanced CMR. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2005;7:481-485.
103. McCrohon JA, Moon JC, Prasad SK, McKenna WJ, Lorenz CH, Coats AJ, Pennell DJ. Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*. 2003;108:54-59.
 104. Rochitte CE, Oliveira PF, Andrade JM, Ianni BM, Parga JR, Avila LF, Kalil-Filho R, Mady C, Meneghetti JC, Lima JA, Ramires JA. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: A marker of disease severity. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1553-1558.
 105. Mahrholdt H, Wagner A, Judd RM, Sechtem U, Kim RJ. Delayed enhancement cardiovascular magnetic resonance assessment of non-ischaemic cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 2005;26:1461-1474.
 106. Maceira AM, Joshi J, Prasad SK, Moon JC, Perugini E, Harding I, Sheppard MN, Poole-Wilson PA, Hawkins PN, Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance in cardiac amyloidosis. *Circulation*. 2005;111:186-193.
 107. Moon JC, Sachdev B, Elkington AG, McKenna WJ, Mehta A, Pennell DJ, Leed PJ, Elliott PM. Gadolinium enhanced cardiovascular magnetic resonance in Anderson-Fabry disease. Evidence for a disease specific abnormality of the myocardial interstitium. *Eur Heart J*. 2003;24:2151-2155.
 108. Moon JC, Fisher NG, McKenna WJ, Pennell DJ. Detection of apical hypertrophic cardiomyopathy by cardiovascular magnetic resonance in patients with non-diagnostic echocardiography. *Heart*. 2004;90:645-649.
 109. Nigri M, Rochitte CE, Tarasoutchi F, Grinberg M. Magnetic resonance imaging is image diagnosis in heart valve disease. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87:534-537.
 110. Kim RJ, Fieno DS, Parrish TB, Harris K, Chen EL, Simonetti O, Bundy J, Finn JP, Klocke FJ, Judd RM. Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. *Circulation*. 1999;100:1992-2002.

111. Judd RM, Lugo-Olivieri CH, Arai M, Kondo T, Croisille P, Lima JA, Mohan V, Becker LC, Zerhouni EA. Physiological basis of myocardial contrast enhancement in fast magnetic resonance images of 2-day-old reperfused canine infarcts. *Circulation*. 1995;92:1902-1910.
112. Simonetti OP, Kim RJ, Fieno DS, Hillenbrand HB, Wu E, Bundy JM, Finn JP, Judd RM. An improved mr imaging technique for the visualization of myocardial infarction. *Radiology*. 2001;218:215-223.
113. Saeed M, Wendland MF, Masui T, Higgins CB. Reperfused myocardial infarctions on t1- and susceptibility-enhanced mri: Evidence for loss of compartmentalization of contrast media. *Magn Reson Med*.1994;31:31-39.
114. Diesbourg LD, Prato FS, Wisenberg G, Drost DJ, Marshall TP, Carroll SE, O'Neill B. Quantification of myocardial blood flow and extracellular volumes using a bolus injection of Gd-DTPA: Kinetic modeling in canine ischemic disease. *Magn Reson Med*. 1992;23:239-253.
115. Schwitter J, Saeed M, Wendland MF, Derugin N, Canet E, Brasch RC, Higgins CB. Influence of severity of myocardial injury on distribution of macromolecules: Extravascular versus intravascular gadolinium-based magnetic resonance contrast agents. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1086-1094.
116. Rehwald WG, Fieno DS, Chen EL, Kim RJ, Judd RM. Myocardial magnetic resonance imaging contrast agent concentrations after reversible and irreversible ischemic injury. *Circulation*. 2002;105:224-229.
117. Moxley RT, 3rd, Ashwal S, Pandya S, Connolly A, Florence J, Mathews K, Baumbach L, McDonald C, Sussman M, Wade C, Quality Standards Subcommittee of the American Academy of N, Practice Committee of the Child Neurology S. Practice parameter: Corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: Report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2005;64:13-20.
118. Ogata H, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R. Beneficial effects of beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in Duchenne muscular dystrophy. *J Cardiol*. 2009;53:72-78.

119. Duboc D, Meune C, Lerebours G, Devaux JY, Vaksman G, Becane HM. Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:855-857.
120. Duboc D, Meune C, Pierre B, Wahbi K, Eymard B, Toutain A, Berard C, Vaksman G, Weber S, Becane HM. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *Am Heart J.* 2007;154:596-602.
121. Ishikawa Y, Bach JR, Minami R. Cardioprotection for Duchenne's muscular dystrophy. *Am Heart J.* 1999;137:895-902.
122. Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL, Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study G. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2001;344:1651-1658.
123. Werneck LC, Bonilla E. [Dystrophin in the differentiation between Duchenne and Becker muscular dystrophies: An immunohistochemical study compared with clinical stage, serum enzymes and muscle biopsy]. *Arq Neuropsiquiatr.* 1990;48:454-464.
124. Goldberger E. The AVL, AVR and AVF leads: A simplification of standard lead electrocardiography. *Am Heart J.* 1942:378.
125. Barnes AR, Pardee H.E.B, White, P.D. et al. Standardization of precordial leads. *Am Heart J.* 1938:235-239.
126. Simon G. Whither diagnostic radiology: More complex or a return to simplicity? *Br J Radiol.* 1968;41:642-647.
127. Simon G. The anterior view chest radiograph-criteria for normality derived from a basic analysis of the shadows. George simon lecture delivered at exeter on 16 March 1974. *Clin Radiol.* 1975;26:429-437.
128. Feigenbaun H. *Echocardiography.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
129. Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: Echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol.* 1976;37:7-11.

130. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in m-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-1083.
131. Otterstad JE, Froeland G, St John Sutton M, Holme I. Accuracy and reproducibility of biplane two-dimensional echocardiographic measurements of left ventricular dimensions and function. *Eur Heart J*. 1997;18:507-513.
132. Carr JC, Simonetti O, Bundy J, Li D, Pereles S, Finn JP. Cine MR angiography of the heart with segmented true fast imaging with steady-state precession. *Radiology*. 2001;219:828-834.
133. Haacke EM, Wielopolski PA, Tkach JA, Modic MT. Steady-state free precession imaging in the presence of motion: Application for improved visualization of the cerebrospinal fluid. *Radiology*. 1990;175:545-552.
134. Miller S, Simonetti OP, Carr J, Kramer U, Finn JP. Mr imaging of the heart with cine true fast imaging with steady-state precession: Influence of spatial and temporal resolutions on left ventricular functional parameters. *Radiology*. 2002;223:263-269.
135. Semelka RC, Tomei E, Wagner S, Mayo J, Caputo G, O'Sullivan M, Parmley WW, Chatterjee K, Wolfe C, Higgins CB. Interstudy reproducibility of dimensional and functional measurements between cine magnetic resonance studies in the morphologically abnormal left ventricle. *Am Heart J*. 1990;119:1367-1373.
136. Semelka RC, Tomei E, Wagner S, Mayo J, Kondo C, Suzuki J, Caputo GR, Higgins CB. Normal left ventricular dimensions and function: Interstudy reproducibility of measurements with cine mr imaging. *Radiology*. 1990;174:763-768.
137. Buser PT, Auffermann W, Holt WW, Wagner S, Kircher B, Wolfe C, Higgins CB. Noninvasive evaluation of global left ventricular function with use of cine nuclear magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*. 1989;13:1294-1300.
138. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: A statement for healthcare professionals from the

- cardiac imaging committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation*. 2002;105:539-542.
139. Yotsukura M, Yamamoto A, Kajiwara T, Nishimura T, Sakata K, Ishihara T, Ishikawa K. Qt dispersion in patients with duchenne-type progressive muscular dystrophy. *Am Heart J*. 1999;137:672-677.
 140. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, Wollan PC, Silverstein MD. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol*. 1996;14:7-12.
 141. Perloff JK, Roberts WC, de Leon AC, Jr., O'Doherty D. The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy. An electrocardiographic-pathologic correlative study. *Am J Med*. 1967;42:179-188.
 142. Walcher T, Steinbach P, Spiess J, Kunze M, Grading R, Walcher D, Bernhardt P. Detection of long-term progression of myocardial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy in an affected family: A cardiovascular magnetic resonance study. *Eur J Radiol*. 2011;80:115-119.
 143. Frankel KA, Rosser RJ. The pathology of the heart in progressive muscular dystrophy: Epimyocardial fibrosis. *Hum Pathol*. 1976;7:375-386.
 144. Opie LH. Angiotensin receptor blockers and myocardial infarction: Direct comparative studies are needed. *BMJ*. 2005;330:1270; author reply 1270-1271.
 145. Ramaciotti C, Heistein LC, Coursey M, Lemler MS, Eapen RS, Iannaccone ST, Scott WA. Left ventricular function and response to enalapril in patients with Duchenne muscular dystrophy during the second decade of life. *Am J Cardiol*. 2006;98:825-827.
 146. Markham LW, Spicer RL, Khoury PR, Wong BL, Mathews KD, Cripe LH. Steroid therapy and cardiac function in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Cardiol*. 2005;26:768-771.
 147. Hor KN, Mazur W, Taylor MD, Al-Khalidi HR, Cripe LH, Jefferies JL, Raman SV, Chung ES, Kinnett KJ, Williams K, Gottliebson WM, Benson DW. Effects of steroids and angiotensin converting enzyme inhibition on circumferential strain in boys with Duchenne muscular dystrophy: A cross-sectional and longitudinal study utilizing

cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2011;13:60.

148. Passamano L, Taglia A, Palladino A, Viggiano E, D'Ambrosio P, Scutifero M, Rosaria Cecio M, Torre V, De Luca F, Picillo E, Paciello O, Piluso G, Nigro G, Politano L. Improvement of survival in Duchenne muscular dystrophy: Retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol.* 2012;31:121-125.