

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAPHAEL HENRIQUE DÉA CIRINO

AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA NAS DISTROFIAS MUSCULARES DE  
DUCHENNE E BECKER

CURITIBA

2018

RAPHAEL HENRIQUE DÉA CIRINO

AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA NAS DISTROFIAS MUSCULARES DE  
DUCHENNE E BECKER

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Interna.

Orientador: Dr. Claudio L. Pereira da Cunha.  
Co-orientadora: Dra. Rosana H. Scola.

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS – SIBI/UFPR,  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - SD, BIBLIOTECÁRIO FRANCISCO JOSÉ  
CORDEIRO CRB9/1734, COM OS DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR.

C578 Cirino, Raphael Henrique Déa  
Avaliação ecocardiográfica nas distrofias musculares de Duchenne e  
Becker / Raphael Henrique Déa Cirino. – Curitiba, 2018.  
179 f.: il.

Orientador: Dr. Claudio L. Pereira da Cunha  
Coorientadora: Dra. Rosana H. Scola  
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Interna. Setor de Ciências da Saúde.  
Universidade Federal do Paraná.

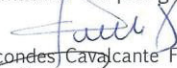
1. Genética médica. 2. Distrofia muscular de Duchenne. 3. Coração  
– diagnóstico por imagem. 4. Ecocardiografia – utilização. 5.  
Ecocardiografia tridimensional – utilização. 6. Insuficiência cardíaca  
sistólica – diagnóstico. I. Cunha, Claudio L. Pereira da. II. Scola,  
Rosana H. III. Programa de Pós - Graduação em Medicina Interna.  
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV.  
Título.


NLMC: WG 141.5.E2



## PARECER

Aos dezesseis dias do mês de abril do ano de dois mil e dezoito, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dr. Marcondes Cavalcante França Júnior (FCM-UNICAMP), Dr. Dalton Bertolim Précoma (PUC-PR), Dr. Paulo Jose Lorenzoni (Depto. de Clínica Médica/UFPR), Dra. Ana Cristina Camarozano Wermelinger (Depto. de Clínica Médica/UFPR) e Orientador: Dr. Cláudio Leinig Pereira da Cunha (Depto. de Clínica Médica/UFPR), exarou o presente parecer sobre a tese de doutorado elaborado por Raphael Henrique Déa Cirino, aluno concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde - Mestrado e Doutorado desta Universidade Federal do Paraná, intitulada: "AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA NAS DISTROFIAS MUSCULARES DE DUCHENNE E BECKER". A Banca examinadora considerou que o aluno apresentou trabalho adequado para tese, e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

  
Dr. Marcondes Cavalcante França Júnior

  
Dr. Dalton Bertolim Précoma

  
Dr. Paulo Jose Lorenzoni

  
Dra. Ana Cristina Camarozano Wermelinger

  
Dr. Cláudio Leinig Pereira da Cunha



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO E DOUTORADO

Ata da Defesa de Tese de Doutorado **Raphael Henrique Déa Cirino**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, realizada nos termos da Resolução da UFPR - nº 65/09 - CEPE.

Aos dezesseis dias do mês de abril do ano de dois mil e dezoito, às oito horas e trinta minutos, no Auditório do Departamento de Clínica Médica no 11º andar do Prédio do CHC/UFPR, teve início a avaliação da Defesa de Tese do Pós-Graduando de Doutorado **Raphael Henrique Déa Cirino**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, desta, Universidade Federal do Paraná, intitulada: "AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA NAS DISTROFIAS MUSCULARES DE DUCHENNE E BECKER". A sessão foi aberta pelo Professor Dr. Cláudio L. Pereira da Cunha, que procedeu à apresentação dos componentes da banca examinadora e do aluno, que delineou a condução dos trabalhos. A Banca Examinadora foi constituída pelos professores: **Dr. Marcondes Cavalcante França Júnior** (FCM-UNICAMP), **Dr. Dalton Bertolim Précoma** (PUC-PR), **Dr. Paulo Jose Lorenzoni** (Depto. de Clínica Médica/UFPR), **Dra. Ana Cristina Camarozano Wermelinger** (Depto. de Clínica Médica/UFPR) e Orientador: **Dr. Cláudio Leinig Pereira da Cunha** (Depto. de Clínica Médica/UFPR). O candidato dispôs de trinta minutos para apresentar o trabalho, seguindo-se a argüição pela Banca Examinadora, em que cada membro dispôs de trinta minutos para argüir com igual tempo concedido ao aluno para defesa. Concluída a argüição, retirou-se a Banca Examinadora para consignação dos conceitos com lavratura do Parecer Conjunto, que considerou o trabalho **aprovado** e sem modificações substanciais na forma e conteúdo, e que foi indicado para publicação nos meios de divulgação científica depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das argüições. E para que tudo constasse na forma do que se legalmente institui, foi a presente ata lavrada pela secretaria Valeria Knapp e assinada pelos componentes da Banca Examinadora para posterior homologação do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

  
Dr. Marcondes Cavalcante França Júnior

  
Dr. Dalton Bertolim Précoma

  
Dr. Paulo Jose Lorenzoni

  
Dra. Ana Cristina Camarozano Wermelinger

  
Dr. Cláudio Leinig Pereira da Cunha

## RESUMO

**Introdução.** A disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (DSVE) é um achado comum nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne (DMD) e Becker (DMB). A detecção precoce de DSVE é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas nesses pacientes. Novas técnicas ecocardiográficas têm sido utilizadas para a detecção de DSVE em diversas cardiopatias. **Objetivo.** Analisar o *strain* miocárdico ecocardiográfico para a detecção precoce de DSVE, determinar os preditores de DSVE e comparar o volume do átrio esquerdo (AE) e os volumes e a fração de ejeção do VE (FEVE) obtidos por meio da ecocardiografia tridimensional e bidimensional nos pacientes com DMD e DMB. **Métodos.** Estudo transversal de 46 pacientes com DMD e 14 pacientes com DMB, do sexo masculino, acompanhados no Serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, entre janeiro de 2014 e junho de 2016. O ecocardiograma transtorácico (ETT) foi realizado com a sonda Matrix do aparelho Philips IE33, pelo mesmo pesquisador. Foram medidos os volumes do AE e do VE e a FEVE utilizando as técnicas tridimensional e bidimensional. Os pacientes foram divididos em: disfunção sistólica do VE (FEVE<52%) ou FEVE preservada (FEVE≥52%). A análise do *strain* miocárdico foi realizada por meio da medida do *strain* longitudinal global (SLG). O SLG foi medido pela ecocardiografia bidimensional com a técnica de *speckle tracking* (rastreamento de pontos). Os pacientes com FEVE preservada foram divididos em: disfunção sistólica precoce do VE (FEVE≥52% e SLG>-18) ou função sistólica do VE preservada (FEVE≥52% e SLG≤-18). **Resultados.** A análise do *strain* miocárdico foi capaz de detectar disfunção sistólica precoce do VE em 50,0% dos pacientes com DMD e em 9,1% dos pacientes com DMB. Os pacientes com disfunção sistólica precoce do VE tiveram maior tempo de duração da doença (p=0,003) e apresentaram maior frequência de uso de corticosteroides (p=0,001) e de mutações nos éxons 46 (p=0,003), 47 (p=0,003), 48 (p<0,001), 49 (p<0,001), 50 (p=0,003) e 52 (p=0,047) do gene *DMD*. A correlação entre os métodos tridimensional e bidimensional para a medida do volume do AE e dos volumes diastólico e sistólico do VE foi forte, com coeficientes de correção de 0,87 (p<0,001), 0,94 (p<0,001) e 0,90 (p<0,001), respectivamente. A ecocardiografia tridimensional apresentou menores volumes do AE (p<0,001) e do VE (p<0,001). A FEVE foi semelhante entre as duas técnicas. **Conclusão.** A análise do *strain* miocárdico é útil para o diagnóstico precoce de DSVE nos pacientes com DMD. Idade mais avançada, uso de corticosteroides e mutações na região de “hot spot” do gene *DMD* estão associados à disfunção sistólica precoce do VE. Os volumes do AE e do VE ao método tridimensional são menores quando comparados àqueles medidos pela ecocardiografia bidimensional nos pacientes com DMD e DMB.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchenne. Distrofia muscular de Becker. Análise genética. Alterações ecocardiográficas. *Strain* miocárdico. *Speckle tracking*.

## ABSTRACT

**Introduction.** Left ventricular systolic dysfunction (LVSD) is a common finding in patients with Duchenne (DMD) and Becker (BMD) muscular dystrophies. Early detection of LVSD is important for therapeutic strategies for DMD and BMD patients. Novel echocardiographic techniques have been used for the detection of LVSD in several heart diseases. **Objective.** We analyzed the myocardial strain by echocardiography for the early detection of LVSD, determined the predictors of early LVSD and compared left atrium (LA) volume and left ventricular (LV) volumes and ejection fraction (LVEF) obtained through three-dimensional (3DE) and two-dimensional (2DE) echocardiography in DMD and BMD patients. **Methods.** Cross-sectional study of 46 DMD and 14 BMD male patients followed in the Neuromuscular Disorders Service of Hospital de Clínicas of Federal University of Parana, between January 2014 and June 2016. Transthoracic echocardiogram (TTE) was performed with the Matrix probe of the Philips IE33 machine, by the same researcher. We measured LA volume and LV volumes and ejection fraction using 3DE and 2DE techniques. Patients were determined to have overt LVSD (LVEF<52%) or normal LVEF (LVEF≥52%). Myocardial strain analysis was derived from global longitudinal strain (GLS) measurements. GLS was measured by 2DE with the speckle tracking technique. Patients with LVEF≥52% were determined to have early LVSD [LVEF≥52% and GLS>-18] or normal left ventricular systolic function [LVEF≥52% and GLS≤-18]. **Results.** Myocardial strain analysis was able to detect early LVSD in 50.0% of DMD patients and in 9.1% of BMD patients. Patients with early LVSD had longer disease duration (p=0.003) and a higher frequency of corticosteroid therapy (p=0.001) and of mutations in exons 45 (p=0.044), 46 (p=0.003), 47 (p=0.003), 48 (p<0.001), 49 (p<0.001), 50 (p=0.003) and 52 (p=0.047) of the *DMD* gene. The correlation between 3DE and 2DE for the measurement of LA volume and LV diastolic and systolic volumes was strong, with correlation coefficients of 0.87 (p<0.001), 0.94 (p<0.001) e 0.90 (p<0.001), respectively. 3DE presented lower LA (p<0.001) and LV volumes (p<0.001). LVEF was similar between the two techniques. **Conclusion.** Myocardial strain measurements are useful for the early diagnosis of LVSD in DMD patients. Older age, use of corticosteroids and mutations within the “hot spot” region of the *DMD* gene are associated with early LVSD. LA and LV volumes are smaller by 3DE when compared to 2DE measurements in DMD and BMD patients.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy. Becker muscular dystrophy. Genetic analysis. Echocardiographic abnormalities. Myocardial strain. Speckle tracking.

À minha esposa Renata, a meus pais, a meus sogros e a meu irmão Philippe, pelo apoio e incentivo infindáveis.



## AGRADECIMENTOS

Inicialmente eu gostaria de agradecer aos meus professores, que me incentivaram a buscar o conhecimento, a exercer a profissão de forma ética e, principalmente, a ser médico. Agradeço a todos aqueles que participaram desse projeto: meu orientador Dr. Claudio L. Pereira da Cunha e minha co-orientadora Dra. Rosana H. Scola; os Serviços de Cardiologia e de Ecocardiografia do CHC-UFPR, em especial a Dra. Ana C. Camarozano Wermelinger; toda a equipe do Serviço de Doenças Neuromusculares do CHC-UFPR, em especial o Dr. Paulo J. Lorenzoni, a Dra. Claudia S. Kamoi Kay e o Dr. Lineu C. Werneck; e também a Dra. Eliane R. Carmes e a Dra. Marcia Olandoski. A todos os pacientes, que me permitiram confortá-los de alguma forma, e a todos os alunos, para os quais pude transmitir parte do meu conhecimento e um pouco da minha ainda breve vivência na medicina, tenho profunda gratidão, pois também fizeram parte dessa história e ajudaram a construir a pessoa e o médico que sou hoje.

À minha família, não faltam motivos para agradecer. Ergueram uma base sólida e me deram ferramentas para alcançar os meus objetivos. Agradeço de forma especial a meu pai e a minha mãe, Carlos e Beth, que sempre foram grandes incentivadores da minha escalada, dando uma mão nos momentos difíceis e comemorando cada vitória juntos, com carinho e amor inesgotáveis. Ao meu irmão e melhor amigo, Philippe, por sempre estar junto comigo e por tornar essa caminhada muito mais leve do que parecia ser. Aos meus avôs e avós, que tanto amo, pelos mimos, pelo colo e pelo apoio em todos os momentos, mesmo naqueles em que pareciam estar tão distantes. Aos amigos, que sempre estiveram por perto, obrigado por fazerem parte dessa família.

À minha esposa Renata, faltam palavras para expressar a sua importância na minha vida e na minha profissão. Obrigado por me estimular a ser sempre melhor, pelo companheirismo em tudo que faço e pelo amor de toda uma vida.

Agradeço a Deus por permitir que eu esteja junto de pessoas tão especiais, por me sustentar em toda essa trajetória e por me dar a oportunidade de fazer o bem.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS PEQUENAS MUTAÇÕES NO GENE <i>DMD</i> DOS PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne e Becker CHC-UFPR 2014-2018.....	74
TABELA 2 – MEDIDAS ECOCARDIOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne e Becker CHC-UFPR 2014-2018 .....	83
TABELA 3 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne e Becker CHC-UFPR 2014-2018 .....	88
TABELA 4 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne e Becker CHC-UFPR 2014-2018.....	88
TABELA 5 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne CHC-UFPR 2014-2018.....	90
TABELA 6 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne CHC-UFPR 2014-2018 .....	90
TABELA 7 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne e Becker E FE3D≥52% CHC-UFPR 2014-2018 .....	92

TABELA 8 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER E FE3D≥52% CHC-UFPR 2014-2018 .....	93
TABELA 9 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E FE3D≥52% CHC-UFPR 2014-2018 .....	95
TABELA 10 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E FE3D≥52% CHC-UFPR 2014-2018.....	96
TABELA 11 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL E A TRIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DOS VOLUMES E PARA O CÁLCULO DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018.....	97
TABELA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA DOS VOLUMES E PARA O CÁLCULO DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018.....	101
TABELA 13 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL E A TRIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018.....	102
TABELA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA DO VOLUME ATRIAL ESQUERDO NOS	

PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018.....	103
--	-----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – DISTROFINA E OUTRAS PROTEÍNAS EM UMA FIBRA MUSCULAR .....	24
FIGURA 2 – FISIOPATOLOGIA DA CARDIOMIOPATIA NAS DISTROFIAS MUSCULARES DE DUCHENNE E BECKER .....	29
FIGURA 3 – TRADUÇÃO DA DISTROFINA EM UM INDIVÍDUO NORMAL, NA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E NA DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER .....	32
FIGURA 4 – MEDIDA DO SEPTO INTERVENTRICULAR, DA PAREDE POSTERIOR E DAS DIMENSÕES DIASTÓLICA E SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO PELO MODO M.....	54
FIGURA 5 – MEDIDA DOS VOLUMES DIASTÓLICO E SISTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO PELO MÉTODO BIDIMENSIONAL	55
FIGURA 6 – MEDIDA DOS VOLUMES DIASTÓLICO E SISTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO PELO MÉTODO TRIDIMENSIONAL	56
FIGURA 7 – MEDIDA DO DIÂMETRO ANTEROPOSTERIOR DO ÁTRIO ESQUERDO PELO MODO M .....	57
FIGURA 8 – MEDIDA DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO PELO MÉTODO BIDIMENSIONAL .....	58
FIGURA 9 – MEDIDA DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO PELO MÉTODO TRIDIMENSIONAL.....	59
FIGURA 10 – MEDIDA DO STRAIN LONGITUDINAL GLOBAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	61
FIGURA 11 – MEDIDA DA VELOCIDADE DA ONDA E, DA VELOCIDADE DA ONDA A E DO TEMPO DE DESACELERAÇÃO DA ONDA E....	62
FIGURA 12 – MEDIDA DA VELOCIDADE DA ONDA E' SEPTAL E DA VELOCIDADE DA ONDA S' SEPTAL .....	63
FIGURA 13 – FLUXOGRAMA REFERENTE À SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA A ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELO MÉTODO TRIDIMENSIONAL .....	65

FIGURA 14 – FLUXOGRAMA REFERENTE À SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA A ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	66
FIGURA 15 – FLUXOGRAMA REFERENTE À SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA A ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL .....	67
FIGURA 16 – DEFORMIDADE TORÁCICA EM PACIENTE COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	68
GRÁFICO 1 – TIPOS DE MUTAÇÃO NO GENE <i>DMD</i> DOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 .....	74
GRÁFICO 2 – ÉXONS ACOMETIDOS DO GENE <i>DMD</i> NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 .....	75
GRÁFICO 3 – GRAUS DE COMPROMETIMENTO NOS TRÊS DOMÍNIOS PRINCIPAIS DA DISTROFINA NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE CHC-UFPR 2014-2018.....	76
GRÁFICO 4 – GRAUS DE COMPROMETIMENTO NOS TRÊS DOMÍNIOS PRINCIPAIS DA DISTROFINA NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER CHC-UFPR 2014-2018. .	77
GRÁFICO 5 – SINTOMAS NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 .....	79
GRÁFICO 6 – ACHADOS AO EXAME FÍSICO CARDIOVASCULAR E DO TÓRAX NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 .....	80
GRÁFICO 7 – ALTERAÇÕES ELETROCARDIOGRÁFICAS NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 .....	81
GRÁFICO 8 – FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELOS MÉTODOS BIDIMENSIONAL E	

TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA  
MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-201885

- GRÁFICO 9 – DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO  
ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR  
DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 ..... 85
- GRÁFICO 10 – VALOR ADICIONAL DO *STRAIN* LONGITUDINAL GLOBAL  
NA DETECÇÃO DE DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO  
ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR  
DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 ..... 86
- GRÁFICO 11 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA  
TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A  
MENSURAÇÃO DO VOLUME DIASTÓLICO DO VENTRÍCULO  
ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR  
DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 ..... 98
- GRÁFICO 12 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA  
TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A  
MENSURAÇÃO DO VOLUME SISTÓLICO DO VENTRÍCULO  
ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR  
DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018 ..... 99
- GRÁFICO 13 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA  
TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA O CÁLCULO DA  
FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS  
PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E  
BECKER CHC-UFPR 2014-2018..... 100
- GRÁFICO 14 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA  
TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A  
MENSURAÇÃO DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO NOS  
PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E  
BECKER CHC-UFPR 2014-2018..... 102



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D - método bidimensional

3D - método tridimensional

AE - átrio esquerdo

ARV - alteração da repolarização ventricular

ASC - área de superfície corporal

BAV - bloqueio atrioventricular

BDAS - bloqueio divisional anterossuperior do ramo esquerdo do feixe de His

bpm - batimentos por minuto

BRD - bloqueio do ramo direito do feixe de His

BRE - bloqueio do ramo esquerdo do feixe de His

BRA-II - bloqueador do receptor da angiotensina-II

CHC-UFPR - Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

CK - creatinoquinase

CK-MB - isoenzima MB da creatinoquinase

cm - centímetros

DDVE - dimensão diastólica do ventrículo esquerdo

dl - decilitros

DMB - distrofia muscular de Becker

DMD - distrofia muscular de Duchenne

DNA - ácido desoxirribonucleico

DP - desvio-padrão

DSVE - disfunção sistólica do ventrículo esquerdo

ECG - eletrocardiograma

EP - encurtamento percentual

ETT - ecocardiograma transtorácico

FC - frequência cardíaca

FR - frequência respiratória

FE - fração de ejeção

FE3D - fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional

FEVE - fração de ejeção do ventrículo esquerdo

g - gramas

IECA - inibidor da enzima de conversão da angiotensina

irpm - incursões respiratórias por minuto

MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

m - metros

mg - miligramas

ml - mililitros

mm - milímetros

mmHg - milímetros de mercúrio

ms - milissegundos

PAD - pressão arterial diastólica

PAS - pressão arterial sistólica

PCR - reação em cadeia da polimerase

PCRD - perturbação da condução do ramo direito do feixe de His

PP - parede posterior do VE

s - segundos

SAE - sobrecarga atrial esquerda

SaO<sub>2</sub> - saturação arterial de oxigênio

SIV - septo interventricular

SLG - *strain* longitudinal global

SVD - sobrecarga ventricular direita

SVE - sobrecarga ventricular esquerda

TC6 - teste de caminhada de seis minutos

TDAH - transtorno do déficit de atenção com hiperatividade

TDE - tempo de desaceleração da onda E

TGP - transaminase glutâmico-pirúvica

TGO - transaminase glutâmico-oxalacética

VDVE - volume diastólico do ventrículo esquerdo

VE - ventrículo esquerdo

VR - valor de referência

VSVE - volume sistólico do ventrículo esquerdo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1	DISTROFINOPATIAS.....	24
1.1.1	Distrofia muscular de Duchenne .....	25
1.1.2	Distrofia muscular de Becker.....	27
1.1.3	Manifestações cardíacas nas distrofias musculares de Duchenne e Becker.....	28
1.1.4	Diagnóstico das distrofias musculares de Duchenne e Becker .....	31
1.1.5	Diagnóstico da cardiomiopatia nas distrofias musculares de Duchenne e Becker.....	34
1.1.5.1	Eletrocardiografia .....	35
1.1.5.2	Ecocardiografia .....	36
1.1.6	Tratamento das distrofias musculares de Duchenne e Becker .....	39
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	45
3.1	MATERIAL .....	46
3.2	MÉTODOS .....	46
3.2.1	Evolução da doença, doenças associadas e história familiar.....	47
3.2.2	Exames laboratoriais .....	47
3.2.3	Estudo genético.....	48
3.2.4	Análise imunohistoquímica de material obtido na biopsia muscular.....	48
3.2.5	Tratamento .....	49
3.2.6	Avaliação clínica.....	49
3.2.7	Avaliação eletrocardiográfica .....	50
3.2.8	Avaliação ecocardiográfica.....	52
3.2.9	Análise dos fatores associados à disfunção sistólica do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional .....	64

3.2.10	Análise dos fatores associados à disfunção sistólica precoce do ventrículo esquerdo .....	65
3.2.11	Análise comparativa entre a ecocardiografia bidimensional e a ecocardiografia tridimensional .....	66
3.3	MÉTODO ESTATÍSTICO .....	68
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
4.1	CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA .....	71
4.1.1	Evolução da doença, doenças associadas e história familiar .....	71
4.1.2	Exames laboratoriais .....	72
4.1.3	Estudo genético .....	73
4.1.4	Análise imunohistoquímica de material obtido na biopsia muscular .....	75
4.1.5	Tratamento .....	77
4.1.6	Avaliação clínica .....	78
4.1.7	Avaliação eletrocardiográfica .....	80
4.2	AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA .....	81
4.2.1	Dimensões e espessuras miocárdicas do ventrículo esquerdo .....	84
4.2.2	Função sistólica do ventrículo esquerdo .....	84
4.2.3	Dimensões do átrio esquerdo e avaliação do fluxo de entrada mitral e da velocidade anular mitral .....	86
4.3	ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL .....	86
4.4	ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL, RESTRITA A PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE .....	89
4.5	ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO .....	91

4.6	ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO, RESTRITA A PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE .....	94
4.7	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DOS VOLUMES E PARA O CÁLCULO DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO .....	97
4.7.1	Correlação entre os dois métodos.....	97
4.7.2	Comparação entre os dois métodos.....	100
4.7.3	Concordância entre os dois métodos .....	101
4.8	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO .....	101
4.8.1	Correlação entre os dois métodos.....	101
4.8.2	Comparação entre os dois métodos.....	102
4.8.3	Concordância entre os dois métodos .....	103
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>104</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA .....	105
5.2	ALTERAÇÕES ECOCARDIOGRÁFICAS .....	107
5.3	ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO .....	110
5.4	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL E A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL .....	113
5.5	LIMITAÇÕES.....	114
5.6	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	115
5.7	CONCLUSÕES .....	117
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>118</b>
	<b>APÊNDICE 1 - FOLHA DE COLETA DE DADOS</b> .....	<b>129</b>

<b>APÊNDICE 2 - FOLHA DE COLETA DE DADOS ECOCARDIOGRÁFICOS.....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO 1 - VALORES DE REFERÊNCIA DOS PARÂMETROS ELETROCARDIOGRÁFICOS EM CRIANÇAS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS .....</b>	<b>132</b>
<b>ANEXO 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER .....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO 4 - ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO 5 - ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE .....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO 6 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO CHC-UFPR .....</b>	<b>149</b>
<b>ARTIGO - PREDICTORS OF EARLY LEFT VENTRICULAR SYSTOLIC DYSFUNCTION IN DMD PATIENTS.....</b>	<b>152</b>



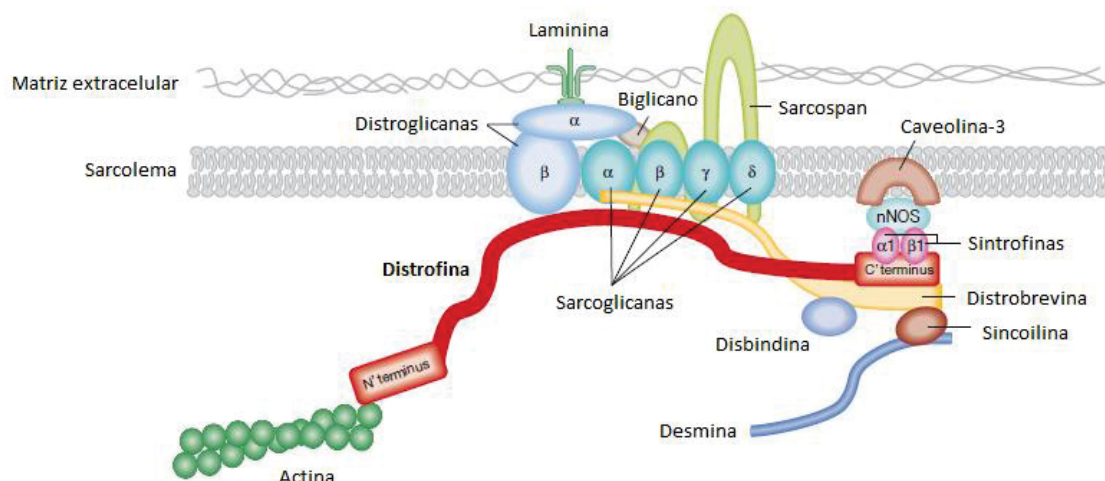
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DISTROFINOPATIAS

As distrofias musculares são um grupo heterogêneo de doenças geneticamente determinadas e de natureza progressiva e degenerativa que acometem a musculatura esquelética. As distrofias musculares ocorrem devido a alterações nas proteínas da fibra muscular. Existem diferentes subtipos de distrofia muscular, dependendo da proteína de membrana acometida (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010).

A distrofina é uma proteína citoesquelética localizada na membrana plasmática. Nas fibras musculares, a distrofina se associa a glicoproteínas que ligam o citoesqueleto a proteínas da membrana e, em seguida, à laminina e à matriz extracelular. A distrofina apresenta três domínios de maior importância: o terminal carboxila, que se liga à laminina; o terminal amino que se liga à actina e o domínio rod, que contém a região de repetição *espectrina-like* (FIGURA 1).

FIGURA 1 – DISTROFINA E OUTRAS PROTEÍNAS EM UMA FIBRA MUSCULAR



FONTE: Adaptado de NOWAK (2004).



Na ausência da distrofina ou quando a distrofina é anormal, o sarcolema se torna instável na contração e no relaxamento, o que acarreta um influxo excessivo de cálcio, alteração da óxido nítrico sintase neuronal e da localização e função mitocondriais, gerando inflamação e necrose das fibras musculares, com liposubstituição gradual (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010; HERMANS *et al.*, 2010; VAN WESTERING *et al.*, 2015).

A distrofina é codificada pelo gene da distrofina (gene *DMD*), que está localizado no braço curto do cromossomo X, na região Xp21 (BUSHBY *et al.*, 2010a). O gene *DMD*, com 79 éxons, é um dos maiores genes do genoma humano (D'AMARIO *et al.*, 2017). As distrofias musculares de Duchenne (DMD) e Becker (DMB) são doenças de herança recessiva ligada ao cromossomo X, ambas definidas por características clínicas e mutações específicas que envolvem o gene *DMD*. A gravidade do fenótipo é variável, podendo ocorrer ausência completa da distrofina, que corresponde ao fenótipo da DMD ou, a distrofina está presente, mas reduzida em tamanho e quantidade, o que caracteriza a DMB, sendo ambos os fenótipos parte de um conjunto de doenças denominado de distrofinopatias (ROPPER, A.H.; SAMUELS, M.A., 2009).

#### 1.1.1 Distrofia muscular de Duchenne

A incidência da DMD é de aproximadamente 1 caso a cada 3.500-6.000 crianças do sexo masculino nascidas (BUSHBY *et al.*, 2010a). A maioria dos casos é de origem familiar, transmitida como um traço recessivo ligado ao X e, por esse motivo, presente quase que exclusivamente no sexo masculino. Raramente, uma distrofia muscular tipo Duchenne pode ocorrer em indivíduos do sexo feminino, o que poderia ser explicado nas pacientes com síndrome de Turner, nas quais o único cromossomo X carrega a mutação do gene da *DMD*, ou baseado no princípio de Lyon, ou seja, quando há inativação do cromossomo X paterno não afetado, permitindo maior expressão do cromossomo X materno, detentor da mutação do gene *DMD*. Cerca de um terço dos casos é causado por mutações de novo. A prevalência da DMD é

menor, aproximadamente 1 caso a cada 18.000 indivíduos do sexo masculino, devido à menor expectativa de vida desses pacientes (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010; ROPPER, A.H.; SAMUELS, M.A., 2009).

A DMD tem início precocemente na infância com uma evolução relativamente rápida e progressiva. Quase metade dos pacientes apresentam sinais da doença antes mesmo de começarem a andar. Sintomas iniciais podem incluir atraso no início da deambulação – geralmente acima de 16 a 18 meses de idade – quedas frequentes e/ou dificuldade para andar, correr e subir escadas (ROPPER, A.H.; SAMUELS, M.A., 2009; BUSHBY *et al.*, 2010a). A fraqueza muscular proximal de membros inferiores é um achado semiológico frequentemente descrito na DMD e pode ser demonstrada por meio da manobra de Gowers. Um terço dos pacientes apresenta déficit cognitivo leve, com dificuldades predominantemente verbais (ROPPER, A.H.; SAMUELS, M.A., 2009). A maioria dos pacientes são diagnosticados ao redor dos 5 anos de idade, quando suas funções motoras são marcadamente diferentes se comparadas com as de outras crianças da mesma idade (BUSHBY *et al.*, 2010a). Logo se evidencia um caminhar sobre os artelhos e uma marcha anserina, seguida por dificuldade franca para caminhar, subir escadas e levantar-se de cadeiras. O indivíduo assume uma lordose exagerada para manter o equilíbrio. Com a evolução da doença, os membros superiores são afetados, contraturas podem ocorrer e, geralmente, aos 12 anos de idade perdem a deambulação e necessitam de cadeira de rodas (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010). A escoliose pode se tornar grave e comprometer a função respiratória, que em conjunto com a fraqueza da musculatura respiratória, causa um declínio progressivo da capacidade pulmonar, geralmente iniciando aos 8 anos de idade. A hipoventilação noturna pode causar cefaleia matinal e fadiga diurna se não tratada. Por volta dos 20 anos de idade a respiração está tão comprometida que há necessidade de suporte ventilatório (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010).

Pacientes com DMD geralmente sobrevivem até o final da adolescência, sendo que não mais do que 20 a 25% destes pacientes vivem além dos 25 anos de idade (ROPPER, A.H.; SAMUELS, M.A., 2009). Sem tratamento, o óbito ocorre, em média, aos 19 anos de idade (BUSHBY *et al.*, 2010a). A morte ocorre devido a causas respiratórias e cardíacas. O óbito de causa cardíaca primária acontece em 25% dos pacientes, mas parece crescer em importância como causa de mortalidade tardia em função da melhora no suporte respiratório atualmente disponível (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013; BUSHBY *et al.*, 2010b). Birnkrant e colaboradores sugerem que, em pacientes tratados com suporte ventilatório, o principal determinante da sobrevida é a função cardíaca (BIRNKRANT *et al.*, 2016). A expectativa de vida da DMD melhorou muito nas últimas três décadas, provavelmente devido ao uso de corticosteroides, melhor suporte ventilatório disponível, manejo das complicações cardíacas e ortopédicas e programas de reabilitação. Além da expectativa de vida, essas intervenções possibilitaram melhora na funcionalidade, na qualidade de vida e na saúde global desses pacientes (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010; BUSHBY *et al.*, 2010a, 2010b).

### 1.1.2 Distrofia muscular de Becker

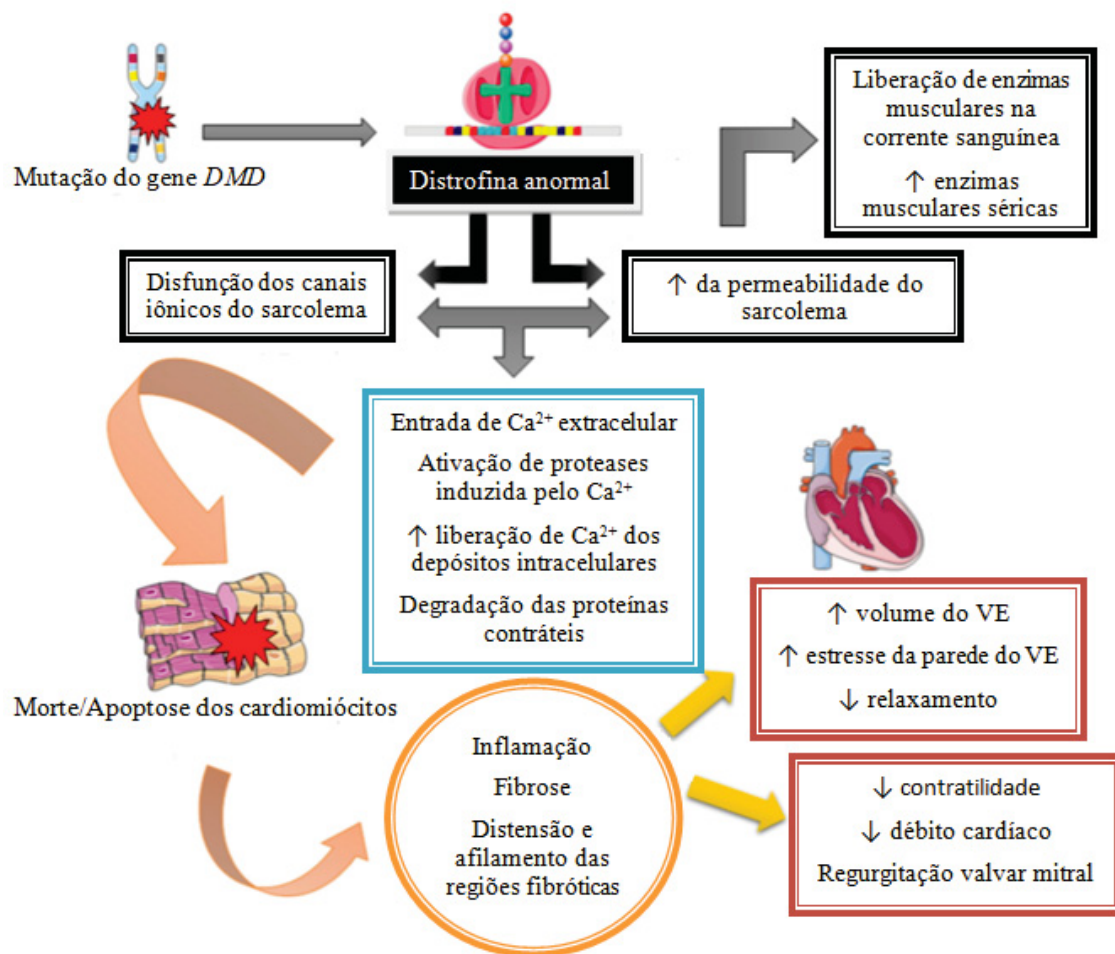
A DMB é uma distrofinopatia mais rara, com uma frequência de aproximadamente 1 caso a cada 20.000 indivíduos (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010). A prevalência é de 2,4 casos para cada 100.000 indivíduos (HERMANS *et al.*, 2010). A idade de início da DMB é tipicamente após os 10 anos, podendo variar entre 3 e 21 anos. O início dos sintomas após os 6 anos de idade ajuda a diferenciar clinicamente a DMB da DMD. A velocidade de evolução da doença é menor se comparada à DMD, com muitos pacientes ainda capazes de caminhar ao redor dos 16 anos de idade e, frequentemente, posteriormente a isso. As alterações cognitivas são menos frequentes do que na DMD (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010; BUSHBY *et al.*, 2010a; HERMANS *et al.*, 2010).

Na DMB, o prognóstico é bastante favorável se comparado ao da DMD, com muitos pacientes sobrevivendo até a fase adulta. A média da idade da morte na DMB é de 45 anos, variando de 21 a 89 anos. As complicações cardíacas contribuem com até 50% das mortes nesses pacientes (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010).

### 1.1.3 Manifestações cardíacas nas distrofias musculares de Duchenne e Becker

A deficiência de distrofina acarreta instabilidade do sarcolema nos cardiomiócitos, o que desencadeia um processo fisiopatológico que, em última instância, induz inflamação e fibrose miocárdicas com consequente dilatação e comprometimento da função ventricular esquerda (D'AMARIO *et al.*, 2017) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – FISIOPATOLOGIA DA CARDIOMIOPATIA NAS DISTROFIAS MUSCULARES DE DUCHENNE E BECKER



FONTE: Adaptado de D'AMARIO (2017).

A maioria dos pacientes com DMD desenvolve cardiomiopatia, mas os sintomas podem ser mascarados pela grave fraqueza musculoesquelética. O envolvimento cardíaco pré-clínico está presente em 25% dos pacientes aos seis anos de idade, sendo comum o início da cardiomiopatia clinicamente aparente após os 10 anos de idade (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013; D'AMARIO *et al.*, 2017). Até 90% dos pacientes com 18 anos ou mais apresentam cardiomiopatia dilatada ao ecocardiograma, entretanto, a idade de aparecimento das alterações cardíacas, assim como suas manifestações clínicas, é bastante variável. Ashwath *et al* estudaram 75 pacientes com DMD e mais de 10 anos de idade e não encontraram uma relação entre o tipo de mutação e o início e a gravidade da cardiomiopatia (ASHWATH *et al.*, 2014). As deformidades torácicas e a elevação do diafragma podem alterar o exame cardiovascular desses pacientes. A redução do diâmetro anteroposterior do

tórax é comumente responsável pelo deslocamento do impulso sistólico para a borda esternal esquerda, pelo sopro mesossistólico no segundo espaço intercostal esquerdo e pela hiperfonese do componente pulmonar da segunda bulha (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013).

Na DMD, a taquicardia sinusal é a arritmia mais identificada. Podem ocorrer arritmias atriais, incluindo fibrilação e flutter atriais, anomalias da condução atrioventricular, com intervalo PR curto ou prolongado, e arritmias ventriculares, principalmente extrassístoles ventriculares, que ocorrem em 30% dos casos (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013). As arritmias ventriculares são mais comuns em pacientes com comprometimento da função ventricular e podem ser marcadores adicionais de deterioração da função miocárdica. A disfunção ventricular parece ser um forte preditor de mortalidade na DMD (HERMANS *et al.*, 2010). Arritmias ventriculares mais complexas foram relatadas mais comumente entre os indivíduos com doença muscular grave, porém, não foram preditoras de maior mortalidade nesses pacientes. A morte súbita ocorre na DMD, mas não está claro se esta é causada primariamente por arritmia (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013).

O envolvimento cardíaco na DMB é independente da gravidade do envolvimento musculoesquelético, sendo que mais de 50% dos pacientes com doença musculoesquelética subclínica apresentam doença cardíaca (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013). A cardiomiopatia geralmente se manifesta posteriormente, mas pode obscurecer a fraqueza dos membros (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010). O acometimento cardíaco é bastante variável, podendo ser assintomático ou sintomático, e caracterizado por cardiomiopatia dilatada, cardiomiopatia hipertrófica, insuficiência cardíaca, arritmias graves ou morte súbita cardíaca (FINSTERER *et al.*, 2008). O aparecimento de sintomas decorrentes da cardiomiopatia – incluindo palpitação, tontura, síncope, dispneia ao repouso ou durante o exercício, edema de membros inferiores e tosse – aumenta com a idade, assim como as alterações eletrocardiográficas. Apesar de imprevisível o tempo para o desenvolvimento da cardiomiopatia, mutações em regiões específicas do gene

*DMD* predispõem os pacientes com *DMB* ao início precoce da doença cardíaca (FINSTERER *et al.*, 2008; HERMANS *et al.*, 2010).

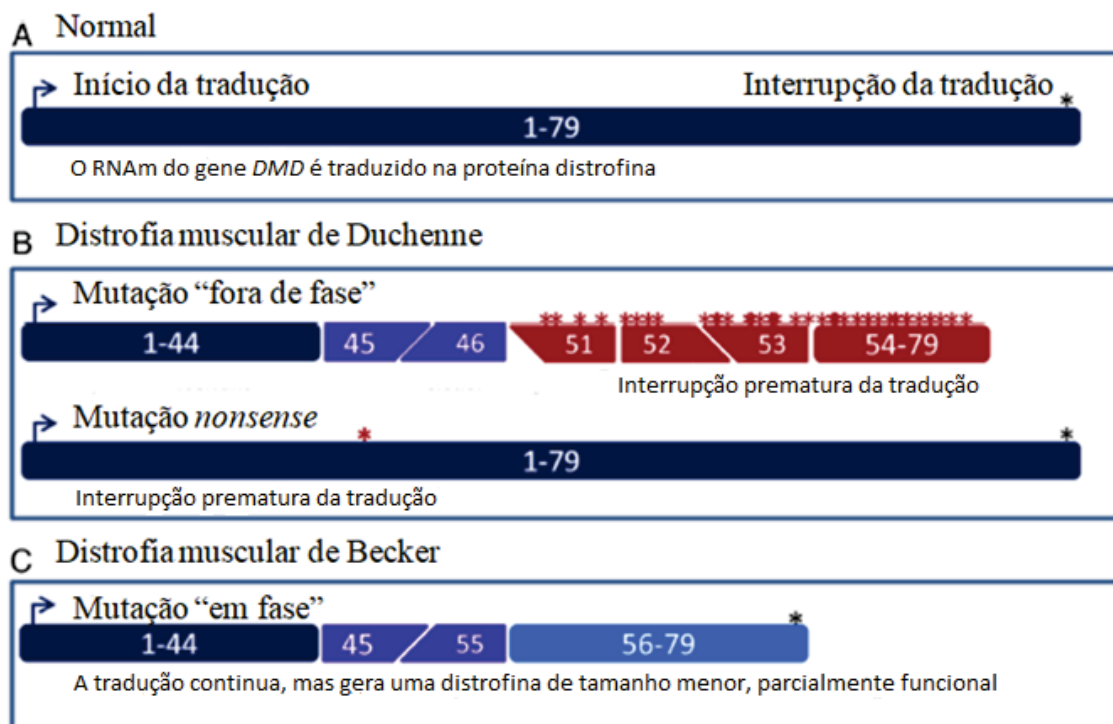
#### 1.1.4 Diagnóstico das distrofias musculares de Duchenne e Becker

Diante de um paciente no qual haja a suspeita clínica de uma distrofia muscular ligada ao cromossomo X, o primeiro passo na investigação é a dosagem da creatinoquinase (CK). Os valores de CK típicos na *DMD* e na *DMB* são pelo menos 20 vezes os normais, porém, devido à destruição das fibras musculares e liposubstituição, os níveis séricos de CK diminuem gradualmente com a idade. O aumento de transaminases pode ser a primeira alteração laboratorial detectada, em decorrência da lesão muscular, necessitando investigação complementar (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010).

Os pacientes que apresentam manifestações clínicas compatíveis e aumento nos níveis séricos de CK devem ser submetidos à análise do DNA, a qual demonstra uma deleção ou uma duplicação na região cromossômica Xp21 em aproximadamente 65% dos pacientes com *DMD* e em 85% dos pacientes com *DMB*. Pequenas mutações (por exemplo: mutação de ponto, pequena deleção ou inserção, mutação *nonsense*, mutação no *splice site*, mutação intrônica) são responsáveis pelo restante dos casos. A maioria das mutações do tipo deleção ocorre na região de “*hot spot*” do gene *DMD*, a qual compreende a região entre os éxons 45 e 55 (AARTSMA-RUS *et al.*, 2016). Os pacientes com *DMD* apresentam tipicamente rearranjos “fora de fase” (“*out of frame*”), que alteram estruturas de leitura do DNA e, conseqüentemente, alteram aminoácidos a jusante da mutação, interrompendo a formação da proteína ou formando outra proteína. Os indivíduos com *DMB* apresentam rearranjos “em fase” (“*in frame*”), que mantêm a sequência de aminoácidos, formando uma proteína com menos aminoácidos (“minidistrofina”) (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010) (FIGURA 3).



FIGURA 3 – TRADUÇÃO DA DISTROFINA EM UM INDIVÍDUO NORMAL, NA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E NA DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER



FONTE: Adaptado de AARTSMA-RUS (2016).

LEGENDA: (A) O RNA mensageiro (RNAm) da distrofina apresenta 79 éxons que, em um indivíduo normal, são traduzidos na proteína distrofina. (B) Na DMD, há interrupção prematura da tradu o. Isso pode ocorrer devido a mutações "fora de fase" (neste exemplo há deleção dos éxons 47 ao 50 - painel superior), o que leva   inserção de aminoácidos aberrantes e interrupção prematura da tradu o. Por outro lado, uma mutação de ponto pode trocar o aminoácido de um códon, transformando-o em um códon de parada prematuro, que desencadear  a interrupção precoce da tradu o, porém, sem perda da "fase de leitura" (muta o *nonsense* - painel inferior). (C) Na DMB, não há interrupção da tradu o (neste exemplo há deleção dos éxons 46 ao 54), no entanto, a distrofina produzida será menor pois faltam os aminoácidos codificados pelos éxons 46 ao 54.

O exame de rea o em cadeia da polimerase multiplex (PCR multiplex) do gene *DMD*   capaz de determinar a muta o na maioria dos casos de deleção, sendo que utiliza *primers* direcionados para os principais, mas não todos os 79 éxons do gene da distrofina. O exame pela técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) faz uma varredura em todo o gene *DMD*, detectando deleções e duplica es de seus 79 éxons. Finalmente, o exame de sequenciamento direto, ou Sanger, determina cada um dos nucleotídeos presentes no gene *DMD* (sequenciamento dos seus éxons e regiões intr nicas próximas) e   capaz de prever, na maioria dos casos, se ocorrerá um rearranjo "fora de fase" ou "em fase" (AARTSMA-RUS *et al.*, 2006; DEBURGRAVE *et al.*, 2007; GATTA *et al.*, 2005; WHITE *et al.*, 2006). A presença de uma deleção, duplica o ou pequena muta o, em um paciente



com achados clínicos compatíveis, confirma o diagnóstico de DMD ou DMB (AARTSMA-RUS *et al.*, 2006). Além da confirmação diagnóstica, o teste genético fornece informações clínicas essenciais para o aconselhamento genético, o diagnóstico pré-natal e para as terapias direcionadas a mutações específicas, portanto, o teste genético deve ser realizado mesmo naqueles pacientes que eventualmente já tenham confirmado o diagnóstico por meio da biopsia muscular (BUSHBY *et al.*, 2010a).

A caracterização completa da mutação permite prever o efeito da mesma sobre a “fase de leitura” do gene, que é um importante determinante da variabilidade fenotípica observada nas distrofinopatias (AARTSMA-RUS *et al.*, 2006; BUSHBY *et al.*, 2010a). Acredita-se que, em pacientes com DMB, mutações no terminal amino, incluindo a região promotora do gene *DMD*, estejam relacionadas com o desenvolvimento precoce da doença, enquanto mutações que preservam o terminal carboxila estariam relacionadas com o desenvolvimento tardio e com uma forma mais leve da doença (FINSTERER *et al.*, 2008). Sugere-se que determinadas mutações no gene *DMD* possam estar relacionadas com diferentes idades de aparecimento, intensidade de acometimento e graus de progressão da cardiomiopatia, sendo algumas delas associadas a um pior prognóstico cardíaco e outras a um possível fator de cardioproteção, porém, esta associação ainda não foi bem estabelecida (AARTSMA-RUS *et al.*, 2016; ASHWATH *et al.*, 2014; BARP *et al.*, 2015; JEFFERIES *et al.*, 2005; TSUDA *et al.*, 2015). Kaspar e colaboradores demonstraram que, em pacientes com DMB, as deleções localizadas no terminal amino entre os éxons 2 e 7 e aquelas localizadas no domínio rod entre os éxons 45 e 49 com a região *hinge* 3 preservada e com perda da fase de leitura apresentam início da cardiomiopatia mais precoce se comparadas com as deleções localizadas no domínio rod entre os éxons 50 e 51 com a região *hinge* 3 removida ou alterada e entre os éxons 45 e 49 com a região *hinge* 3 preservada e sem perda da fase de leitura; sendo a região *hinge* 3 uma sequência específica da proteína que une 2 segmentos da distrofina, permitindo movimentos flexíveis da mesma (KASPAR *et al.*, 2009). A implicação clínica de se identificar padrões genotípicos que determinam

fenótipos cardíacos específicos reside na predição do risco de desenvolvimento da cardiomiopatia nesses pacientes (ASHWATH *et al.*, 2014).

A biópsia muscular fica reservada para os pacientes nos quais não foram encontradas alterações à análise do DNA ou quando esta não está disponível (FREUND *et al.*, 2007). A biópsia muscular é efetuada por vezes em casos esporádicos de fenótipo pouco claro, mesmo que tenha sido identificada uma deleção, porque a imunocitoquímica para distrofina e o *immunoblotting Western* para a análise quantitativa da distrofina podem confirmar e refinar o diagnóstico nesses casos duvidosos (WERNECK *et al.*, 1992). Na DMD, a coloração para distrofina está ausente tanto à imunocitoquímica quanto ao *immunoblotting Western*. Na DMB, a imunocitoquímica mostra alteração na imunomarcação da membrana da fibra muscular, com um padrão de falhas de coloração na membrana de superfície, e o *immunoblotting Western* mostra níveis reduzidos de distrofina ou um tamanho anormal da proteína (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010; BUSHBY *et al.*, 2010a).

#### 1.1.5 Diagnóstico da cardiomiopatia nas distrofias musculares de Duchenne e Becker

A avaliação cardiológica geralmente inclui história e exame físico, eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma transtorácico (ETT) no momento do diagnóstico. Monitoração periódica com Holter pode ser considerada em pacientes que apresentam disfunção cardíaca e naqueles com sinais ou sintomas de anormalidades no ritmo cardíaco. Atualmente, a ressonância nuclear magnética cardíaca (RNMc) é considerada o método padrão-ouro para a avaliação cardíaca desses pacientes (BUSHBY *et al.*, 2010b). Por meio da análise da distribuição do realce tardio pelo gadolínio, a RNMc permite identificar áreas de fibrose miocárdica, o que agrega informação prognóstica, principalmente quanto ao desenvolvimento de arritmias ventriculares e quanto à progressão do remodelamento cardíaco, além de ser um potencial alvo terapêutico nessa população (BUSHBY *et al.*, 2010b; FAYSSOIL *et al.*, 2017).

As recomendações para investigação e *follow-up* desses pacientes são baseadas em consensos de especialistas, devido à limitada quantidade de evidência disponível (HERMANS *et al.*, 2010). Bushby e colaboradores recomendam a realização de ETT no momento do diagnóstico ou aos 6 anos de idade, no mínimo a cada 2 anos até os 10 anos de idade e anualmente após os 10 anos de idade ou ao aparecimento de sinais e sintomas cardíacos (BUSHBY *et al.*, 2010b; D'AMARIO *et al.*, 2017).

#### 1.1.5.1 Eletrocardiografia

Os pacientes com DMD geralmente apresentam alterações eletrocardiográficas. O padrão eletrocardiográfico característico demonstra ondas R amplas e aumento da relação R/S em V1 e ondas Q profundas e estreitas nas derivações precordiais esquerdas. Outros achados comuns incluem taquicardia sinusal, intervalo PR curto e hipertrofia ventricular direita (D'AMARIO *et al.*, 2017), além de intervalo QT prolongado e ondas Q proeminentes nas derivações I, aVL, V5 e V6 ou nas derivações II, III, aVF, V5 e V6 (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013; THRUSH *et al.*, 2009). De acordo com Thrush e colaboradores, que estudaram 115 pacientes com DMD e média de idade de 12,4 anos, o padrão eletrocardiográfico característico é encontrado na minoria dos pacientes, sendo os achados mais comuns o intervalo PR curto e a hipertrofia ventricular direita (THRUSH *et al.*, 2009). Os mesmos autores relataram não haver diferenças no padrão eletrocardiográfico de pacientes com DMD com ou sem cardiomiopatia associada (THRUSH *et al.*, 2009). Fine *et al.* estudaram alterações eletrocardiográficas em cães com deficiência de distrofina e demonstraram uma redução no intervalo PR após seis a doze meses, além de aumento da relação Q/R nas derivações II, III e aVF (FINE *et al.*, 2011). Por outro lado, James *et al.* demonstraram que, em pacientes com menos de 6 anos de idade, as alterações eletrocardiográficas mais frequentes são aquelas referentes à doença do ventrículo esquerdo, sendo que uma pequena porcentagem de pacientes apresentava intervalo PR curto. Esses mesmos autores também relataram não haver correlação estatisticamente significativa entre as alterações eletrocardiográficas e o sítio de mutação do gene *DMD* (JAMES *et al.*, 2011). Em um estudo de 34 eletrocardiogramas de

pacientes com DMD e idade de 5 a 15 anos, 28 (82,3%) eletrocardiogramas apresentaram anormalidades, sendo as mais frequentemente observadas: taquicardia sinusal (50,0%), onda R maior do que onda S em V1 (58,5%) e ondas Q anormais (GALVÃO *et al.*, 1984). Nos pacientes com DMB, as alterações eletrocardiográficas ocorrem em até 75% dos casos, sendo semelhantes às encontradas na DMD (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013; FINSTERER *et al.*, 2008; HERMANS *et al.*, 2010). Podem estar presentes também, tanto na DMD quanto na DMB, os bloqueios completo ou incompleto dos ramos esquerdo e direito do feixe de His (HERMANS *et al.*, 2010).

#### 1.1.5.2 Ecocardiografia

As alterações ecocardiográficas mais comumente encontradas incluem disfunção diastólica, anormalidades da contratilidade regional, especialmente nas paredes ínfero-lateral basal e anterolateral, disfunção sistólica global e regurgitação mitral, que pode resultar de disfunção do músculo papilar. A disfunção diastólica e o movimento paradoxal regional da parede podem anteceder a disfunção sistólica global (GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013). No entanto, um estudo aponta para uma predominância da disfunção sistólica em relação à disfunção diastólica do ventrículo esquerdo (VE) nos pacientes com DMD (TAKENAKA *et al.*, 1993). Sasaki e colaboradores demonstraram que nos pacientes com DMD, há aumento progressivo das dimensões diastólica e sistólica do VE, redução do encurtamento percentual e alterações da contratilidade segmentar do VE, especialmente da parede ínfero-lateral, que tende a ocorrer mais precocemente (SASAKI *et al.*, 1998). De acordo com Fine *et al.*, há redução significativa do tamanho do átrio esquerdo (AE) em cães com deficiência de distrofina (FINE *et al.*, 2011). A disfunção sistólica do VE é um preditor de mortalidade tardia na DMD de acordo com Corrado e colaboradores (CORRADO *et al.*, 2002). O encurtamento percentual e a fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo (FEVE) são os parâmetros mais comumente analisados para avaliar a função sistólica do VE. Outras modalidades de avaliação ecocardiográfica, como o *strain*, o *strain rate*, o *backscatter* integrado e a avaliação da velocidade do tecido miocárdico são capazes de detectar evidências da cardiomiopatia antes da redução do encurtamento percentual ou

da FEVE (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012; ASHWATH *et al.*, 2014; DE BACKER *et al.*, 2005; GIATRAKOS *et al.*, 2006).

O *strain* miocárdico é uma medida adimensional das alterações na forma, ou deformação. A deformação é definida como a alteração normalizada do comprimento entre dois pontos, sendo que deformação negativa implica encurtamento e deformação positiva alongamento de um segmento miocárdico. O *speckle tracking*, ou rastreamento de pontos, possibilita o estudo do *strain* miocárdico por meio da escala de cinza da ecocardiografia bidimensional, que gera diminutos pontos que estão agrupados em áreas de interesse, exibindo um padrão específico, como uma “impressão digital”, podendo ser rastreados por softwares específicos ao longo do ciclo cardíaco. A deformação pode ser avaliada nos planos longitudinal, circunferencial e radial, não existindo dependência do ângulo de incidência do ultrassom. Embora dependente da pré-carga, o *strain* miocárdico é um indicador mais sensível e mais precoce de função miocárdica anormal do que a avaliação do espessamento parietal e, portanto, é capaz de identificar disfunção sistólica do VE mesmo na presença de uma FE normal (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012; ABDUCH *et al.*, 2014; COLLIER *et al.*, 2017; LANG *et al.*, 2015; SMISETH *et al.*, 2016). O *strain* miocárdico avaliado pelo *speckle tracking* mostrou boa correlação com outras técnicas ecocardiográficas já sedimentadas, como o Doppler tecidual e o índice de contratilidade do miocárdio (ABDUCH *et al.*, 2014), e tem sido usado para a detecção precoce de disfunção sistólica do VE em diversas cardiopatias (BARBOSA *et al.*, 2014; BERTINI *et al.*, 2012; JO *et al.*, 2016; JOYCE *et al.*, 2015; KAMPERIDIS *et al.*, 2016; KRAMANN *et al.*, 2014; MIYAZAKI *et al.*, 2011; MARCUS *et al.*, 2011; REANT *et al.*, 2016; TAQATQA *et al.*, 2016; THAVENDIRANATHAN *et al.*, 2014). Uma limitação significativa da análise do *strain* miocárdico é a heterogeneidade dos valores normais no miocárdio, principalmente devido ao software utilizado (os valores não são intercambiáveis entre os diferentes fabricantes) e à variabilidade paciente a paciente, especialmente em relação à idade e ao gênero (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012; ABDUCH *et al.*, 2014; LANG *et al.*, 2015).

A medida do *strain* miocárdico mais comumente utilizada para avaliar a função sistólica global do VE é o *strain* longitudinal global (SLG). O SLG é obtido calculando-se a média do *strain* longitudinal nas três incidências apicais clássicas: apical quatro câmaras, apical duas câmaras e apical longitudinal. É necessária uma boa qualidade da imagem e uma adequada taxa de quadros (*frame rate*) para reduzir a variabilidade da medida. Já foi demonstrado que o SLG é uma medida reprodutível e com valor preditivo incremental para avaliação da função sistólica global do VE, além do valor prognóstico, em uma grande variedade de cardiopatias. Os valores normais do SLG dependem do software utilizado e do fabricante, sendo que a Sociedade Americana de Ecocardiografia não recomenda, baseado nas evidências científicas mais recentes, a utilização de um valor normal ou limite inferior da normalidade, apenas comenta que uma pessoa saudável apresenta um SLG ao redor de -20%, que mulheres apresentam valores absolutos pouco maiores do que os homens e que esse valor diminui com a idade (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012; LANG *et al.*, 2015).

Vários estudos têm demonstrado a superioridade da ecocardiografia tridimensional, quando comparada à ecocardiografia bidimensional, na determinação dos volumes do VE, com melhores acurácia e reprodutibilidade interobservador e intraobservador e melhor visualização do ápice cardíaco, especialmente quando se obtém imagens de boa qualidade, e principalmente pelo fato de que as medidas de volume obtidas pela ecocardiografia tridimensional não se baseiam em suposições quanto à geometria ventricular esquerda (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012; IINO *et al.*, 2006; LANG *et al.*, 2015; RUDDOX *et al.*, 2013; SQUERI *et al.*, 2017; TSUBURAYA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017). Assim como na determinação dos volumes do VE, o cálculo da FEVE pela ecocardiografia tridimensional também apresenta boas acurácia e reprodutibilidade, devendo ser utilizada quando disponível (LANG *et al.*, 2015).

### 1.1.6 Tratamento das distrofias musculares de Duchenne e Becker

A abordagem multidisciplinar visa implementar medidas preventivas e intervenções ativas direcionadas a todos os aspectos da doença, com o objetivo de manter a função e a independência, evitar as complicações, aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. A equipe multidisciplinar deve ser composta, idealmente, por cardiologistas, enfermeiros, fisioterapeutas, neurologistas, neuropediatras, nutricionistas, ortopedistas, pneumologistas, psicólogos e terapeutas ocupacionais (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010; BUSHBY *et al.*, 2010a, 2010b).

O tratamento inclui as medidas de suporte e a terapia medicamentosa. Os corticosteroides são as drogas mais extensamente estudadas. Os primeiros ensaios clínicos avaliando a corticoterapia em pacientes com DMD demonstraram melhora na função e na força muscular em curto prazo. Os trabalhos subsequentes mostraram que, além da melhora na força muscular, a corticoterapia era capaz de prolongar a ambulação desses pacientes (BUSHBY *et al.*, 2010a). Porém, a corticoterapia muitas vezes é limitada pelos seus efeitos colaterais. Quando não há proibição pelos efeitos colaterais, o corticoide geralmente é indicado, em caráter ambulatorial, nos pacientes acima de 5 anos de idade (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010). No entanto, o início da corticoterapia deve ser individualizado, pois depende da idade, do risco de desenvolvimento de efeitos adversos e da evolução da função muscular do paciente. Idealmente, para o início do tratamento, a criança já deve ter atingido os marcos de desenvolvimento da função motora e estar em uma fase de platô ou na fase de declínio progressivo da função muscular (BUSHBY *et al.*, 2010a). A droga mais estudada é a prednisona, sendo a dose de 0,75 mg/kg de peso a que demonstrou maior benefício e melhor perfil de efeitos adversos (GRIGGS *et al.*, 1991; MANZUR *et al.*, 2008). Outras opções são a prednisolona, com dose equivalente, e o deflazacort, com dose de 0,9 mg/kg de peso (MESA *et al.*, 1991). A dose mínima efetiva, que apresenta algum benefício, é de prednisona 0,3 mg/kg de peso por dia (GRIGGS *et al.*, 1991). A dose máxima utilizada é de prednisona



30 a 40 mg por dia ou de deflazacort 36 a 39 mg por dia. Todas essas drogas são semelhantes em relação à redução do declínio na função motora, respiratória e cardíaca, porém, o deflazacort apresenta menor risco de efeitos adversos, especialmente ganho de peso (BUSHBY *et al.*, 2010a; MESA *et al.*, 1991). Até o atual momento, a administração diária mostrou-se mais efetiva do que a administração em regimes alternativos (BUSHBY *et al.*, 2010a). Atualmente, considera-se o uso do corticoide mesmo após a perda da deambulação, pois existem estudos que demonstraram benefícios na prevenção e na redução da perda de força muscular nos membros superiores, da cifoescoliose, da insuficiência respiratória e do comprometimento cardíaco, porém, deve-se estar atento aos efeitos adversos, como distúrbios do comportamento, risco de fraturas e obesidade (BIGGAR *et al.*, 2006; BUSHBY *et al.*, 2010a; KOEKS *et al.*, 2017; MARKHAM *et al.*, 2008; MATTHEWS *et al.*, 2016; SCHRAM *et al.*, 2013). A terapia com glicocorticoides não deve ser abandonada, mesmo na presença de efeitos adversos de difícil manejo e não tolerados pelo paciente, até que pelo menos uma redução na dose e um regime alternativo de administração tenham sido tentados. O benefício da corticoterapia nos pacientes com função muscular dos membros superiores mais comprometida ou doença pulmonar avançada permanece incerto (BUSHBY *et al.*, 2010a).

O suporte respiratório, que inclui monitoração regular da função pulmonar, fisioterapia torácica, insufladores e exsufladores mecânicos e ventilação não invasiva contínua, melhorou a sobrevida desses pacientes (KAUFMANN, P.; WEIMER, L.H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L.P., 2010; BUSHBY *et al.*, 2010b). A introdução da ventilação domiciliar noturna aumentou a média da idade da morte de 19 para pelo menos 25 anos (HERMANS *et al.*, 2010). Imunização com vacina antipneumocócica e contra o vírus *Influenza* estão indicadas nesses pacientes (BUSHBY *et al.*, 2010b).

Os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e os betabloqueadores podem retardar a progressão da cardiomiopatia (VIOLLET *et al.*, 2012) e melhorar a função ventricular esquerda e a sobrevida em longo prazo nos pacientes com DMD e disfunção sistólica do ventrículo esquerdo,



especialmente naqueles assintomáticos (JEFFERIES *et al.*, 2005; OGATA *et al.*, 2009). Duboc e colaboradores demonstraram que o uso do perindopril, um IECA, é capaz de retardar o início e reduzir a velocidade de progressão da disfunção ventricular esquerda nos pacientes com DMD e função ventricular esquerda preservada (DUBOC *et al.*, 2005); assim como Raman e colaboradores demonstraram, em um estudo randomizado, duplo-cego e placebo-controlado, que a eplerenona, um antagonista da aldosterona, atenuou o declínio da função sistólica ventricular esquerda em pacientes com DMD, fração de ejeção preservada e uso concomitante de IECA ou bloqueador do receptor da angiotensina-II (BRA-II) (RAMAN *et al.*, 2015). De acordo com Bushby e colaboradores, reavaliações a cada 6 meses e início imediato de terapia farmacológica estão indicados na presença de anormalidades na função ventricular, independente da idade do paciente. Os IECA são considerados as drogas de primeira linha; o uso de betabloqueadores e diuréticos é também apropriado, devendo-se seguir as diretrizes para manejo de insuficiência cardíaca (BUSHBY *et al.*, 2010b). Pacientes em uso de glicocorticoides devem ser monitorados quanto ao possível desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica (BUSHBY *et al.*, 2010b). Existem relatos de transplante cardíaco em pacientes com DMB (ROPPER, A.H.; SAMUELS, M.A., 2009; GROH, W.J.; ZIPES, D.P., 2013).

Outros aspectos que devem ser abordados no tratamento da DMD incluem a fisioterapia motora, com manejo da extensibilidade muscular e das contraturas articulares; o tratamento da doença óssea, em especial a escoliose e o manejo de fraturas; avaliação da nutrição, da deglutição e de distúrbios gastrointestinais, principalmente constipação e refluxo gastroesofágico; avaliação do discurso e da linguagem; e manejo da dor (BUSHBY *et al.*, 2010b).

As perspectivas de tratamento efetivo incluem modificação da mutação: salto de éxons com oligonucleotídeos *antisense* e transleitura dos códons de parada prematuros decorrentes de mutações *nonsense* (ARAUJO *et al.*, 2017).

A consolidação das terapias atualmente utilizadas e o desenvolvimento de novos tratamentos, principalmente aqueles direcionados para a mutação genética, permitirão um aumento ainda maior da sobrevida desses pacientes. Nesse contexto, a cardiomiopatia ganhará importância como uma das principais causas de morbimortalidade nessa população. A detecção precoce da cardiomiopatia, utilizando técnicas emergentes como a avaliação do *strain* miocárdico ecocardiográfico, possibilitará o início de terapias específicas para insuficiência cardíaca em uma fase inicial da doença com o objetivo de, possivelmente, retardar o desenvolvimento, impedir a progressão e reduzir as complicações da doença cardíaca nos pacientes com distrofinopatias. A importância deste trabalho reside no fato de que novas técnicas ecocardiográficas serão aplicadas nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne e Becker, com o intuito de refinar a avaliação cardíaca e detectar alterações precoces da função miocárdica e seus preditores, abrindo caminho para o desenvolvimento de melhores estratégias de rastreamento, diagnóstico e tratamento nessa população.



## 2 OBJETIVOS

1. Avaliar as alterações ecocardiográficas, incluindo a ecocardiografia tridimensional e o *strain* miocárdico, nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne e Becker.
2. Correlacionar as alterações ecocardiográficas com aspectos clínicos, laboratoriais, genéticos e eletrocardiográficos nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne e Becker.
3. Comparar as medidas volumétricas do ventrículo esquerdo e do átrio esquerdo e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo obtidas pela ecocardiografia tridimensional com as obtidas pelo método bidimensional nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne e Becker.



### 3 METODOLOGIA

Estudo transversal de pacientes com o diagnóstico de DMD ou DMB acompanhados no Serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) entre 01 de julho de 2014 e 30 de junho de 2016. Este estudo faz parte do projeto CAAE 47153115.4.0000.0096, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CHC-UFPR (ANEXO 1). Consentimento informado foi obtido de todos os pacientes e/ou responsáveis.

#### 3.1 MATERIAL:

No presente estudo foram incluídos, consecutivamente, pacientes com diagnóstico confirmado de DMD ou DMB, seja por meio da análise genética, realizada por MLPA ou sequenciamento do gene *DMD*, seja pela análise imunohistoquímica de material obtido na biopsia muscular (BUSHBY *et al.*, 2010a; OKUBO *et al.*, 2016; WERNECK *et al.*, 1992; WERNECK *et al.*, 2001), que estivessem em seguimento ambulatorial no Serviço de Doenças Neuromusculares do CHC-UFPR, no período de 01 de julho de 2014 a 30 de junho de 2016. A diferenciação entre DMD e DMB foi feita por meio da combinação dos dados da evolução da doença, da análise genética e, em alguns casos, da análise imunohistoquímica. Quando houve discordância nessa avaliação, utilizou-se a idade de início dos sintomas como parâmetro para a diferenciação entre DMD e DMB, sendo que início dos sintomas até os 5 anos de idade definiu diagnóstico de DMD e após os 5 anos de idade definiu diagnóstico de DMB (BUSHBY *et al.*, 2010a).

#### 3.2 MÉTODOS:

Os dados referentes ao diagnóstico da doença e à avaliação cardíaca prévia foram coletados por meio de revisão de prontuário. Pacientes e familiares foram entrevistados em consulta médica pré-agendada e foi realizado ecocardiograma transtorácico (ETT), ambos pelo médico pesquisador

Raphael Henrique Déa Cirino. Para o registro dos dados elaborou-se uma ficha clínica, específica para o estudo, com as informações divididas em dois grupos: dados primários, incluindo os dados obtidos no ETT; e dados secundários, incluindo avaliação clínica e exames prévios (APÊNDICE 1; APÊNDICE 2).

### 3.2.1 Evolução da doença, doenças associadas e história familiar

Os dados clínicos investigados foram idade do paciente; idade de início da deambulação – atraso na aquisição da marcha; idade de início dos sintomas; idade do diagnóstico; tempo de duração da doença; idade da perda da deambulação; déficit cognitivo; comorbidades; história familiar para DMD ou DMB; peso, altura e área de superfície corporal (ASC) do paciente; e distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos.

Foi considerado atraso na aquisição da marcha o início da deambulação após um ano e quatro meses de idade (BUSHBY *et al.*, 2010a). Dificuldade de linguagem, de aprendizado ou de socialização, relatados pelos responsáveis, foram considerados como déficit cognitivo (BUSHBY *et al.*, 2010b). Para o cálculo da ASC do paciente foi utilizada a fórmula:  $ASC = \text{peso} / \text{altura}^2$ .

A avaliação da distância percorrida no TC6 foi realizada em um corredor de 12,5 metros de comprimento, sendo que o paciente deveria percorrer a maior distância possível no período de seis minutos, sendo esta, em metros, o dado obtido para análise (HENRICSON *et al.*, 2012; MCDONALD *et al.*, 2013).

### 3.2.2 Exames laboratoriais

Os resultados de exames laboratoriais obtidos por meio de revisão de prontuário foram CK (primeira CK sérica registrada no prontuário), transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), aldolase e isoenzima MB da creatinoquinase (CK-MB) atividade.

### 3.2.3 Estudo genético

Os dados utilizados foram aqueles obtidos do MLPA ou do sequenciamento do gene *DMD*, sendo as mutações caracterizadas quanto ao tipo, quanto à localização e quanto ao seu efeito na “fase de leitura”. Quanto ao tipo de mutação, foram divididas em deleções, duplicações ou pequenas mutações (mutação de ponto, pequena deleção ou inserção, mutação *nonsense*, mutação no *splice site*, mutação intrônica). Quanto à localização da mutação, os 79 éxons foram avaliados da seguinte maneira: (1) individualmente, independente do tipo de mutação; (2) individualmente, restrito à mutação do tipo deleção; (3) deleção de pelo menos um éxon dentro da região de “*hot spot*” mais ausência de deleção fora da região de “*hot spot*” versus deleção de pelo menos um éxon fora da região de “*hot spot*”, excluindo outros tipos de mutação; (4) deleção de mais de um éxon dentro da região de “*hot spot*” mais ausência de deleção fora da região de “*hot spot*” versus deleção de mais de um éxon fora da região de “*hot spot*”, excluindo outros tipos de mutação; e (5) deleção de apenas um éxon versus deleção de mais de um éxon, independente da localização. A região de “*hot spot*” compreende a região entre os éxons 45 e 55 (AARTSMA-RUS *et al.*, 2016). Quanto ao seu efeito na “fase de leitura”, foram divididas em mutações “fora de fase” e mutações “em fase” (FIGURA 3).

### 3.2.4 Análise imunohistoquímica de material obtido na biopsia muscular

A distrofina foi avaliada quanto ao grau de comprometimento nos seus três principais domínios: o terminal carboxila, o domínio rod e o terminal amino, sendo utilizada a seguinte classificação: zero – ausência de expressão da distrofina ou alguns pontos em raros segmentos; 1 – raras fibras positivas; 2 – redução difusa na maioria das fibras, falhas focais grandes e médias ou padrão mosaico ou falhas focais pequenas e múltiplas ou padrão rosário; 3 – falhas focais pequenas e raras; 4 – expressão normal da distrofina (FREUND *et al.*, 2007; WERNECK *et al.*, 1992). Os pacientes foram divididos em dois grupos: classificação zero ou classificação diferente de zero (classificações 1, 2, 3 ou 4).



### 3.2.5 Tratamento

Os dados clínicos investigados na entrevista com o paciente e com os responsáveis foram medicações de uso prévio incluindo corticosteroides, IECA, BRA-II, betabloqueadores e outras medicações; fisioterapia motora e respiratória.

### 3.2.6 Avaliação clínica

Os sintomas investigados na entrevista com o paciente e com os responsáveis foram dispneia, ortopneia, dispneia paroxística noturna, palpitação, dor torácica, fadiga, edema de membros inferiores, tontura, lipotímia e cefaleia matutina.

Por meio de exame físico foram avaliados pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), saturação arterial de oxigênio (SaO<sub>2</sub>), cianose, ingurgitamento jugular, hepatomegalia, edema de membros inferiores, sibilos ou estertores crepitantes à ausculta pulmonar, escoliose, cifose, lordose, *ictus cordis*, frêmitos cardíacos, bulhas cardíacas, sopros cardíacos, ritmo cardíaco, pulso arterial radial e distância percorrida em um período de seis minutos.

Foi considerada pressão arterial anormal aquela classificada como limítrofe ou como hipertensão arterial: PAS > 135 mmHg e/ou PAD > 85 mmHg para indivíduos acima de 16 anos de idade ou PAS e/ou PAD > percentil 90, de acordo com a idade e com o percentil de estatura (Sociedade Brasileira de Cardiologia, VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010; Sociedade Brasileira de Cardiologia, V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2007).

O *ictus cordis* foi caracterizado quanto à sua localização, tamanho e amplitude. *Ictus cordis* anormal foi considerado quando: localização fora do 4º e do 5º espaços intercostais esquerdos ou desvio de dois centímetros ou mais

medial ou lateral à linha hemiclavicular esquerda; diâmetro maior do que 2,5 centímetros; ou amplitude reduzida ou aumentada (BICKLEY, L.S.; SZILAGYI, P.G., 2005). As bulhas cardíacas foram caracterizadas quanto à sua intensidade em normofonéticas, hiperfonéticas ou hipofonéticas. O ritmo cardíaco foi dicotomizado em regular ou irregular. O pulso arterial radial foi caracterizado quanto à sua amplitude em normal, reduzido ou aumentado.

### 3.2.7 Avaliação eletrocardiográfica

Os dados eletrocardiográficos investigados foram:

#### 1) Alterações do ritmo:

- a. Ritmo sinusal: ondas P positivas nas derivações DI, DII e aVF e eixo da onda P entre  $-30^\circ$  e  $+90^\circ$  (PASTORE *et al.*, 2009).
- b. Arritmia sinusal: variação do ritmo sinusal, fásica ou não fásica (PASTORE *et al.*, 2009).
- c. Taquicardia sinusal: FC acima de 100 batimentos por minuto (bpm) para indivíduos acima de 16 anos de idade ou acima do limite superior da normalidade para a idade (MOLINA, M.S. *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2009) (ANEXO 1).
- d. Bradicardia sinusal: FC abaixo de 50 bpm para indivíduos acima de 16 anos de idade ou abaixo do limite inferior da normalidade para a idade (MOLINA, M.S. *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2009) (ANEXO 1).
- e. Extrassístole ventricular: complexo QRS precoce, de morfologia bizarra, com duração superior a 120 ms, onda T gigante e oposta à maior deflexão do complexo QRS e não precedido de onda P prematura (GRUPI, C.J. *et al.*, 2008).
- f. Ritmo de marca-passo: presença de espícula (PASTORE *et al.*, 2009).

#### 2) Bloqueios atrioventriculares (BAV):

- a. BAV de primeiro grau: intervalo PR  $> 0,20$  segundos para indivíduos acima de 16 anos de idade ou acima do limite superior da normalidade para a idade (FERREIRA, B.A.; 2008; PASTORE *et al.*, 2009) (ANEXO 1).

- b. BAV de segundo grau: presença de algumas ondas P bloqueadas (FERREIRA, B.A.; 2008).
  - c. BAV de terceiro grau: dissociação completa entre os átrios e os ventrículos (FERREIRA, B.A.; 2008).
- 3) PR curto: intervalo PR < 0,12 segundos para indivíduos acima de 16 anos de idade ou abaixo do limite inferior da normalidade para a idade (MOLINA, M.S. *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2009) (ANEXO 1).
- 4) Desvios do eixo elétrico do complexo QRS:
- a. Desvio para a direita: > +90° (QUADROS, C.M. *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2009).
  - b. Desvio para a esquerda: < -30° (QUADROS, C.M. *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2009).
- 5) Bloqueios de ramo:
- a. Bloqueio do ramo direito do feixe de His (BRD): complexo QRS ≥ 0,12 segundos; ondas S empastadas em DI, aVL, V5 e V6; rSR' ou rsR' em V1 com R' espessado (PASTORE *et al.*, 2009).
  - b. Bloqueio do ramo esquerdo do feixe de His (BRE): complexo QRS ≥ 0,12 segundos; ondas R alargadas e com entalhes e/ou empastamentos médio-terminais em DI, aVL, V5 e V6; ondas S alargadas com espessamentos e/ou entalhes em V1 e V2 (PASTORE *et al.*, 2009).
  - c. Bloqueio divisional anterossuperior do ramo esquerdo do feixe de His (BDAS): eixo elétrico do complexo QRS ≤ -45°; rS em DII, DIII e aVF com onda S em DIII maior do que onda S em DII e voltagem acima de 10 mm (PASTORE *et al.*, 2009).
- 6) Sobrecargas atriais:
- a. Sobrecarga atrial esquerda (SAE): duração da onda P ≥ 0,12 segundos, associada ao aparecimento de entalhe (onda P *mitrale*) na derivação DII e com componente negativo aumentado na derivação V1 (QUADROS, C.M. *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2009).

- b. Sobrecarga atrial direita (SAD): onda P com amplitude  $> 2,5$  mm nas derivações do plano frontal (QUADROS, C.M. *et al.*, 2008).
- 7) Sobrecargas ventriculares:
- a. Sobrecarga ventricular esquerda (SVE): onda S de V1 + onda R de V5 ou V6  $\geq 35$  mm (critério de Sokolow-Lyon) ou onda R de aVL + onda S de V3  $\geq 28$  mm (QUADROS, C.M. *et al.*, 2008).
  - b. Sobrecarga ventricular direita (SVD): eixo do complexo QRS  $> +110^\circ$ ; onda R de alta voltagem em V1 e V2 e onda S profunda em V5 e V6; morfologia qR ou qRs em V1 ou em V1 e V2 (QUADROS, C.M. *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2009).
- 8) Alteração da repolarização ventricular (ARV): modificações significativas na polaridade, na duração ou na morfologia do ponto J do segmento ST ou da onda T (PASTORE *et al.*, 2009).
- 9) Onda R maior do que onda S em V1.
- 10) Outros:
- a. Perturbação da condução do ramo direito do feixe de His (PCRD): padrão rSR' ou rsR' em V1 e duração do QRS  $< 0,12$  segundos (PASTORE *et al.*, 2009).
  - b. Área eletricamente inativa: presença de ondas Q patológicas com duração  $> 0,04$  segundos, associadas ou não à amplitude maior do que três milímetros ou redução da onda R em área onde a mesma deveria estar presente (PASTORE *et al.*, 2009).

### 3.2.8 Avaliação ecocardiográfica

Os exames de ecocardiografia foram realizados com a sonda Matrix do aparelho IE33 da Philips. Foi utilizado o software QLAB para a análise do *strain* miocárdico e para a análise tridimensional do VE.

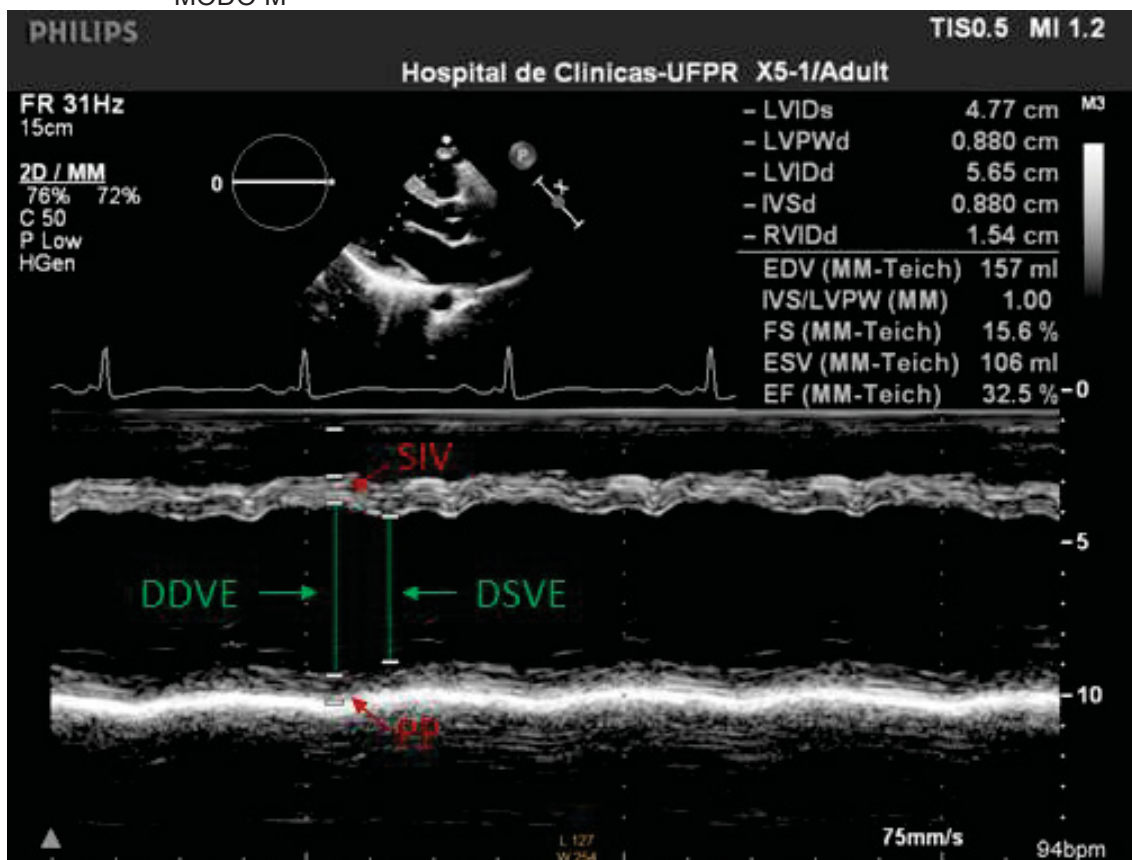
Os parâmetros ecocardiográficos analisados foram:

- 1) Espessura parietal do ventrículo esquerdo:

- a. Espessura do septo interventricular (SIV): para a medida da espessura do septo interventricular foi utilizado o modo M ao nível da ponta das cúspides da valva mitral, na incidência paraesternal longitudinal esquerda, sendo os calibradores eletrônicos posicionados nas interfaces entre o SIV e a cavidade ventricular direita e entre o SIV e a cavidade ventricular esquerda, ao final da diástole (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 4).
  - b. Espessura da parede posterior (PP): para a medida da parede posterior do VE foi utilizado o modo M ao nível da ponta das cúspides da valva mitral, na incidência paraesternal longitudinal esquerda, sendo os calibradores eletrônicos posicionados nas interfaces entre a PP e a cavidade ventricular esquerda e entre a PP e o pericárdio, ao final da diástole (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 4).
- 2) Massa do VE: para o cálculo da massa do VE foi utilizada a fórmula de Devereux {massa do ventrículo esquerdo =  $1,04 \times 0,8 \times [(SIV + DDVE + PP)^3 - DDVE^3] + 0,6$ } (LANG *et al.*, 2015). Massa do ventrículo esquerdo  $> 103 \text{ g/m}^2$ , indexada pela ASC, foi considerada hipertrofia ventricular esquerda (DANIELS *et al.*, 1988).
- 3) Dimensões do ventrículo esquerdo:
- a. Dimensões lineares (FIGURA 4):
    - i. Dimensão diastólica do ventrículo esquerdo (DDVE): para a medida da dimensão diastólica do VE foi utilizado o modo M ao nível da ponta das cúspides da valva mitral, na incidência paraesternal longitudinal esquerda, sendo os calibradores eletrônicos posicionados nas interfaces entre a parede miocárdica e a cavidade ventricular esquerda, ao final da diástole (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 4).
    - ii. Dimensão sistólica do ventrículo esquerdo: para a medida da dimensão sistólica do VE foi utilizado o

modo M ao nível da ponta das cúspides da valva mitral, na incidência paraesternal longitudinal esquerda, sendo os calibradores eletrônicos posicionados nas interfaces entre a parede miocárdica e a cavidade ventricular esquerda, ao final da sístole (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 4).

FIGURA 4 – MEDIDA DO SEPTO INTERVENTRICULAR, DA PAREDE POSTERIOR E DAS DIMENSÕES DIASTÓLICA E SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO PELO MODO M



FONTE: O autor (2018).

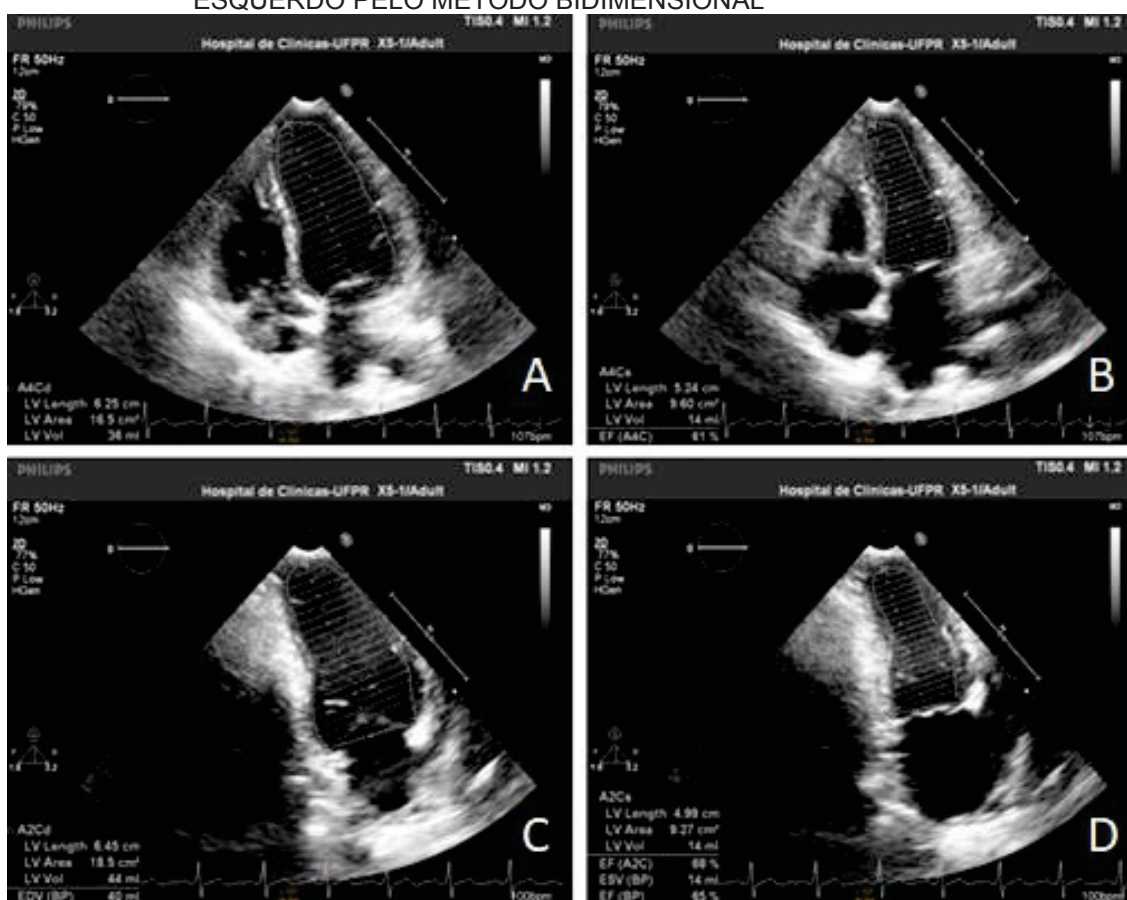
LEGENDA: SIV - septo interventricular e PP - parede posterior do VE (vermelho); DDVE - dimensão diastólica do VE e DSVE - dimensão sistólica do VE (verde).

#### b. Dimensões volumétricas:

- i. Ecocardiografia bidimensional – regra dos discos ou regra de Simpson: os volumes diastólico (VDVE) e sistólico (VSVE) do ventrículo esquerdo foram medidos utilizando a regra de Simpson, ou seja, foram traçados os contornos da cavidade ventricular esquerda, no final da diástole (VDVE) e no final da sístole (VSVE), nas

incidências apicais de quatro e duas câmaras, tomando-se o cuidado de não encurtar o ápice cardíaco e de incluir os músculos papilares no interior da cavidade ventricular esquerda, para que o software pudesse calcular os volumes do VE (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 5). VDVE > 74 ml/m<sup>2</sup> e VSVE > 31 ml/m<sup>2</sup>, indexados pela ASC, foram considerados volumes do VE aumentados (LANG *et al.*, 2015).

FIGURA 5 – MEDIDA DOS VOLUMES DIASTÓLICO E SISTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO PELO MÉTODO BIDIMENSIONAL



FONTE: O autor (2018).

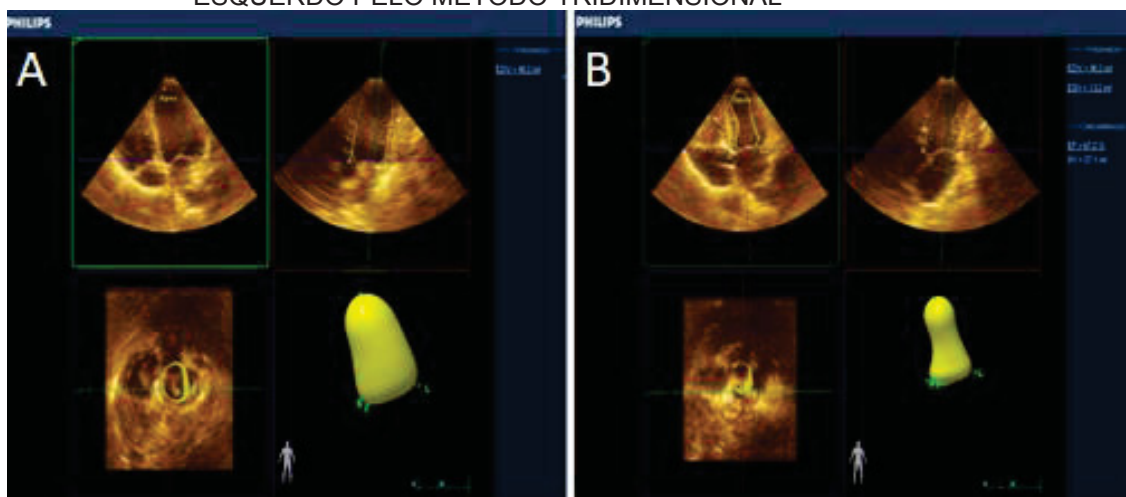
LEGENDA: (A) Medida do volume diastólico do VE na incidência apical de quatro câmaras; (B) Medida do volume sistólico do VE na incidência apical de quatro câmaras; (C) Medida do volume diastólico do VE na incidência apical de duas câmaras; (D) Medida do volume sistólico do VE na incidência apical de duas câmaras.

- ii. Ecocardiografia tridimensional: o VDVE e o VSVE foram medidos por meio de software específico para ecocardiografia tridimensional. A técnica utilizada



envolveu uma única captura de quatro ciclos cardíacos (aquisição da imagem), a identificação dos quadros representativos da maior dimensão diastólica (final da diástole) e da menor dimensão sistólica (final da sístole), ajuste da imagem para manter a base do ventrículo esquerdo ao nível da valva mitral e permitir a melhor visualização dos bordos endocárdicos e do ápice cardíaco e a marcação dos cinco pontos preconizados (paredes septal, lateral, anterior e inferior próximo ao anel mitral; e ápice), para que o software pudesse construir o modelo tridimensional do ventrículo esquerdo e calcular os volumes do VE (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 6). VDVE > 60,1 ml/m<sup>2</sup> e VSVE > 23,2 ml/m<sup>2</sup>, indexados pela ASC, foram considerados volumes do VE aumentados (BUCCHERI *et al.*, 2015).

FIGURA 6 – MEDIDA DOS VOLUMES DIASTÓLICO E SISTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO PELO MÉTODO TRIDIMENSIONAL



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: (A) Medida do volume diastólico do VE; (B) Medida do volume sistólico do VE.

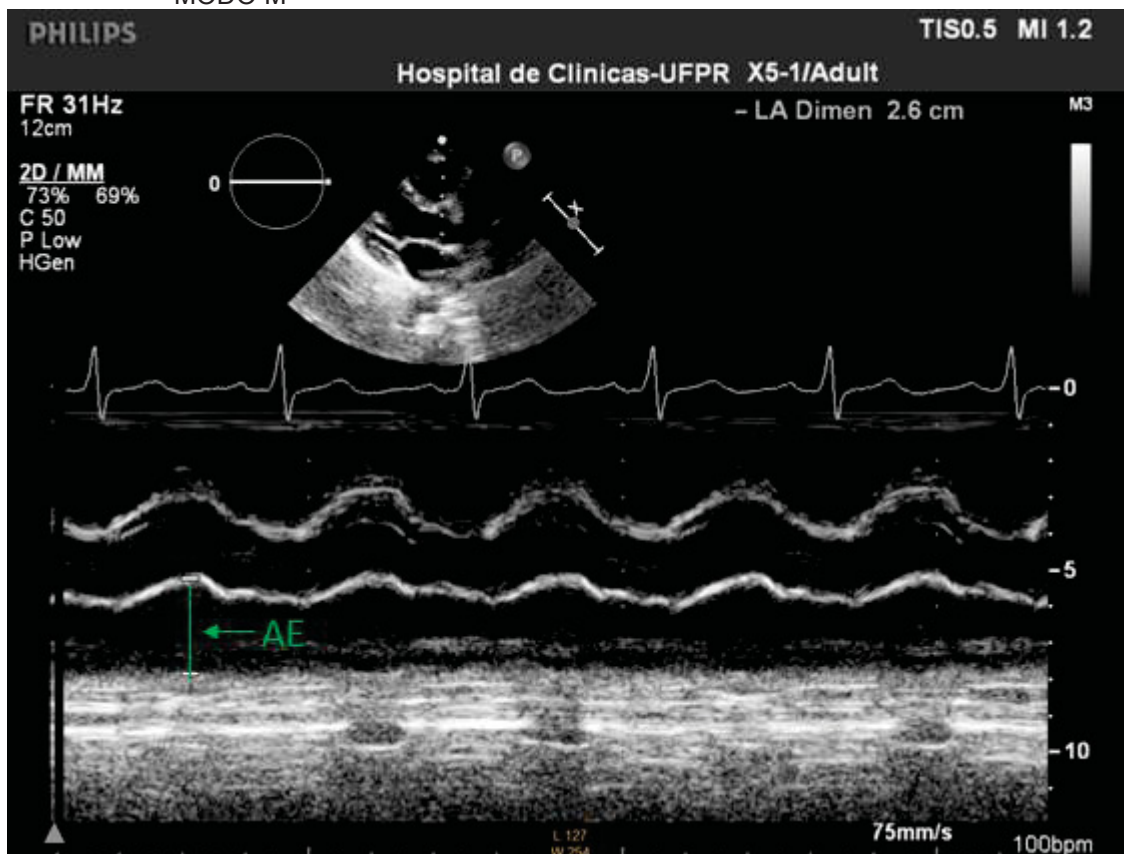
#### 4) Dimensões do AE:

- a. Dimensão linear: para a medida do diâmetro anteroposterior do AE foi utilizado o modo M perpendicularmente ao eixo longitudinal da raiz aórtica, na incidência paraesternal longitudinal esquerda, sendo os calibradores eletrônicos



posicionados na borda externa da interface entre a raiz aórtica e o AE e na borda interna da interface entre o AE e o pericárdio, no final da sístole (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 7).

FIGURA 7 – MEDIDA DO DIÂMETRO ANTEROPOSTERIOR DO ÁTRIO ESQUERDO PELO MODO M



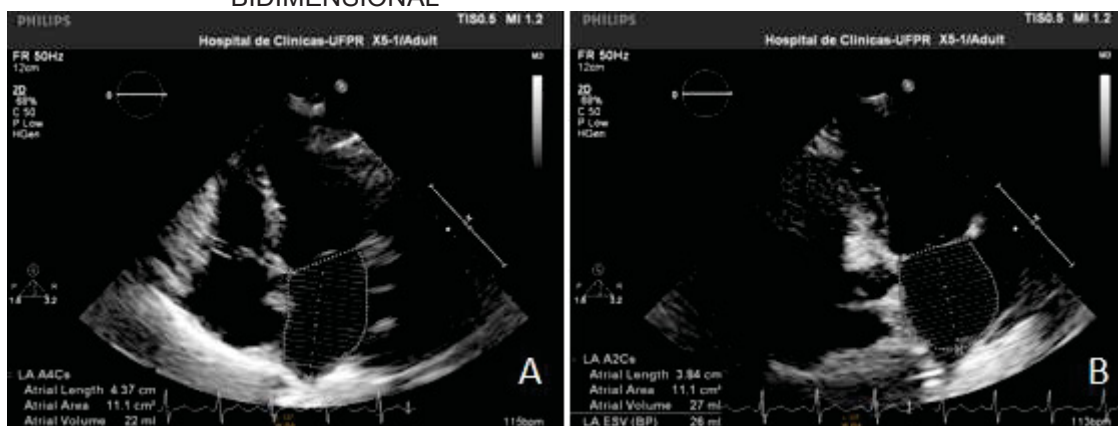
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Medida do diâmetro anteroposterior do AE (verde).

#### b. Dimensão volumétrica:

- i. Ecocardiografia bidimensional – regra dos discos: o volume do AE foi medido utilizando a regra dos discos, ou seja, foram traçados os contornos da cavidade atrial esquerda, no final da sístole, nas incidências apicais de quatro e duas câmaras, para que o software pudesse calcular o volume do AE (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 8). Volume do AE > 38,3 ml/m<sup>2</sup>, indexado pela ASC, foi considerado volume do AE aumentado (TANAKA *et al.*, 2015).

FIGURA 8 – MEDIDA DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO PELO MÉTODO BIDIMENSIONAL

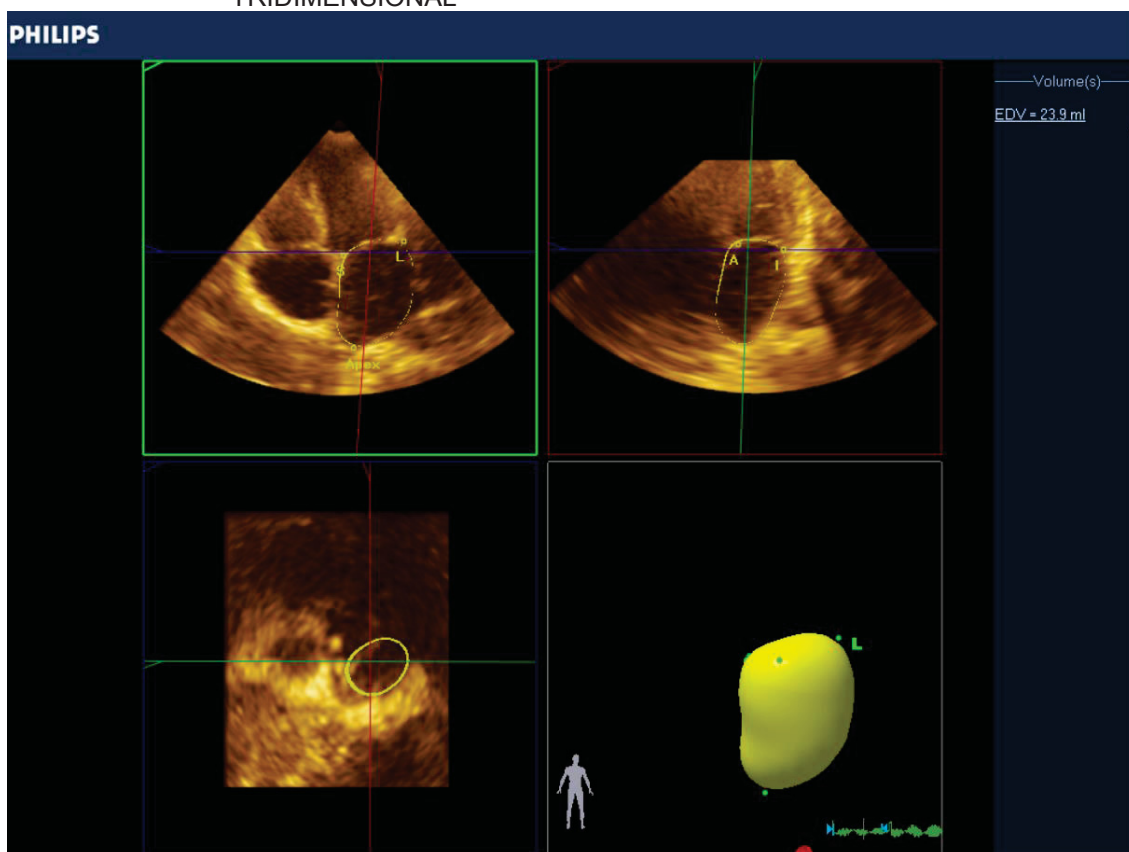


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: (A) Medida do volume do AE na incidência apical de quatro câmaras; (B) Medida do volume do AE na incidência apical de duas câmaras.

- ii. Ecocardiografia tridimensional: o volume do AE foi medido por meio de software específico para ecocardiografia tridimensional. A técnica utilizada envolveu uma única captura de quatro ciclos cardíacos (aquisição da imagem), a identificação do quadro representativo da maior dimensão sistólica (final da sístole), ajuste da imagem para manter a base do átrio esquerdo ao nível da valva mitral e permitir a melhor visualização dos bordos endocárdicos e do teto do AE e a marcação dos cinco pontos preconizados (paredes septal, lateral, anterior e inferior próximo ao anel mitral; e teto do AE), para que o software pudesse construir o modelo tridimensional do AE e calcular o volume atrial esquerdo (LANG *et al.*, 2015) (FIGURA 9). Volume do AE > 27,1 ml/m<sup>2</sup>, indexado pela ASC, foi considerado volume do AE aumentado (TANAKA *et al.*, 2015).

FIGURA 9 – MEDIDA DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO PELO MÉTODO TRIDIMENSIONAL



FONTE: O autor (2018).

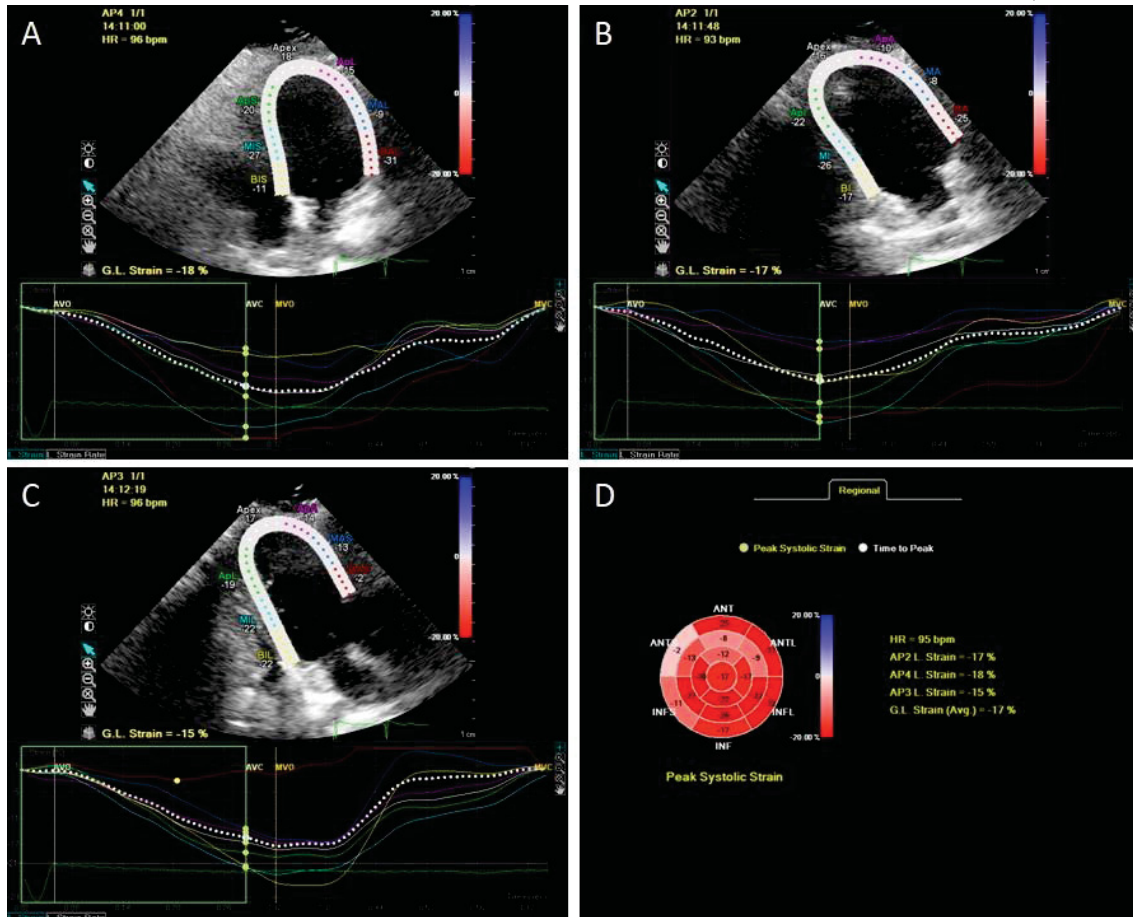
LEGENDA: Medida do volume do AE.

##### 5) Medidas da função sistólica do ventrículo esquerdo:

- a. Encurtamento percentual: para o cálculo do encurtamento percentual foi utilizada a fórmula:  $EP = (DDVE - \text{dimensão sistólica do VE}) / DDVE$  (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012).
- b. Fração de ejeção: para o cálculo da FEVE foi utilizada a fórmula:  $FE = (VDVE - VSVE) / VDVE$ . A FEVE foi calculada por meio de três técnicas distintas: (1) os volumes do VE foram estimados a partir das dimensões lineares diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo, obtidas a partir do modo M (FIGURA 4); (2) os volumes do VE foram medidos por meio da regra dos discos ou regra de Simpson (FIGURA 5); e (3) os volumes do VE foram medidos por meio da ecocardiografia tridimensional (FIGURA 6).  $FEVE < 52\%$  foi considerada disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (LANG *et al.*, 2015).

c. *Strain* miocárdico do VE: o *strain* miocárdico foi avaliado por meio da medida do SLG utilizando-se a técnica do rastreamento de pontos (*speckle tracking*) – foram medidos os tempos para a abertura e para o fechamento da valva aórtica e da valva mitral, a partir do pico da onda R, por meio do modo M; o *strain* longitudinal foi medido nas incidências apical de quatro câmaras, apical de duas câmaras e apical longitudinal e, então, o SLG foi representado pela média das três medidas (FIGURA 10); para a obtenção das imagens tomou-se o cuidado de visualizar adequadamente as paredes miocárdicas, incluindo endocárdio, miocárdio e epicárdio, de maximizar a taxa de quadros e de não encurtar o ápice cardíaco (LANG *et al.*, 2015). Valores absolutos do SLG menores do que 18% foram considerados anormais. Valores absolutos do SLG menores do que 18% nos pacientes com FEVE  $\geq$  52% foram considerados marcadores de disfunção sistólica precoce do VE. Valores absolutos do SLG maiores ou iguais a 18% nos pacientes com FEVE  $\geq$  52% foram considerados função sistólica do VE preservada (JASHARI *et al.*, 2015; LEVY *et al.*, 2016; LABOMBARDA *et al.*, 2014; PATRIANAKOS *et al.*, 2015).

FIGURA 10 – MEDIDA DO STRAIN LONGITUDINAL GLOBAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO



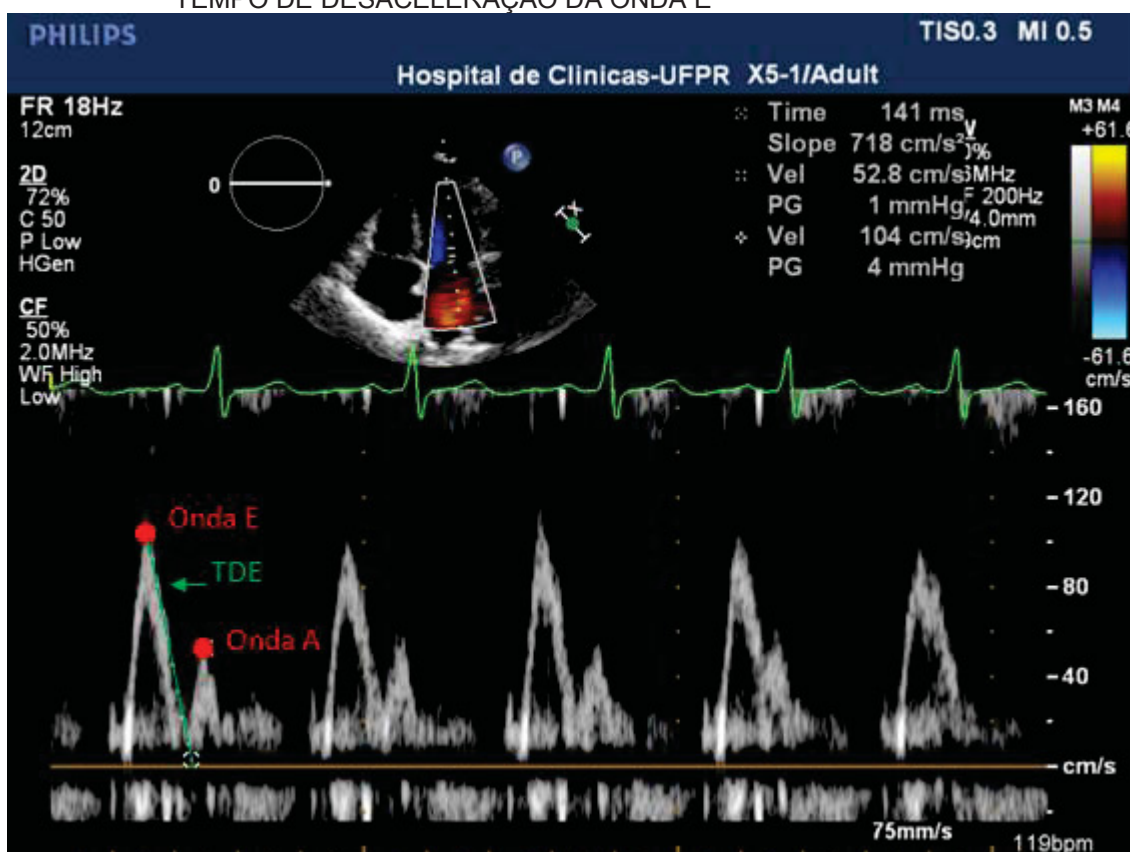
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: (A) Medida do *strain* longitudinal na incidência apical de quatro câmaras; (B) Medida do *strain* longitudinal na incidência apical de duas câmaras; (C) Medida do *strain* longitudinal na incidência apical longitudinal; (D) Medida do *strain* longitudinal global do VE.

- 6) Fluxo de entrada mitral: o fluxo de entrada mitral foi registrado a partir da incidência apical de quatro câmaras, com o volume-amostra do Doppler pulsado posicionado nas pontas das cúspides da valva mitral (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012).
- Velocidade da onda E: a média das velocidades da onda E de múltiplos batimentos foi calculada em centímetros/segundo (cm/s) (FIGURA 11).
  - Velocidade da onda A: a média das velocidades da onda A de múltiplos batimentos foi calculada em cm/s (FIGURA 11).
  - Relação E/A: para o cálculo da relação E/A foi utilizada a fórmula – relação E/A = velocidade da onda E/velocidade da onda A.

- d. Tempo de desaceleração da onda E (TDE): para a medida do TDE, tracejou-se uma linha de desaceleração do pico da onda E até a linha de base do fluxo de entrada mitral. O TDE foi registrado em milissegundos (FIGURA 11).

FIGURA 11 – MEDIDA DA VELOCIDADE DA ONDA E, DA VELOCIDADE DA ONDA A E DO TEMPO DE DESACELERAÇÃO DA ONDA E



FONTE: O autor (2018).

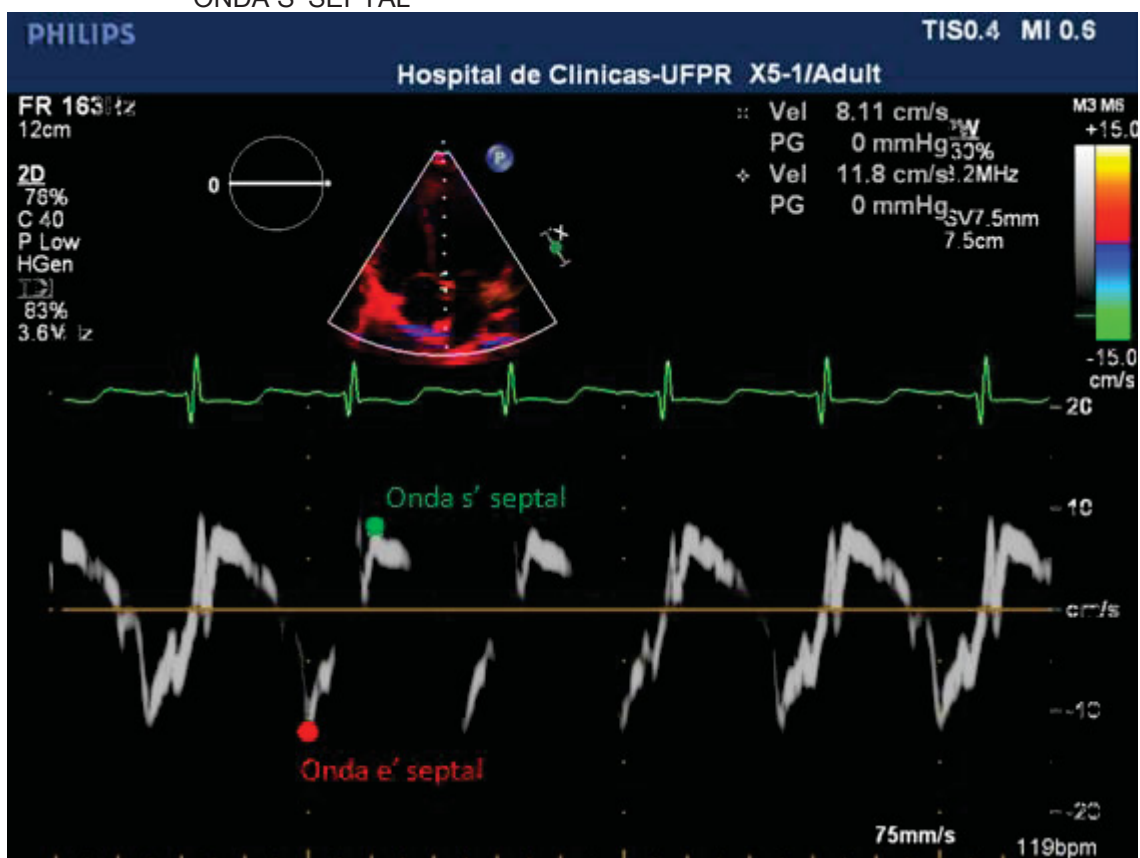
LEGENDA: Velocidade da onda E e da onda A do fluxo de entrada mitral (vermelho); TDE - tempo de desaceleração da onda E do fluxo de entrada mitral (verde).

- 7) Velocidade anular mitral pelo Doppler tecidual: a velocidade anular mitral foi registrada a partir da incidência apical de quatro câmaras, com o volume-amostra do Doppler tecidual posicionado sobre o anel, próximo do local de inserção da valva mitral, nas posições septal e lateral (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012).
- a. Velocidade da onda e' septal: a média das velocidades da onda e' septal de múltiplos batimentos foi calculada em cm/s (FIGURA 12).



- b. Velocidade da onda e' lateral: a média das velocidades da onda e' lateral de múltiplos batimentos foi calculada em cm/s.
- c. Velocidade da onda e' média: para o cálculo da velocidade da onda e' média foi utilizada a fórmula – velocidade da onda e' média = (velocidade da onda e' septal + velocidade da onda e' lateral)/2.
- d. Velocidade da onda s' septal: a média das velocidades da onda s' septal de múltiplos batimentos foi calculada em cm/s (FIGURA 12).
- e. Velocidade da onda s' lateral: a média das velocidades da onda s' lateral de múltiplos batimentos foi calculada em cm/s.

FIGURA 12 – MEDIDA DA VELOCIDADE DA ONDA E' SEPTAL E DA VELOCIDADE DA ONDA S' SEPTAL



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Velocidade da onda e' (vermelho) e da onda s' (verde) do anel mitral septal.

8) Relação E/e' (ARMSTRONG, W.F.; RYAN T., 2012):

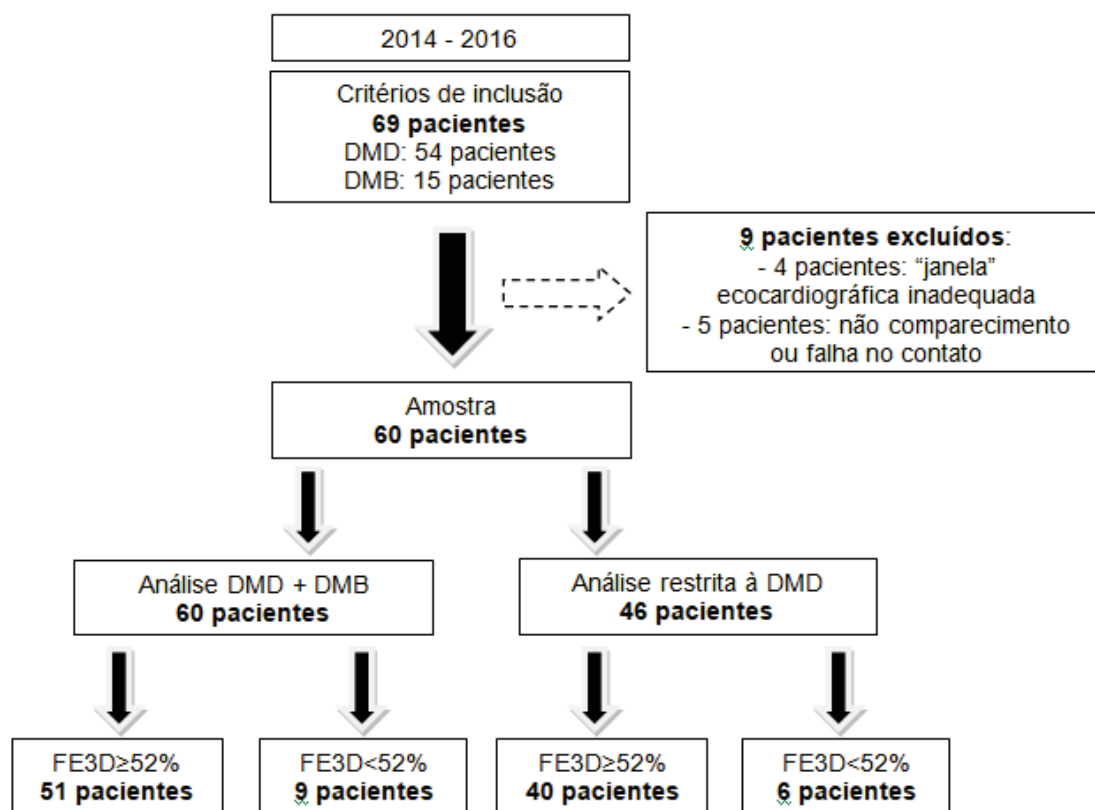
- a. Relação E/e' septal: para o cálculo da relação E/e' septal foi utilizada a fórmula – relação E/e' septal = velocidade da onda E/velocidade da onda e' septal.
- b. Relação E/e' lateral: para o cálculo da relação E/e' lateral foi utilizada a fórmula – relação E/e' lateral = velocidade da onda E/velocidade da onda e' lateral.
- c. Relação E/e' média: para o cálculo da relação E/e' média foi utilizada a fórmula – relação E/e' média = velocidade da onda E/velocidade da onda e' média.

### 3.2.9 Análise dos fatores associados à disfunção sistólica do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional

Para a análise dos fatores associados à disfunção sistólica do VE avaliada pelo método tridimensional, foram excluídos os pacientes que não realizaram o ETT, seja devido à impossibilidade de estar presente para a realização do mesmo ou à “janela” ecocardiográfica inadequada para a correta avaliação da função sistólica do VE (FIGURA 16). Os pacientes foram alocados em dois grupos distintos: disfunção sistólica do VE (FE3D < 52%) ou FEVE preservada (FE3D ≥ 52%) (FIGURA 13). Foram realizadas duas análises distintas, uma incluindo todos os pacientes (DMD e DMB) e outra incluindo apenas pacientes com DMD. Não foi possível realizar essa análise incluindo apenas pacientes com DMB devido ao pequeno número de pacientes com DMB e disfunção sistólica do VE. As variáveis estudadas foram tempo de duração da doença, atraso na aquisição da marcha, idade da perda da deambulação, distância percorrida em um período de 6 minutos, uso de corticoterapia, CK, localização da mutação no gene *DMD*, efeito da mutação na “fase de leitura”, análise imunohistoquímica e SVE ao ECG.



FIGURA 13 – FLUXOGRAMA REFERENTE À SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA A ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELO MÉTODO TRIDIMENSIONAL



FONTE: O autor (2018).

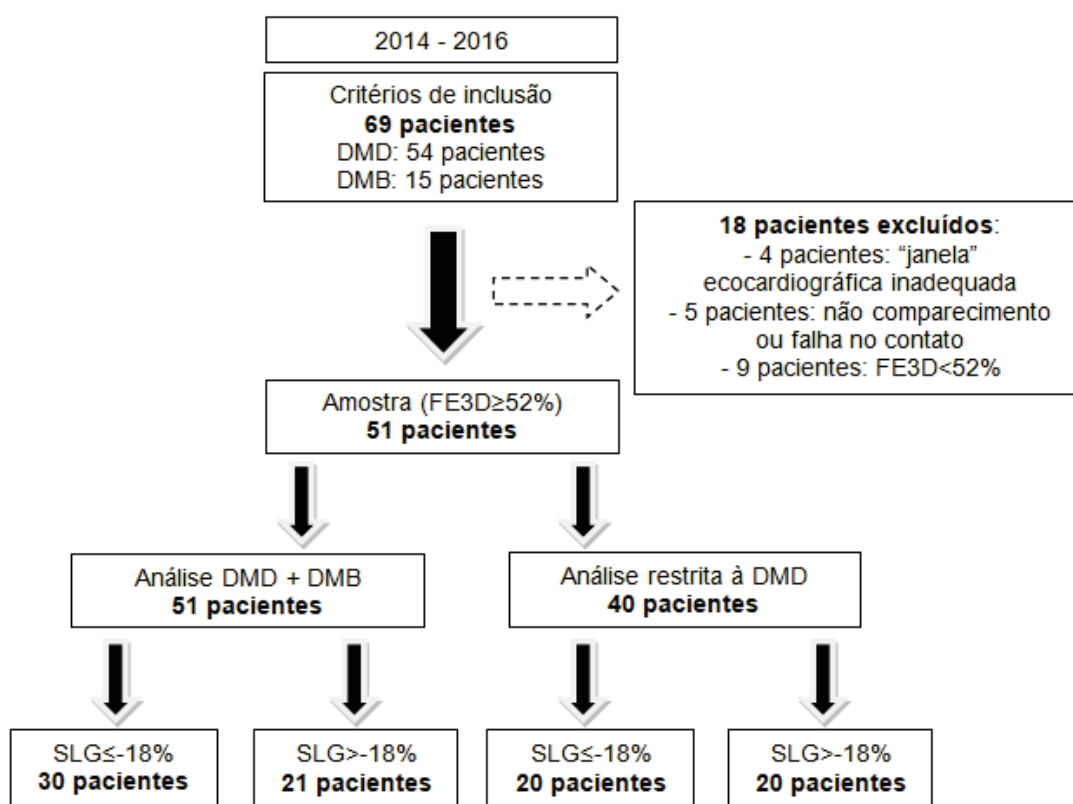
LEGENDA: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional.

### 3.2.10 Análise dos fatores associados à disfunção sistólica precoce do ventrículo esquerdo

Para a análise dos fatores associados à disfunção sistólica precoce do VE, foram excluídos os pacientes com FE3D < 52% e aqueles que não realizaram o ETT, seja devido à impossibilidade de estar presente para a realização do mesmo ou à “janela” ecocardiográfica inadequada para a correta avaliação da função sistólica do VE (FIGURA 16). Os pacientes com FE3D ≥ 52% foram alocados em dois grupos distintos: disfunção sistólica precoce do VE (SLG > -18%) ou função sistólica do VE preservada (SLG ≤ -18%) (FIGURA 14). Foram realizadas duas análises distintas, uma incluindo todos os pacientes (DMD e DMB) e outra incluindo apenas pacientes com DMD. Foi realizada ainda uma análise incluindo apenas pacientes com DMD e mutação do tipo

deleção. Não foi possível realizar essa análise incluindo apenas pacientes com DMB devido ao pequeno número de pacientes com DMB e disfunção sistólica precoce do VE. As variáveis estudadas foram tempo de duração da doença, atraso na aquisição da marcha, idade da perda da deambulação, distância percorrida em um período de 6 minutos, uso de corticoterapia, CK, localização da mutação no gene *DMD*, efeito da mutação na “fase de leitura”, análise imunohistoquímica e SVE ao ECG.

FIGURA 14 – FLUXOGRAMA REFERENTE À SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA A ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO



FONTE: O autor (2018).

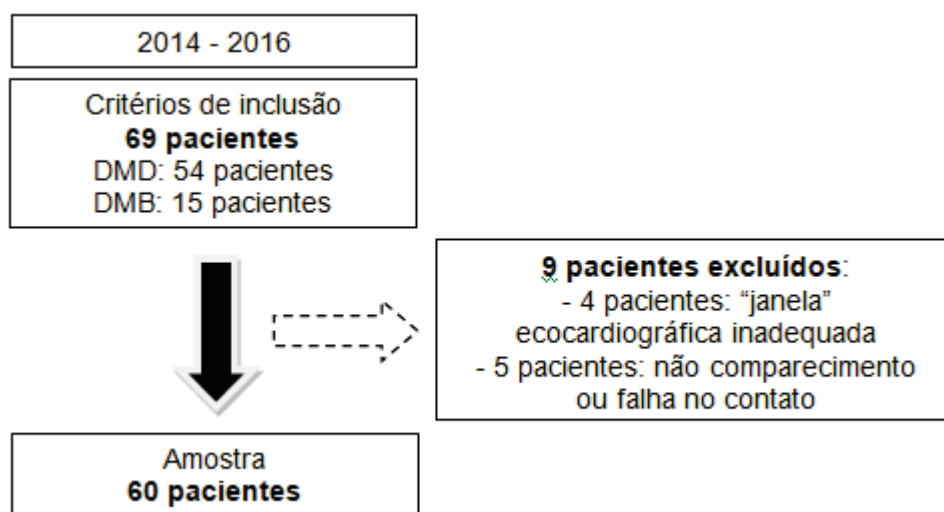
LEGENDA: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo.

### 3.2.11 Análise comparativa entre a ecocardiografia bidimensional e a ecocardiografia tridimensional

Para a comparação entre os métodos tridimensional e bidimensional, foram excluídos os pacientes que não realizaram o ETT, seja devido à

impossibilidade de estar presente para a realização do mesmo ou à “janela” ecocardiográfica inadequada para a correta avaliação da função sistólica do VE (FIGURA 15; FIGURA 16). Os parâmetros ecocardiográficos estudados foram VDVE, VSVE, FEVE e volume do AE. Foi avaliado o nível de concordância entre os dois métodos para a detecção de VDVE aumentado, VSVE aumentado, disfunção sistólica do VE e volume do AE aumentado.

FIGURA 15 – FLUXOGRAMA REFERENTE À SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA A ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker.

FIGURA 16 – DEFORMIDADE TORÁCICA EM PACIENTE COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE



LEGENDA: Paciente M.P.F.B., 13 anos - (A) Vista dorsal com paciente sentado; (B) Vista frontal com paciente deitado.

### 3.3 MÉTODO ESTATÍSTICO:

As variáveis quantitativas foram descritas por médias e desvios-padrões (DP) ou por medianas e valores mínimos e máximos. As variáveis qualitativas foram descritas por frequências e percentuais. O teste de normalidade utilizado foi o de Shapiro-Wilk. Para a comparação de dois grupos, em relação às variáveis quantitativas, foi usado o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para as variáveis qualitativas, a comparação foi feita por meio do teste exato de Fisher. Devido ao pequeno tamanho da amostra, não foi possível avaliar mais do que duas variáveis por vez na análise multivariada. Considerando que a idade do paciente é um fator comprovadamente associado com o desenvolvimento de cardiomiopatia nessa população (SPURNEY *et al.*, 2014), optou-se pelo ajuste de modelos de Regressão Logística bivariados para variáveis com  $p < 0,05$  na análise univariada, incluindo a idade como covariável. Após o ajuste, foi usado o teste de Wald para avaliação da significância das variáveis incluídas no modelo. A medida de associação estimada foi a razão de chance (*odds ratio*) com intervalo de confiança de 95%. Para a avaliação da correlação entre os

resultados obtidos pelos métodos tridimensional e bidimensional, foram estimados o coeficiente de correlação de Pearson ou o coeficiente de correlação de Spearman. Para a comparação dos dois métodos, foram usados o teste t de Student para amostras pareadas ou o teste não paramétrico de Wilcoxon (variáveis quantitativas) ou o teste binomial (variáveis qualitativas). O nível de concordância entre os dois métodos foi avaliado estimando o coeficiente de Kappa. Valores de p menores do que 0,05 indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0, Armonk, NY: IBM Corp.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

A amostra deste estudo foi constituída por 69 pacientes do sexo masculino, 54 (78,3%) com o diagnóstico de DMD e 15 (21,7%) com o diagnóstico de DMB. A média da idade dos pacientes foi de  $13,3 \pm 5,3$  anos (mediana: 13 anos; variação: 2,7-34,3 anos), sendo de  $11,9 \pm 4,3$  anos (mediana: 11,6 anos; variação: 2,7-21,3 anos) nos pacientes com DMD e de  $18,2 \pm 5,7$  (mediana: 16,4 anos; variação: 9,3-34,3 anos) anos nos pacientes com DMB.

#### 4.1.1 Evolução da doença, doenças associadas e história familiar

A média da idade de início da deambulação foi de  $18,7 \pm 8,0$  meses (mediana: 16 meses; variação: 9-48 meses) nos pacientes com DMD e de  $15,4 \pm 3,5$  meses (mediana 14,5 meses; variação: 11-24 meses) nos pacientes com DMB. Houve atraso na aquisição da marcha em 26 (48,2%) pacientes com DMD e em 5 (35,7%) pacientes com DMB.

A média da idade de início dos sintomas foi de  $3,1 \pm 1,7$  anos (mediana: 3 anos; variação: 1-7 anos) nos pacientes com DMD e de  $6,7 \pm 3,2$  anos (mediana: 6 anos; variação: 2-12 anos) nos pacientes com DMB. A média da idade do diagnóstico foi de  $7,9 \pm 2,7$  anos (mediana: 8 anos; variação: 2-14 anos) e de  $12,9 \pm 7,4$  anos (mediana: 11 anos; variação: 5-34 anos) nos pacientes com DMD e DMB, respectivamente. O tempo médio de duração da doença foi de  $8,2 \pm 4,4$  anos (mediana: 8 anos; variação: 0,2-19,0 anos) nos pacientes com DMD e de  $11,1 \pm 4,0$  anos (mediana: 9 anos; variação: 7-22 anos) nos pacientes com DMB. Um paciente não soube informar a idade de início dos sintomas e, portanto, o tempo de duração da doença não pode ser calculado.

Nos pacientes com DMD, 35 (64,8%) já haviam perdido a capacidade de deambular, enquanto nos pacientes com DMB, apenas dois (13,3%) não deambulavam. A média da idade da perda da deambulação foi de  $9,5 \pm 2,0$  anos (mediana: 9 anos; variação: 6-14 anos) nos pacientes com DMD e de  $15,0 \pm 4,2$  anos (mediana: 15 anos; variação: 12-18 anos) nos pacientes com DMB.

Déficit cognitivo esteve presente em 18 (34,0%) pacientes com DMD e em dois (13,3%) pacientes com DMB, sendo que não foi possível obter esse dado em um paciente com DMD. Dentre os pacientes com DMD, 11 (20,4%) apresentaram outras comorbidades, enquanto nos pacientes com DMB, apenas um referiu a presença de comorbidades, sendo esta cardiomiopatia dilatada.

História familiar esteve presente em 24 (45,3%) pacientes com DMD e em 10 (66,7%) pacientes com DMB.

A média da distância percorrida no TC6 foi de  $252,3 \pm 76,9$  metros (mediana: 260 metros; variação: 108,8-400,0 metros) nos pacientes com DMD e de  $389,9 \pm 111,7$  metros (mediana: 412,5; variação: 225,0-614,4 metros) nos pacientes com DMB. Dezenove pacientes (35,2%) com DMD e onze pacientes (73,3%) com DMB conseguiram completar a avaliação. Dos pacientes com DMD e DMB, 17 (89,5%) e três (27,3%) caminharam menos de 350 metros, respectivamente. Em 39 pacientes não foi possível medir a distância percorrida no TC6, sendo que 37 não deambulavam e nos outros dois pacientes a medida não foi realizada por outros motivos.

#### 4.1.2 Exames laboratoriais

A média da CK sérica, cujo valor de referência (VR) é de 30-200 miligramas/decilitro (mg/dl), foi de  $11835 \pm 6213$  mg/dl (mediana: 11000 mg/dl; variação: 391-30159 mg/dl) nos pacientes com DMD e de  $7828 \pm 10969$  mg/dl (mediana: 4514 mg/dl; variação: 251-43600 mg/dl) nos pacientes com DMB, sendo a média geral de  $10924 \pm 7647$  mg/dl (mediana: 9447 mg/dl; variação: 251-43600 mg/dl). A média da idade dos pacientes no momento da dosagem



da CK foi de  $7,1 \pm 2,5$  anos (mediana: 7,2 anos; variação: 1,0-13,2 anos) nos pacientes com DMD e de  $12,0 \pm 6,0$  (mediana: 11,5 anos; variação: 4,8-27,6 anos) anos nos pacientes com DMB. Em três pacientes não houve registro dos níveis séricos da CK.

A TGO (VR: 5-34 mg/dl) média foi de  $197,9 \pm 107,3$  mg/dl (mediana: 166 mg/dl; variação: 55-546 mg/dl) nos pacientes com DMD e de  $135,6 \pm 86,4$  mg/dl (mediana: 119 mg/dl; variação: 37-335 mg/dl) nos pacientes com DMB, sendo a média geral de  $184,5 \pm 105,6$  mg/dl (mediana: 157 mg/dl; variação: 37-546 mg/dl). Em 18 pacientes não houve registro dos níveis séricos da TGO.

A TGP (VR: 0-55 mg/dl) média foi de  $275,2 \pm 151,6$  mg/dl (mediana: 260 mg/dl; variação: 61-657 mg/dl) nos pacientes com DMD e de  $158,6 \pm 134,0$  mg/dl (mediana: 141,7 mg/dl; variação: 20-529 mg/dl) nos pacientes com DMB, sendo a média geral de  $250,6 \pm 154,5$  mg/dl (mediana: 210,5 mg/dl; variação: 20-657 mg/dl). Em 17 pacientes não houve registro dos níveis séricos da TGP.

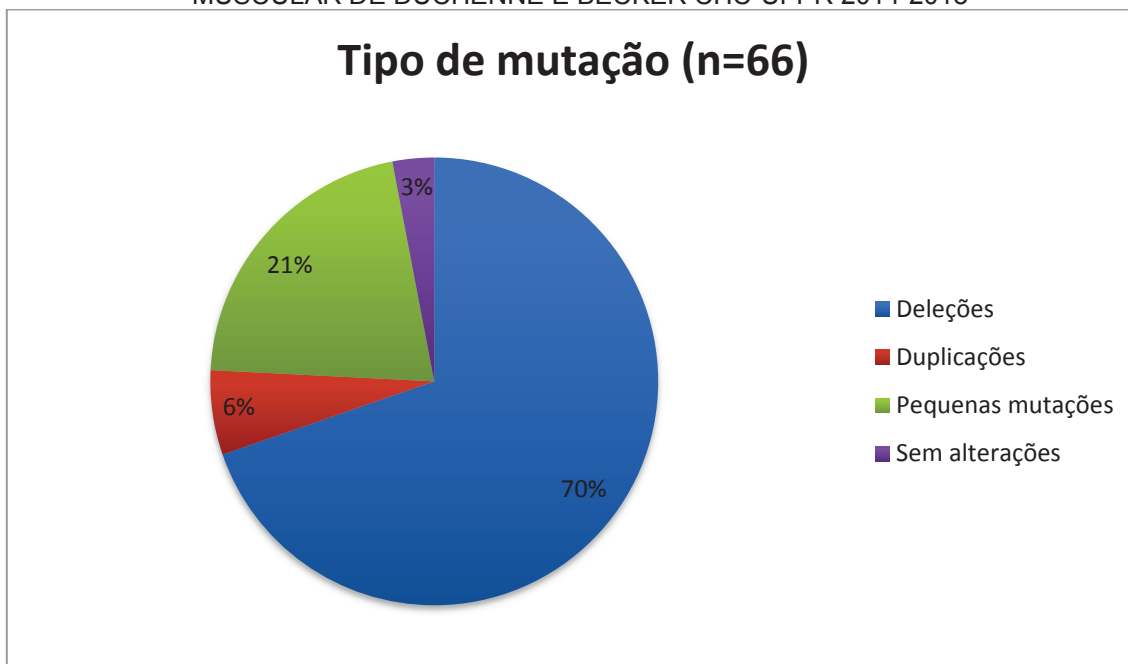
A CK-MB atividade (VR: < 25 mg/dl) média foi de  $410,4 \pm 262,4$  mg/dl (mediana: 386,5 mg/dl; variação: 116-945 mg/dl) nos pacientes com DMD. Apenas um paciente com DMB apresentava dosagem da CK-MB atividade (197 mg/dl). Em 48 pacientes não houve registro dos níveis séricos da CK-MB.

#### 4.1.3 Estudo genético

Quanto ao tipo de mutação, foram detectadas deleções de éxons em 46 (69,7%) pacientes, duplicações de éxons em quatro (6,1%) pacientes e pequenas mutações em 14 (21,2%) pacientes. Em dois (3,0%) pacientes a análise genética não demonstrou alterações: o primeiro é um paciente com 11 anos de idade, que iniciou com sintomas aos 2 anos, perdeu a capacidade de deambular aos 10 anos, apresentou uma CK inicial de 6547 mg/dl e a análise imunohistoquímica revelou ausência de distrofina no terminal carboxila e no domínio rod e raras fibras positivas no terminal amino; o segundo tinha 10 anos de idade, apresentou sintomas aos 3 anos, ainda deambulava, a CK inicial era de 8611 mg/dl e a análise imunohistoquímica mostrou ausência de distrofina no

terminal carboxila, raras fibras positivas no domínio rod e redução difusa na maioria das fibras no terminal amino. Apenas três (5,6%) pacientes não realizaram a análise genética (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 – TIPOS DE MUTAÇÃO NO GENE *DMD* DOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

As características das pequenas mutações estão descritas com detalhes na TABELA 1.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS PEQUENAS MUTAÇÕES NO GENE *DMD* DOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018

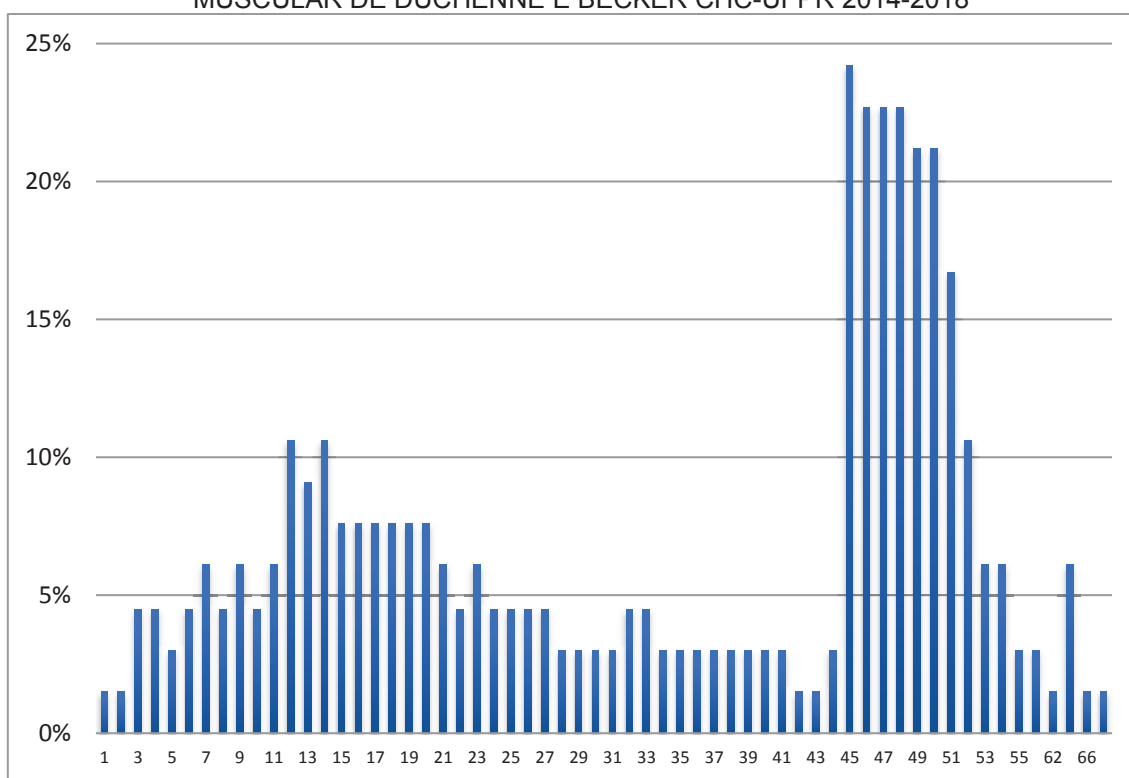
DESCRIÇÃO	DMD	DMB
Deleção de 15 pares de bases causando a remoção de 5 aminoácidos, do códon 969 ao 973 do éxon 33, sem perda da fase de leitura [c.2905_2919del, p.969_973del]	-	1
Mutação <i>nonsense</i> no aminoácido 295 do éxon 9 [c.883C>T, p.R295X]	-	1
Mutação no <i>splice site</i> do éxon 32, gerando perda da fase de leitura, seguido de um códon de parada no quinto aminoácido subsequente [c.4518+1G>T]	1	-
Deleção de 4 bases no éxon 62, gerando perda da fase de leitura, seguido de um códon de parada no décimo nono aminoácido subsequente [c.9204_9207delCAAA, p.N3068Kfs19]	1	-
Mutação no <i>splice site</i> do éxon 59, gerando perda da fase de leitura [c.8937+1G>C]	-	1
Mutação no íntron 59 [c.8937+1G>C]	-	1
Deleção de 4 pares de bases no éxon 65, gerando perda da fase de leitura e um códon de parada precoce [c.9459_9462del, p.C3153fs]	3	-
Deleção de 1 base no éxon 13, gerando perda da fase de leitura, seguido de um códon de parada no segundo aminoácido subsequente [c.1495delG, p.D499I]	1	-
Mutação <i>nonsense</i> no aminoácido 1046 do éxon 23 [c.3136C>T, p.Q1046X]	1	-
Mutação no <i>splice site</i> do íntron 7 [c.649+1G>T]	1	-
Mutação <i>nonsense</i> no aminoácido 539 do éxon 14 [c.1615C>T, p.R539X]	2	-

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker.

O éxon mais frequentemente acometido foi o éxon 45 (24,2% dos pacientes), seguido pelos éxons 46, 47 e 48 (22,7% dos pacientes, cada um), éxons 49 e 50 (21,2% dos pacientes, cada um), e éxon 51 (16,7% dos pacientes) (GRÁFICO 2). Nas mutações do tipo deleção o éxon mais frequentemente acometido foi o éxon 45 e nas mutações do tipo duplicação o éxon 12.

GRÁFICO 2 – ÉXONS ACOMETIDOS DO GENE *DMD* NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



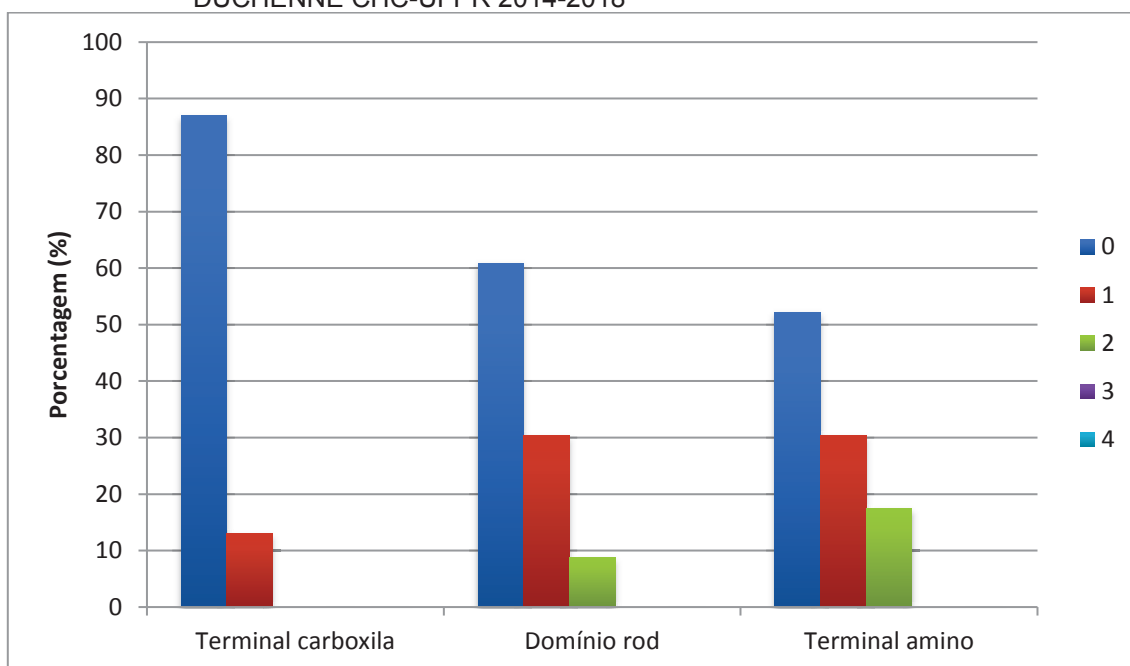
FONTE: O autor (2018).

Mutações “fora de fase” foram detectadas em 48 (72,7%) pacientes, enquanto mutações “em fase” foram detectadas em 16 (24,2%) pacientes.

#### 4.1.4 Análise imunohistoquímica de material obtido na biopsia muscular

Dos 69 pacientes, 31 (44,9%) foram submetidos à biopsia muscular e à análise imunohistoquímica do material obtido. Os graus de comprometimento nos três domínios principais da distrofina, terminal carboxila, domínio rod e terminal amino, são demonstrados nos GRÁFICOS 3 e 4.

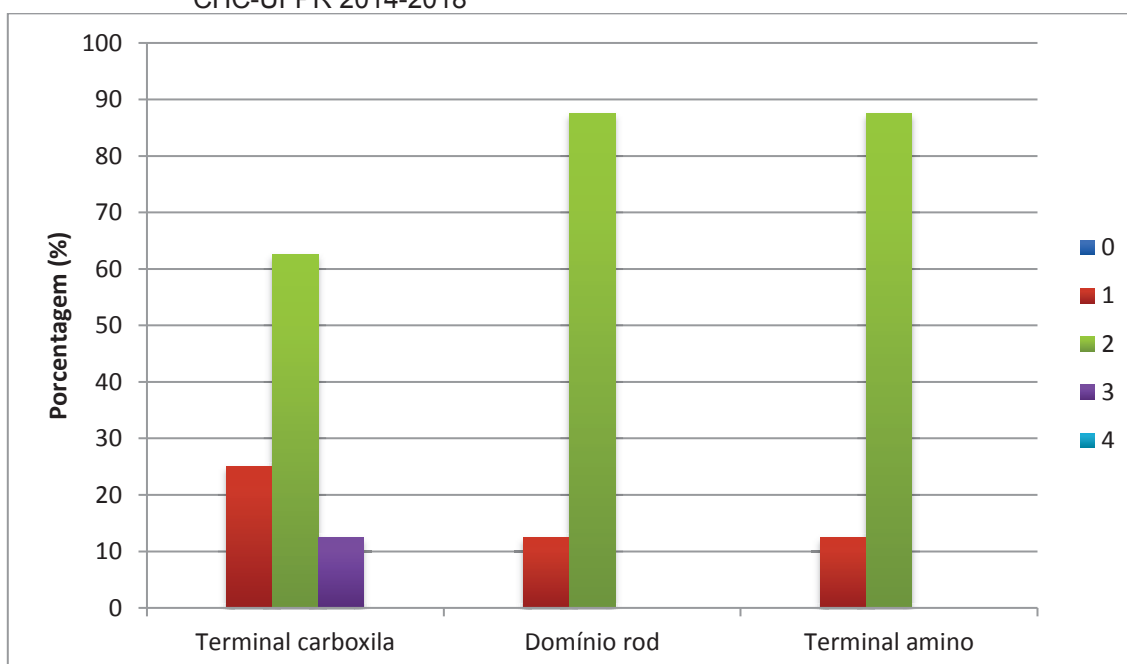
GRÁFICO 3 – GRAUS DE COMPROMETIMENTO NOS TRÊS DOMÍNIOS PRINCIPAIS DA DISTROFINA NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE CHC-UFRP 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: 0 – ausência de expressão da distrofina ou alguns pontos em raros segmentos; 1 – raras fibras positivas; 2 – redução difusa na maioria das fibras, falhas focais grandes e médias ou padrão mosaico ou falhas focais pequenas e múltiplas ou padrão rosário; 3 – falhas focais pequenas e raras; 4 – expressão normal da distrofina.

GRÁFICO 4 – GRAUS DE COMPROMETIMENTO NOS TRÊS DOMÍNIOS PRINCIPAIS DA DISTROFINA NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: 0 – ausência de expressão da distrofina ou alguns pontos em raros segmentos; 1 – raras fibras positivas; 2 – redução difusa na maioria das fibras, falhas focais grandes e médias ou padrão mosaico ou falhas focais pequenas e múltiplas ou padrão rosário; 3 – falhas focais pequenas e raras; 4 – expressão normal da distrofina.

#### 4.1.5 Tratamento

Nos pacientes com DMD, 45 (83,3%) fizeram ou fazem uso de corticoterapia, enquanto nos pacientes com DMB, seis (40,0%) fizeram ou fazem uso de corticoterapia. A droga mais utilizada foi a prednisona (74,0%), seguida pela prednisolona (18,0%) e pelo deflazacort (8,0%). A média da idade de início da corticoterapia foi de  $7,0 \pm 2,5$  anos (mediana: 7 anos; variação: 3-15 anos) nos pacientes com DMD e de  $10,2 \pm 4,3$  anos (mediana: 10 anos; variação: 5-17 anos) nos pacientes com DMB. A média do tempo de uso da corticoterapia foi de  $3,9 \pm 3,0$  anos (mediana: 3,2 anos; variação: 0,5-11,1 anos) nos pacientes com DMD e de  $3,6 \pm 2,3$  anos (mediana: 4 anos; variação: 3-6 anos) nos pacientes com DMB. Vinte e dois pacientes interromperam o uso da corticoterapia.

Nove pacientes (13,0%) fizeram ou fazem uso de IECA ou BRA-II, sendo oito com diagnóstico de DMD e um com diagnóstico de DMB. A droga mais

utilizada foi o enalapril (66,7%), seguida pelo captopril (22,2%) e pela losartana (11,1%). A média da idade de início foi de  $14,0 \pm 4,4$  anos (mediana: 13 anos; variação: 9-19 anos) nos pacientes com DMD. O paciente com DMB iniciou o uso aos 14 anos de idade. Três pacientes interromperam o tratamento, sendo os motivos relatados em um desses casos a hipotensão e a sonolência.

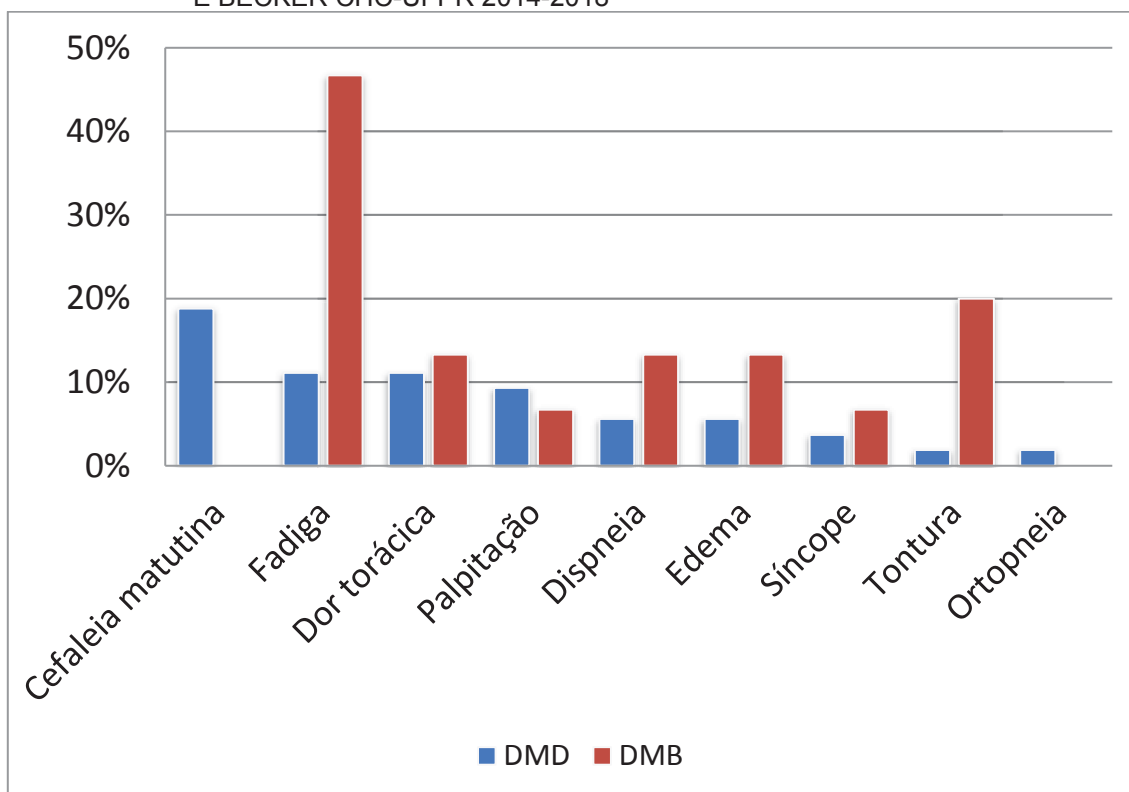
Cinco pacientes (7,2%) fizeram ou fazem uso de betabloqueador, sendo quatro com diagnóstico de DMD e um com diagnóstico de DMB. O carvedilol foi o único betabloqueador utilizado. A média da idade de início foi de  $16,0 \pm 3,8$  anos (mediana: 17 anos; variação: 11-19 anos) nos pacientes com DMD. O paciente com DMB iniciou o uso aos 14 anos de idade. Nenhum paciente interrompeu o tratamento.

Dos 69 pacientes, 46 (66,7%) estavam em um programa de fisioterapia motora e 22 (31,9%) em um programa de fisioterapia respiratória.

#### 4.1.6 Avaliação clínica

Os sintomas mais frequentes foram fadiga (18,8% dos pacientes), seguida por dor torácica (11,6% dos pacientes) e por palpitação (8,7% dos pacientes) (GRÁFICO 5). Ortopneia e cefaleia matutina foram relatadas apenas por pacientes com DMD. Nenhum paciente referiu dispneia paroxística noturna ou lipotímia.

GRÁFICO 5 – SINTOMAS NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



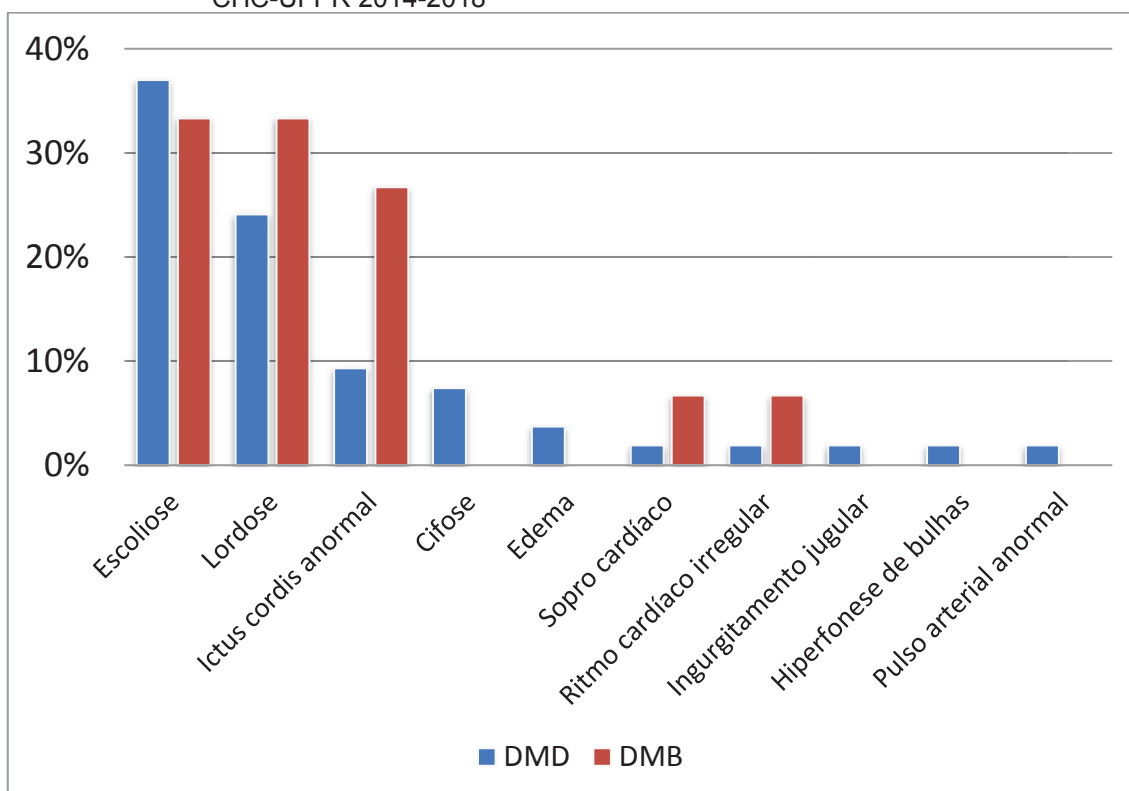
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker.

Em relação aos dados vitais, dos 49 pacientes avaliados, apenas cinco (10,2%), todos com DMD, apresentaram pressão arterial limítrofe ou hipertensão arterial. A PAS média foi de  $102,4 \pm 15,2$  milímetros de mercúrio (mmHg) (mediana: 100 mmHg; variação: 88-160 mmHg) nos pacientes com DMD e de  $105,7 \pm 8,2$  mmHg (mediana: 106 mmHg; variação: 90-120 mmHg) nos pacientes com DMB; e a PAD média foi de  $65,9 \pm 11,3$  mmHg (mediana: 60 mmHg; variação: 56-110 mmHg) nos pacientes com DMD e de  $67,6 \pm 6,2$  mmHg (mediana: 70 mmHg; variação: 60-80 mmHg) nos pacientes com DMB. A FC média foi de  $94,0 \pm 17,2$  batimentos por minuto (bpm) (mediana: 94 bpm; variação: 61-138 bpm) nos pacientes com DMD e de  $77,9 \pm 15,3$  bpm (mediana: 74 bpm; variação: 56-103 bpm) nos pacientes com DMB. A FR média foi de  $20,4 \pm 4,1$  incursões respiratórias por minutos (irpm) (mediana: 20 irpm; variação: 12-30 irpm) nos pacientes com DMD e de  $18,4 \pm 2,0$  irpm (mediana: 20 irpm; variação: 16-20 irpm) nos pacientes com DMB. A SaO<sub>2</sub> média foi de  $97,0 \pm 1,5\%$  (mediana: 97%; variação: 93-99%) nos pacientes com DMD e de  $98,0 \pm 1,1\%$  (mediana: 98%; variação: 95-100%) nos pacientes com DMB.

Os achados mais frequentes ao exame físico foram escoliose (36,2% dos pacientes), seguida por lordose (26,1% dos pacientes) e *ictus cordis* anormal (13,0% dos pacientes) (GRÁFICO 6). Nenhum paciente apresentou cianose, hepatomegalia, sibilos ou estertores crepitantes à ausculta pulmonar, frêmito cardíaco ou hipofonese de bulhas.

GRÁFICO 6 – ACHADOS AO EXAME FÍSICO CARDIOVASCULAR E DO TÓRAX NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker.

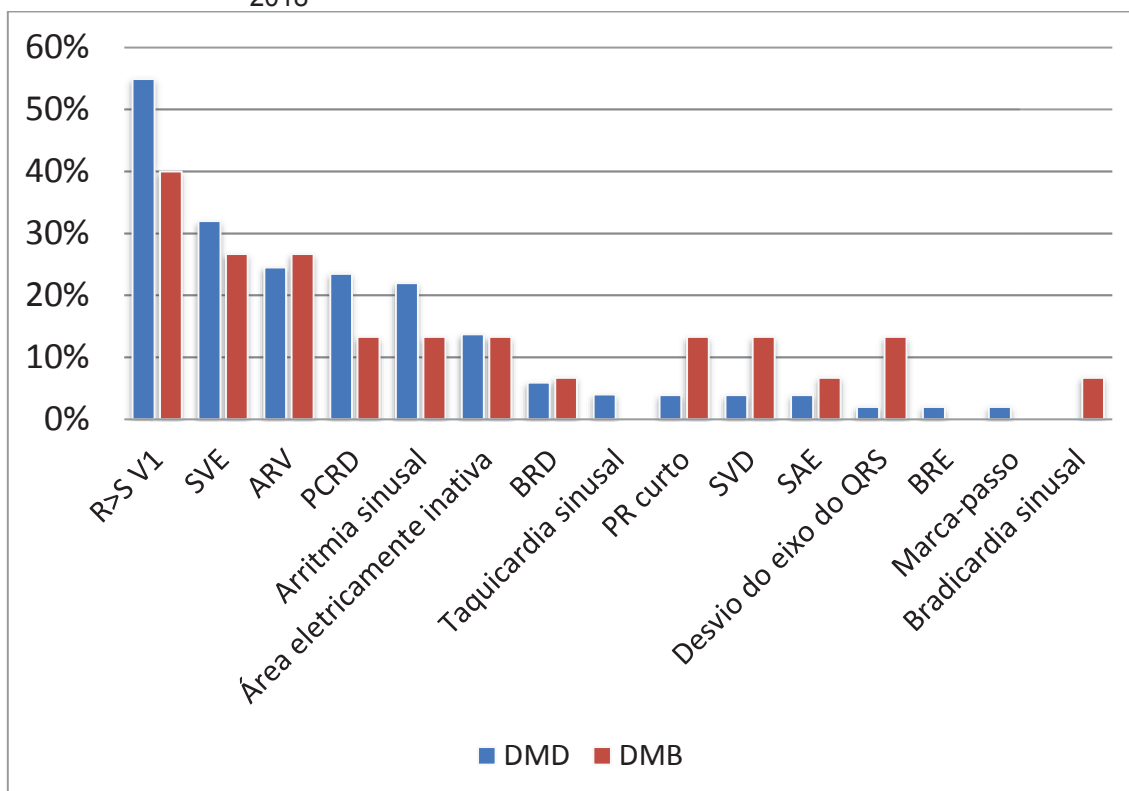
#### 4.1.7 Avaliação eletrocardiográfica

Dos 69 pacientes, apenas três não realizaram ECG. A média da idade dos pacientes no momento da realização do ECG foi de  $12,8 \pm 5,5$  anos, sendo de  $11,5 \pm 4,3$  anos (mediana: 11,3 anos; variação: 2,6-21,3 anos) nos pacientes com DMD e de  $17,1 \pm 7,2$  anos (mediana: 17,1 anos; variação: 5,8-34,3 anos) nos pacientes com DMB. As alterações eletrocardiográficas mais frequentes foram onda R maior do que onda S em V1 (51,5% dos pacientes), seguida por



SVE (30,8% dos pacientes) e por ARV (25% dos pacientes) (GRÁFICO 7). Nenhum paciente apresentou BAV, desvio do eixo elétrico do complexo QRS para a esquerda, BDAS ou SAD. Apenas oito (12,1%) pacientes não apresentaram alterações ao ECG, sendo quatro deles com DMD e quatro com DMB.

GRÁFICO 7 – ALTERAÇÕES ELETROCARDIOGRÁFICAS NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker; BRD – bloqueio do ramo direito do feixe de His; BRE – bloqueio do ramo esquerdo do feixe de His; SAE – sobrecarga atrial esquerda; SVE – sobrecarga ventricular esquerda; SVD – sobrecarga ventricular direita; ARV – alteração da repolarização ventricular; PCRD – perturbação da condução do ramo direito do feixe de His.

#### 4.2 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Dos 69 pacientes, nove (13,0%) não realizaram o ETT, quatro (5,8%) devido à janela ecocardiográfica inadequada e cinco (7,2%) devido ao não comparecimento do paciente ou à falha no contato com o paciente. Portanto, 60 pacientes realizaram a avaliação ecocardiográfica, 46 (76,7%) pacientes com DMD e 14 (23,3%) pacientes com DMB. A média da idade dos pacientes

que realizaram o ETT foi de  $12,9 \pm 5,4$  anos (mediana: 12,5 anos; variação: 2,7-34,3 anos),  $11,3 \pm 4,1$  anos (mediana: 11 anos; variação: 2,7-19,0 anos) nos pacientes com DMD e  $18,1 \pm 5,9$  anos (mediana: 16,2 anos; variação: 9,3-34,3 anos) naqueles com DMB. As medidas ecocardiográficas avaliadas estão descritas na TABELA 2.

TABELA 2 – MEDIDAS ECOCARDIOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne e Becker CHC-UFPR 2014-2018

Medidas ecocardiográficas	DMD	DMB	DMD + DMB	Valor de p
Septo interventricular (mm)	6,9±1,5	8,1±0,7	7,2±1,4	<0,001*
Parede posterior (mm)	6,7±1,4	7,5±1,1	6,9±1,3	0,049*
Dimensão diastólica do VE (mm)	41,8±5,9	51,5±7,7	44,1±7,5	<0,001*
Dimensão sistólica do VE (mm)	28,8±6,2	36,1±10,0	30,6±7,8	0,020*
Massa do VE (g/m <sup>2</sup> )	65,8±22,2	85,3±13,2	70,3±22,0	<0,001*
Dimensão linear do AE (mm)	27,7±3,8	35,5±3,2	29,5±4,9	<0,001*
Encurtamento percentual (%)	31,6±5,9	31,2±9,3	31,5±6,7	0,896*
FEVE Teicholz (%)	59,5±8,9	57,6±14,8	59,1±10,4	0,656*
VDVE 2D (ml)	56,9±23,2	94,3±32,2	65,6±29,9	<0,001*
VDVE 2D (ml/m <sup>2</sup> )	48,3±12,1	60,2±19,0	51,1±14,8	0,009*
VSVE 2D (ml)	18,0 (9,0-87,0)	34,5 (23,0-140,0)	23,0 (9,0-140,0)	<0,001**
VSVE 2D (ml/m <sup>2</sup> )	17,3 (9,4-62,1)	21,0 (15,4-82,4)	18,8 (9,4-82,4)	0,007**
FEVE Simpson (%)	62,5 (34,0-74,0)	59,5 (27,0-68,0)	61,5 (27,0-74,0)	0,294**
VDVE 3D (ml)	50,3±20,8	86,8±31,0	58,8±28,0	0,001*
VDVE 3D (ml/m <sup>2</sup> )	43,0±10,8	55,4±18,3	46,0±13,8	0,028*
VSVE 3D (ml)	17,4 (6,7-97,8)	28,3 (17,1-126,7)	20,8 (6,7-126,7)	<0,001**
VSVE 3D (ml/m <sup>2</sup> )	16,3 (7,3-69,9)	18,1 (11,5-74,5)	16,5 (7,3-74,5)	0,060**
FEVE 3D (%)	60,6±9,5	59,0±12,0	60,2±10,0	0,604*
Volume do AE 2D (ml)	20,8±6,5	40,0±12,2	26,6±12,3	<0,001*
Volume do AE 2D (ml/m <sup>2</sup> )	19,1±5,7	25,6±6,8	20,6±6,6	0,001*
Volume do AE 3D (ml)	16,7±5,6	31,0±10,7	21,0±9,9	<0,001*
Volume do AE 3D (ml/m <sup>2</sup> )	15,4±5,2	19,8±6,5	16,4±5,8	0,011*
Strain longitudinal quatro câmaras (%)	-17,9±2,8	-18,4±4,1	-18,1±3,1	0,605*
Strain longitudinal duas câmaras (%)	-17,4±2,8	-18,1±3,8	-17,5±3,0	0,448*
Strain longitudinal três câmaras (%)	-16,5±3,3	-17,6±4,3	-16,8±3,5	0,324*
Strain longitudinal global (%)	-17,2±2,6	-17,9±3,6	-17,4±2,8	0,478*
Onda E (cm/s)	85,3±17,2	86,2±10,9	85,5±15,9	0,851*
Onda A (cm/s)	49,6±10,4	45,8 ±7,5	48,7±9,9	0,204*
Relação E/A	1,8±0,5	1,9±0,2	1,8±0,4	0,184*
TD da onda E (ms)	156,2±23,0	167,1±40,2	158,8±28,0	0,346*
E' septal (cm/s)	10,8±2,1	11,5±2,8	10,9±2,3	0,290*
E' lateral (cm/s)	16,4±3,4	16,4±3,4	16,4±3,4	0,998*
E' média (cm/s)	13,6±2,3	14,0±3,0	13,7±2,5	0,632*
S' septal (cm/s)	6,81±1,06	7,29±1,72	6,92±1,24	0,331*
S' lateral (cm/s)	9,53±1,80	9,34±2,78	9,48±2,05	0,810*
Relação E/e' septal	8,14±1,98	7,89±2,10	8,08±1,99	0,687*
Relação E/e' lateral	5,21±1,37	5,45±1,26	5,26±1,33	0,567*
Relação E/e' média	6,39±1,37±	6,42±1,53	6,39±1,40	0,939*

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: DMD – distrofia muscular de Duchenne; DMB – distrofia muscular de Becker; VE – ventrículo esquerdo; AE – átrio esquerdo; FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VDVE – volume diastólico do ventrículo esquerdo; VSVE – volume sistólico do ventrículo esquerdo; 2D – método bidimensional; 3D – método tridimensional \*Média±DP – Teste t de Student para amostras independentes; \*\*Mediana (mínimo-máximo) – Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

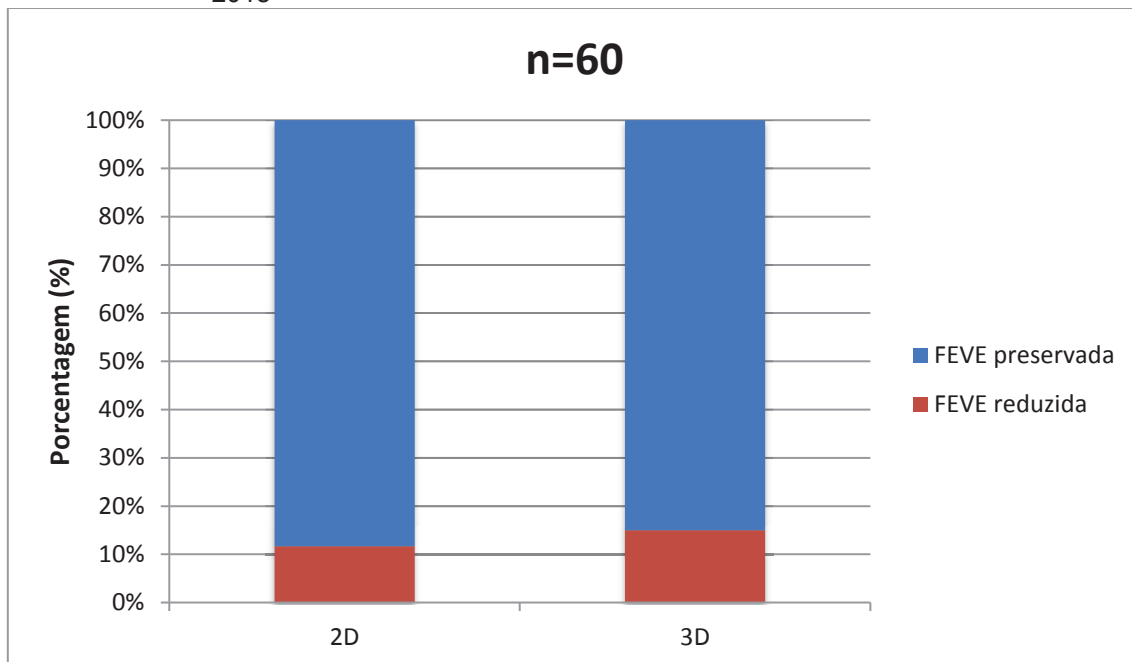
#### 4.2.1 Dimensões e espessuras miocárdicas do ventrículo esquerdo

Hipertrofia ventricular esquerda esteve presente em três pacientes (5,0%), sendo um (2,2%) com DMD e dois (14,3%) com DMB, todos eles com um padrão excêntrico e com disfunção sistólica do VE. Quatro (6,7%) pacientes apresentaram VDVE aumentado ao método bidimensional e cinco (8,3%) pacientes ao método tridimensional. VSVE aumentado foi detectado em seis (10,0%) pacientes com o método bidimensional e em oito (13,3%) pacientes com o método tridimensional.

#### 4.2.2 Função sistólica do ventrículo esquerdo

Sete (11,7%) pacientes apresentaram disfunção sistólica do VE (FEVE < 52%) ao método bidimensional, sendo quatro (8,7%) pacientes com DMD e três (21,4%) pacientes com DMB. Quando avaliada ao método tridimensional, a disfunção sistólica do VE esteve presente em nove (15,0%) pacientes, sendo seis (13,0%) pacientes com DMD e três (21,4%) pacientes com DMB (GRÁFICO 8). SLG do ventrículo esquerdo alterado (SLG > -18%) foi detectado em 29 (48,3%) pacientes, sendo 25 (54,4%) pacientes com DMD e 4 (28,6%) pacientes com DMB. Disfunção sistólica precoce do VE (FE3D  $\geq$  52% e SLG > -18%) esteve presente em 21 (35,0%) pacientes, sendo 20 (43,5%) com DMD e um (7,1%) com DMB (GRÁFICO 9). Considerando apenas os pacientes com FE3D  $\geq$  52%, a análise do *strain* miocárdico, por meio da medida do SLG, foi capaz de detectar disfunção sistólica precoce do VE na metade (50,0%) dos pacientes com DMD e em 9,1% dos pacientes com DMB. O valor adicional do SLG na detecção de disfunção sistólica do VE está representado no gráfico 10 (GRÁFICO 10).

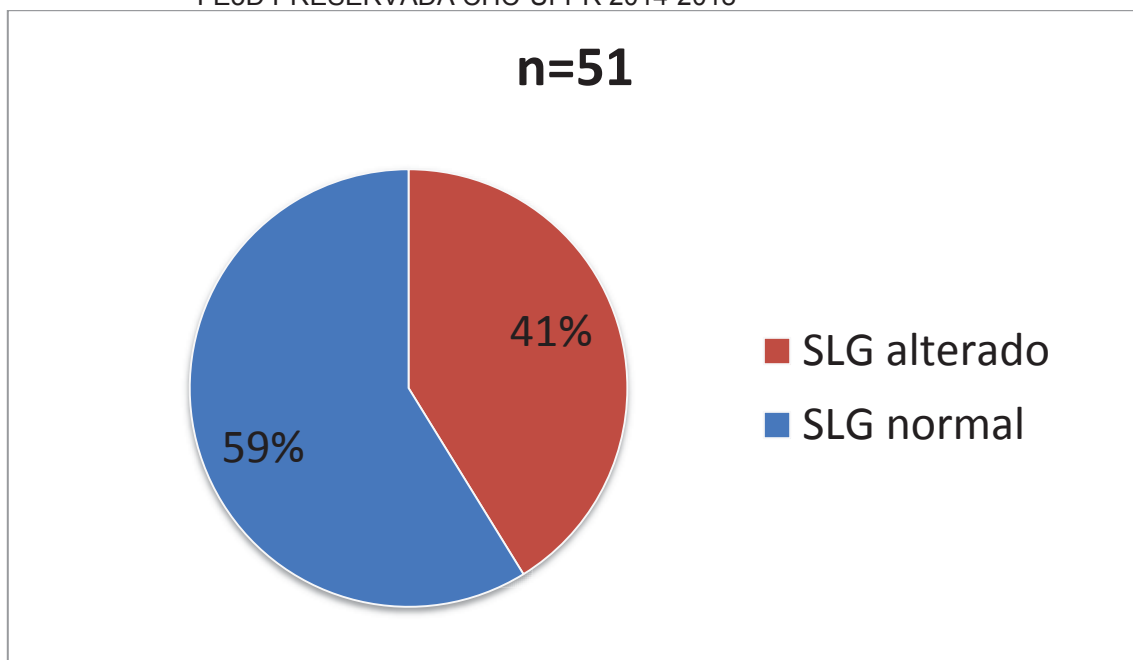
GRÁFICO 8 – FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELOS MÉTODOS BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

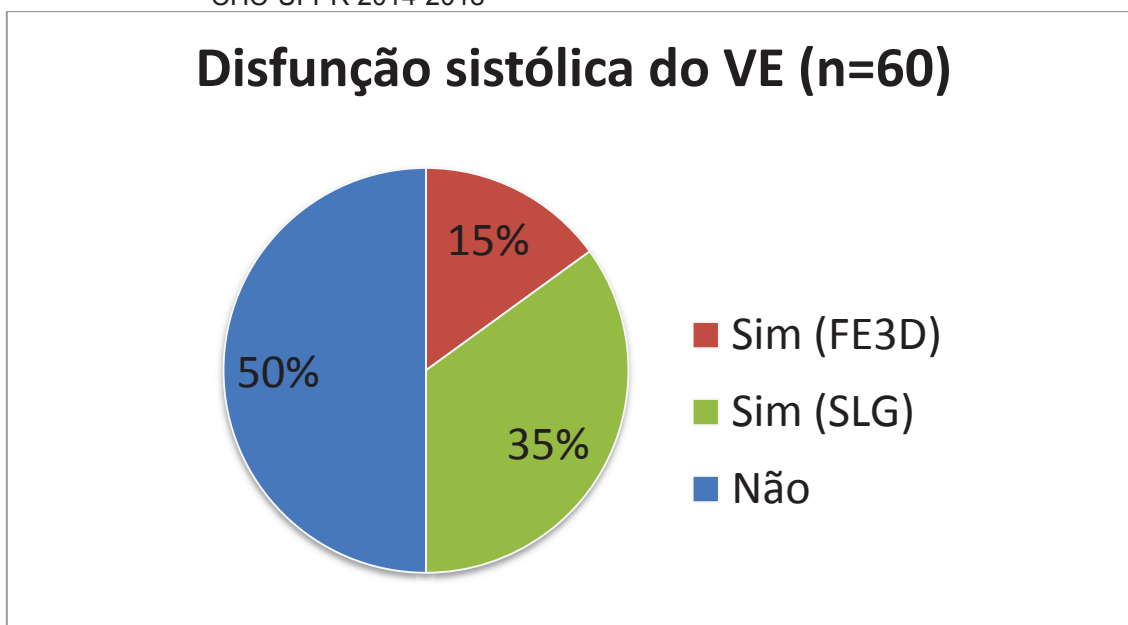
GRÁFICO 9 – DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOZE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER E FE3D PRESERVADA CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global.

GRÁFICO 10 – VALOR ADICIONAL DO *STRAIN* LONGITUDINAL GLOBAL NA DETECÇÃO DE DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: VE – ventrículo esquerdo; FE3D – fração de ejeção do VE avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global do VE.

#### 4.2.3 Dimensões do átrio esquerdo e avaliação do fluxo de entrada mitral e da velocidade anular mitral

Apenas um (1,7%) paciente, com DMB, apresentou aumento do AE ao método bidimensional. A ecocardiografia tridimensional revelou aumento atrial esquerdo em três (5,0%) pacientes, sendo um (2,2%) com DMD e dois (14,3%) com DMB. Aumento das pressões de enchimento do VE, estimada por meio da relação  $E/e'$ , foi infrequente, com apenas 7 (11,7%) pacientes apresentando relação  $E/e'$  média entre 8 e 13 e nenhum paciente apresentando relação  $E/e'$  média acima de 13.

#### 4.3 ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL

Todos os pacientes que realizaram o ETT (60 pacientes) foram incluídos nessa análise, sendo 46 pacientes com DMD e 14 pacientes com DMB. Cinquenta e um pacientes foram alocados no grupo sem disfunção sistólica do VE ( $FE3D \geq 52\%$ ) e nove pacientes foram alocados no grupo com disfunção sistólica do VE ( $FE3D < 52\%$ ). A média da idade dos pacientes foi de  $12,3 \pm 5,6$  anos no grupo sem disfunção sistólica do VE e de  $16,1 \pm 2,3$  anos no grupo com disfunção sistólica do VE; enquanto a média da FEVE foi de  $63,5 \pm 5,4\%$  e de  $41,2 \pm 9,3\%$ , respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para nenhuma das variáveis estudadas. Observou-se um maior tempo de duração da doença no grupo com disfunção sistólica do VE, porém, sem diferença estatisticamente significativa (TABELA 3; TABELA 4; ANEXO 2). Restrito a pacientes com tipo de mutação deleção, quando avaliados o acometimento de éxons individualmente, observou-se uma maior frequência de acometimento dos éxons 46 ( $p=0,038$ ) e 47 ( $p=0,038$ ) no grupo sem disfunção sistólica do VE. Quando avaliados o acometimento de pelo menos um éxon dentro da região de “*hot spot*”, o acometimento de mais de um éxon dentro da região de “*hot spot*” e o acometimento de um éxon *versus* mais de um éxon independente da localização, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

TABELA 3 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018

Variáveis	FE3D≥52%		FE3D<52%		Valor de p
	n	Média±DP ou n (%)	n	Média±DP ou n (%)	
Tempo de duração da doença (anos)	50	8,0±4,4	9	10,9±3,4	0,084*
Idade da perda da deambulação (anos)	22	9,4±1,9	6	10,3±2,1	0,279*
Atraso na aquisição da marcha	50	22 (44,0)	9	4 (44,4)	1**
Distância percorrida em um período de 6 minutos (m)	27	305,6±111,1	3	277,1±140,9	-
Uso de corticoterapia	51	36 (70,6)	9	7 (77,8)	1**
CK inicial (mg/dl)	48	11293±8494	9	10428±5680	0,771*
Mutação “fora de fase”	49	34 (69,4)	9	8 (88,9)	0,420**
Terminal carboxila – classificação zero	21	13 (61,9)	5	3 (60,0)	1**
Domínio rod – classificação zero	21	10 (47,6)	5	2 (40,0)	1**
Terminal amino – classificação zero	21	8 (38,1)	5	2 (40,0)	1**
Terminal carboxila/Domínio rod/Terminal amino – classificação zero	21	8 (38,1)	5	2 (40,0)	1**
Sobrecarga ventricular esquerda ao ECG	50	18 (36,0)	8	1 (12,5)	0,252**

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; CK – creatinoquinase; ECG – eletrocardiograma; \*Teste t de Student para amostras independentes; \*\*Teste exato de Fisher.

TABELA 4 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018

Éxon acometido	FE3D≥52% (n=51)	FE3D<52% (n=9)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
1-79	-	-	NS

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; NS – não significativo; \*Teste exato de Fisher.



#### 4.4 ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL, RESTRITA A PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Todos os pacientes com DMD que realizaram o ETT (46 pacientes) foram incluídos nessa análise. Quarenta pacientes foram alocados no grupo sem disfunção sistólica do VE ( $FE3D \geq 52\%$ ) e seis pacientes foram alocados no grupo com disfunção sistólica do VE ( $FE3D < 52\%$ ). A média da idade dos pacientes foi de  $10,7 \pm 3,9$  anos no grupo sem disfunção sistólica do VE e de  $15,8 \pm 2,1$  anos no grupo com disfunção sistólica do VE; enquanto a média da FEVE foi de  $63,3 \pm 5,6\%$  e de  $42,4 \pm 10,5\%$ , respectivamente.

Observou-se maior tempo de duração da doença no grupo com disfunção sistólica do VE ( $FE3D < 52\%$ ). Para as demais variáveis estudadas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (TABELA 5). Restrito a pacientes com tipo de mutação deleção, quando avaliados o acometimento de éxons individualmente (TABELA 6; ANEXO 3), o acometimento de pelo menos um éxon dentro da região de “*hot spot*”, o acometimento de mais de um éxon dentro da região de “*hot spot*” e o acometimento de um éxon *versus* mais de um éxon independente da localização, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

TABELA 5 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE CHC-UFPR 2014-2018

Variáveis	FE3D≥52%		FE3D<52%		Valor de p
	n	Média±DP ou n (%)	n	Média±DP ou n (%)	
Tempo de duração da doença (anos)	39	6,9±3,9	6	12,5±3,0	0,002*
Idade da perda da deambulação (anos)	22	9,4±1,9	5	10,0±2,1	0,507*
Atraso na aquisição da marcha	40	19 (47,5)	6	2 (33,3)	0,673**
Distância percorrida em um período de 6 minutos (m)	18	257,2±76,0	1	164,8	-
Uso de corticoterapia	40	31 (77,5)	6	6 (100,0)	0,327**
CK inicial (mg/dl)	37	12151±6696	6	12544±5737	0,893*
Mutação “fora de fase”	38	33 (86,8)	6	6 (100,0)	1**
Terminal carboxila – classificação zero	15	13 (86,7)	4	3 (75,0)	0,530**
Domínio rod – classificação zero	15	10 (66,7)	4	2 (50,0)	0,603**
Terminal amino – classificação zero	15	8 (53,3)	4	2 (50,0)	1**
Terminal carboxila/Domínio rod/Terminal amino – classificação zero	15	8 (53,3)	4	2 (50,0)	1**
Sobrecarga ventricular esquerda ao ECG	39	14 (35,9)	5	1 (20,0)	0,647**

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; CK – creatinoquinase; ECG – eletrocardiograma; \*Teste t de Student para amostras independentes; \*\*Teste exato de Fisher.

TABELA 6 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE CHC-UFPR 2014-2018

Éxon acometido	FE3D≥52% (n=40)	FE3D<52% (n=6)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
1-79	-	-	NS

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; NS – não significativo; \*Teste exato de Fisher.

#### 4.5 ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO

Todos os pacientes que realizaram o ETT e que tinham FEVE  $\geq 52\%$  ao método tridimensional (51 pacientes) foram incluídos nessa análise, sendo 40 pacientes com DMD e 11 pacientes com DMB. Trinta pacientes foram alocados no grupo com função sistólica do VE preservada (SLG  $\leq -18\%$ ) e 21 pacientes foram alocados no grupo com disfunção sistólica precoce do VE (SLG  $> -18\%$ ). A média da idade dos pacientes foi de  $11,7 \pm 5,3$  anos no grupo com função sistólica do VE preservada e de  $13,2 \pm 6,0$  anos no grupo com disfunção sistólica precoce do VE; enquanto a média da FEVE foi de  $64,2 \pm 4,5\%$  e de  $62,6 \pm 6,4\%$ , e a média do SLG foi de  $-19,7 \pm 1,3\%$  e de  $-15,6 \pm 1,6\%$ , respectivamente.

Observou-se menor distância percorrida em um período de 6 minutos e maior frequência de uso de corticoterapia no grupo com disfunção sistólica precoce do VE (FE3D  $\geq 52\%$  e SLG  $> -18\%$ ). Observou-se maior tempo de duração da doença, perda da deambulação mais tardia e maior frequência de mutação “fora de fase” no grupo com disfunção sistólica precoce do VE, porém, sem diferença estatisticamente significativa (TABELA 7). O acometimento dos éxons 48, 49, 50 e 52 foi mais frequente no grupo com disfunção sistólica precoce do VE (TABELA 8; ANEXO 4). Ajustando-se à idade, uso de corticoterapia (OR 19,8; IC95% 2,0-196,9;  $p=0,009$ ) e acometimento dos éxons 48 (OR 18,1; IC95% 3,2-101,5;  $p=0,001$ ), 49 (OR 14,8; IC95% 2,6-83,1;  $p=0,002$ ) e 50 (OR 31,6; IC95% 3,2-311,9;  $p=0,002$ ) permaneceram significativamente associados à disfunção sistólica precoce do VE. Para as demais variáveis com  $p < 0,05$  na análise univariada, não foi possível o ajuste do modelo bivariado.

TABELA 7 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER E FE3D≥52% CHC-UFPR 2014-2018

Variáveis	SLG≤-18%		SLG>-18%		Valor de p
	n	Média±DP ou n (%)	n	Média±DP ou n (%)	
Tempo de duração da doença (anos)	30	7,3±4,0	20	9,2±4,9	0,064*
Idade da perda da deambulação (anos)	7	8,3±1,5	15	9,9±1,8	0,062*
Atraso na aquisição da marcha	29	12 (41,4)	21	10 (47,6)	0,775**
Distância percorrida em um período de 6 minutos (m)	22	327,6±105,6	5	209,2±86,4	0,028*
Uso de corticoterapia	30	16 (53,3)	21	20 (95,2)	0,001**
CK inicial (mg/dl)	28	10529±9377	20	12363±7173	0,467*
Mutação “fora de fase”	28	16 (57,1)	21	18 (85,7)	0,058**
Terminal carboxila – classificação zero	17	10 (58,8)	4	3 (75,0)	1**
Domínio rod – classificação zero	17	7 (41,2)	4	3 (75,0)	0,311**
Terminal amino – classificação zero	17	6 (35,3)	4	2 (50,0)	0,618**
Terminal carboxila/Domínio rod/Terminal amino – classificação zero	17	6 (35,3)	4	2 (50,0)	0,618**
Sobrecarga ventricular esquerda ao ECG	29	11 (37,9)	21	7 (33,3)	0,774**

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo; CK – creatinoquinase; ECG – eletrocardiograma; \*Teste t de Student para amostras independentes; \*\*Teste exato de Fisher.

TABELA 8 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER E FE3D $\geq$ 52% CHC-UFPR 2014-2018

Éxon acometido	SLG $\leq$ -18% (n=30)	SLG $>$ -18% (n=21)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
1-47	-	-	NS
48	2 (6,7)	12 (57,1)	<0,001
49	2 (6,7)	11 (52,4)	0,001
50	1 (3,3)	10 (47,6)	<0,001
51	2 (6,7)	5 (23,8)	0,109
52	0 (0)	5 (23,8)	0,009
53-79	-	-	NS

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo; NS – não significativo; \*Teste exato de Fisher.

Quando avaliado o acometimento de éxons restrito a pacientes com tipo de mutação deleção, observou-se maior frequência de acometimento dos éxons 48 (p=0,001), 49 (p=0,002) e 50 (p=0,006) no grupo com disfunção sistólica precoce do VE. Ajustando-se à idade, o acometimento dos éxons 48 (OR 14,7; IC95% 2,86-75,7; p=0,001), 49 (OR 11,6; IC95% 2,31-58,5; p=0,002) e 50 (OR 8,73; IC95% 1,79-42,6; p=0,006) permaneceram significativamente associado à disfunção sistólica precoce do VE.

Quando avaliados o acometimento de pelo menos um éxon dentro da região de “*hot spot*”, o acometimento de mais de um éxon dentro da região de “*hot spot*” e o acometimento de um éxon *versus* mais de um éxon independente da localização, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

#### 4.6 ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO, RESTRITA A PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Todos os pacientes com DMD que realizaram o ETT e que tinham FEVE  $\geq 52\%$  ao método tridimensional (40 pacientes) foram incluídos nessa análise. Vinte pacientes foram alocados no grupo com função sistólica do VE preservada ( $SLG \leq -18\%$ ) e 20 pacientes foram alocados no grupo com disfunção sistólica precoce do VE ( $SLG > -18\%$ ). A média da idade dos pacientes foi de  $9,2 \pm 3,7$  anos no grupo com função sistólica do VE preservada e de  $12,2 \pm 3,7$  anos no grupo com disfunção sistólica precoce do VE; enquanto a média da FEVE foi de  $64,4 \pm 4,7\%$  e de  $62,2 \pm 6,3\%$ , e a média do SLG foi de  $-19,7 \pm 1,0\%$  e de  $-15,6 \pm 1,6\%$ , respectivamente.

Observou-se maior tempo de duração da doença e maior frequência de uso de corticoterapia no grupo com disfunção sistólica precoce do VE ( $FE3D \geq 52\%$  e  $SLG > -18\%$ ). Observou-se perda da deambulação mais tardia e menor distância percorrida em um período de 6 minutos no grupo com disfunção sistólica precoce do VE, porém, sem diferença estatisticamente significativa (TABELA 9). O acometimento dos éxons 45, 46, 47, 48, 49, 50 e 52 foi mais frequente no grupo com disfunção sistólica precoce do VE (TABELA 10; ANEXO 5). Ajustando-se à idade, o acometimento do éxon 50 (OR 36,1; IC95% 2,15-604,0;  $p=0,010$ ) permaneceu significativamente associado à disfunção sistólica precoce do VE, enquanto o acometimento do éxon 45 perdeu significância estatística (OR 9,6; IC95% 0,90-102,8;  $p=0,053$ ). Para as demais variáveis com  $p < 0,05$  na análise univariada, não foi possível o ajuste do modelo bivariado.

TABELA 9 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E FE3D≥52% CHC-UFPR 2014-2018

Variáveis	SLG≤-18%		SLG>-18%		Valor de p
	n	Média±DP ou n (%)	n	Média±DP ou n (%)	
Tempo de duração da doença (anos)	20	5,5±3,2	19	8,5±3,9	0,003*
Idade da perda da deambulação (anos)	7	8,3±1,5	15	9,9±1,8	0,062*
Atraso na aquisição da marcha	20	9 (45,0)	20	10 (50,0)	1**
Distância percorrida em um período de 6 minutos (m)	13	275,7±66,1	5	209,2±86,4	0,097*
Uso de corticoterapia	20	11 (55,0)	20	20 (100,0)	0,001**
CK inicial (mg/dl)	18	11272±6669	19	12984±6794	0,445*
Mutação “fora de fase”	18	15 (83,3)	20	18 (90,0)	0,652**
Terminal carboxila – classificação zero	11	10 (90,9)	4	3 (75,0)	0,476**
Domínio rod – classificação zero	11	7 (63,6)	4	3 (75,0)	1**
Terminal amino – classificação zero	11	6 (54,5)	4	2 (50,0)	1**
Terminal carboxila/Domínio rod/Terminal amino – classificação zero	11	6 (54,5)	4	2 (50,0)	1**
Sobrecarga ventricular esquerda ao ECG	19	7 (36,8)	20	7 (35,0)	1**

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo; CK – creatinoquinase; ECG – eletrocardiograma; \*Teste t de Student para amostras independentes; \*\*Teste exato de Fisher.

TABELA 10 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E FE3D $\geq$ 52% CHC-UFPR 2014-2018

Éxon acometido	SLG $\leq$ -18% (n=20)	SLG $>$ -18% (n=20)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
1-44	-	-	NS
45	1 (5)	7 (35)	0,044
46	0 (0)	8 (40)	0,003
47	0 (0)	8 (40)	0,003
48	0 (0)	12 (60)	<0,001
49	0 (0)	11 (55)	<0,001
50	1 (5)	10 (50)	0,003
51	2 (10)	5 (25)	0,408
52	0 (0)	5 (25)	0,047
53-79	-	-	NS

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo; \*Teste exato de Fisher.

Quando avaliado o acometimento de éxons restrito a pacientes com tipo de mutação deleção, observou-se maior frequência de acometimento dos éxons 46 (p=0,023), 47 (p=0,023), 48 (p=0,001), 49 (p=0,002) e 50 (p=0,036) no grupo com disfunção sistólica precoce do VE; e maior frequência de acometimento do éxon 11 (p=0,032) no grupo com função sistólica do VE preservada (FE3D  $\geq$  52% e SLG  $\leq$  -18%). Ajustando-se à idade, o acometimento do éxon 50 (OR 17,7; IC95% 1,00-363,6; p=0,049) permaneceu significativamente associado à disfunção sistólica precoce do VE. Para os demais éxons com p<0,05 na análise univariada, não foi possível o ajuste do modelo bivariado.

A deleção de mais de um éxon dentro da região de “*hot spot*” foi mais frequente no grupo com disfunção sistólica precoce do VE (p=0,022). Quando



avaliada a deleção de pelo menos um éxon dentro da região de “*hot spot*” e a deleção de mais de um éxon independente da localização, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

#### 4.7 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DOS VOLUMES E PARA O CÁLCULO DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO

##### 4.7.1 Correlação entre os dois métodos

A correlação entre os métodos tridimensional e bidimensional para a mensuração do VDVE e do VSVE foi muito forte (GRÁFICO 11; GRÁFICO 12), sendo que os coeficientes de correlação foram, respectivamente, de 0,94 e 0,90 ( $p < 0,001$ ) (TABELA 11). A correlação entre os métodos tridimensional e bidimensional para o cálculo da FEVE foi moderada (GRÁFICO 13). O coeficiente de correlação foi de 0,55 ( $p < 0,001$ ) (TABELA 11).

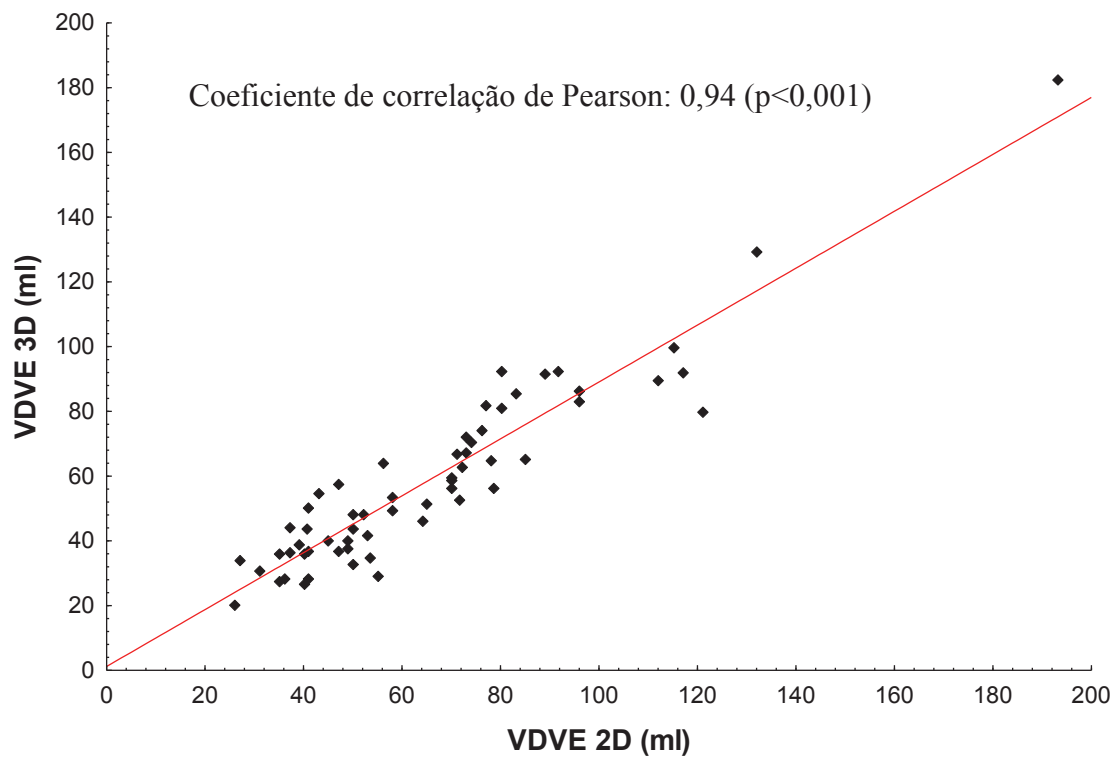
TABELA 11 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL E A TRIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DOS VOLUMES E PARA O CÁLCULO DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018

Variáveis (n=60)	Coefficientes de correlação	Valor de p
VDVE 2D X VDVE 3D	0,94*	<0,001
VSVE 2D X VSVE 3D	0,90**	<0,001
FEVE 2D X FEVE 3D	0,55**	<0,001

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: VDVE – volume diastólico do ventrículo esquerdo; VSVE – volume sistólico do ventrículo esquerdo; FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo; 2D – método bidimensional; 3D – método tridimensional; \*Coeficiente de correlação de Pearson; \*\*Coeficiente de correlação de Spearman.

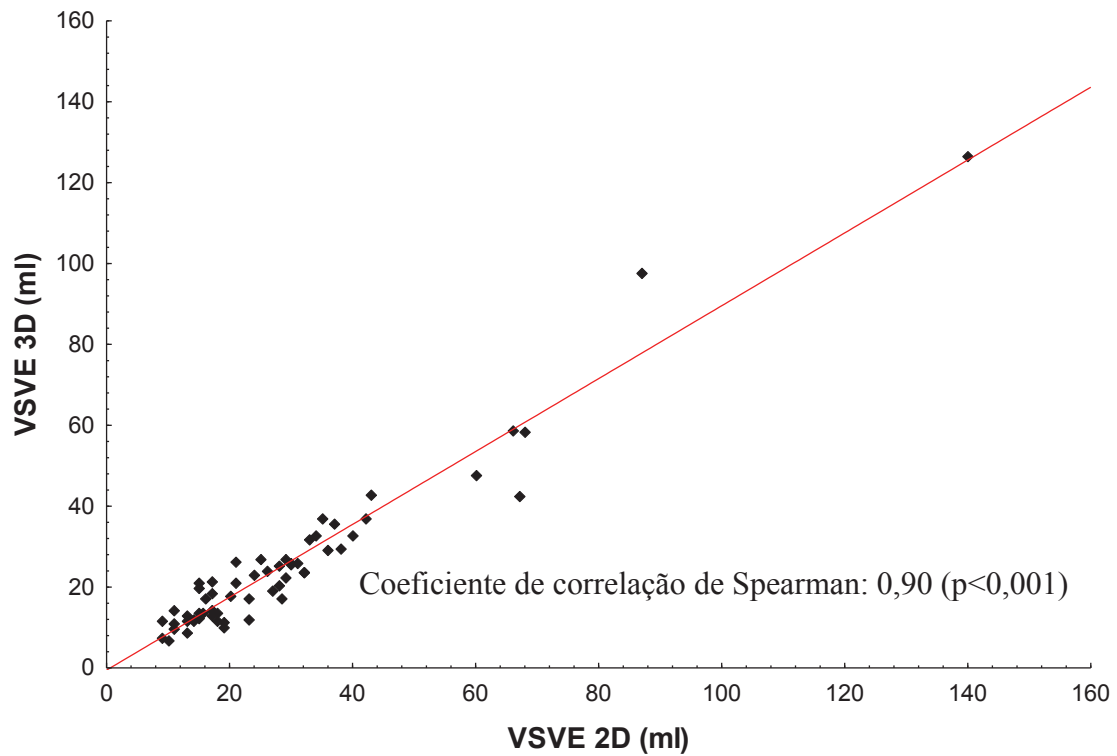
GRÁFICO 11 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DO VOLUME DIASTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: VDVE – volume diastólico do ventrículo esquerdo; 2D – método bidimensional; 3D – método tridimensional.

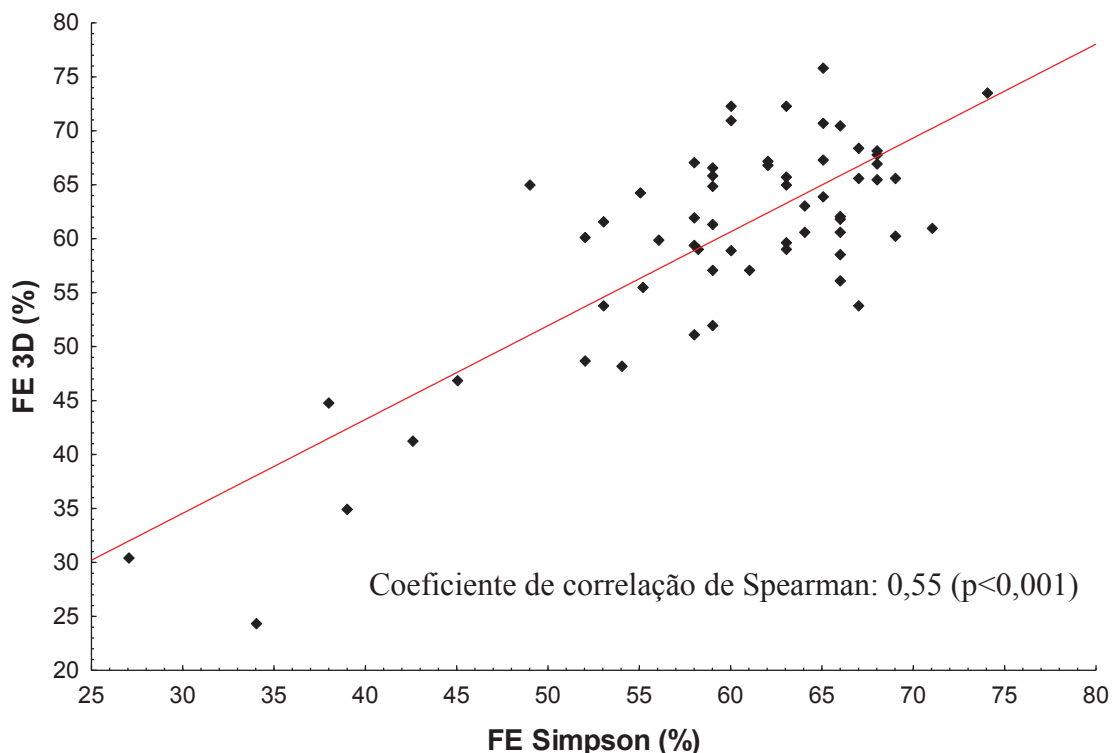
GRÁFICO 12 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DO VOLUME SISTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: VSVE – volume sistólico do ventrículo esquerdo; 2D – método bidimensional; 3D – método tridimensional.

GRÁFICO 13 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA O CÁLCULO DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: FE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo; 3D – método tridimensional.

#### 4.7.2 Comparação entre os dois métodos

A média do VDVE ao método bidimensional foi de  $65,6 \pm 29,9$  ml e ao método tridimensional foi de  $58,8 \pm 28,0$  ml ( $p < 0,001$ ). A mediana do VSVE ao método bidimensional foi de 23,0 (9,0-140,0) ml e ao método tridimensional foi de 20,8 ml (6,7-126,7) ( $p < 0,001$ ) (TABELA 12). Em comparação com a ecocardiografia bidimensional, o método tridimensional apresentou menores VDVE e VSVE. A mediana da FEVE ao método bidimensional foi de 59,5% (27,0-74,0) e ao método tridimensional foi de 60,2% (24,4-75,9) ( $p = 0,468$ ) (TABELA 12).

TABELA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA DOS VOLUMES E PARA O CÁLCULO DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018

Variável (n=60)	Método	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
VDVE (ml)	2D	65,6	58,0	26,0	193,0	29,9	
	3D	58,8	53,2	20,2	182,4	28,0	<0,001*
VSVE (ml)	2D	28,5	23,0	9,0	140,0	21,7	
	3D	25,2	20,8	6,7	126,7	20,2	<0,001**
FE (%)	2D	59,5	61,5	27,0	74,0	9,2	
	3D	60,2	61,8	24,4	75,9	10,0	0,468**

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: VDVE – volume diastólico do ventrículo esquerdo; VSVE – volume sistólico do ventrículo esquerdo; FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo; 2D – método bidimensional; 3D – método tridimensional; \*Teste t de Student para amostras pareadas; \*\*Teste não paramétrico de Wilcoxon.

#### 4.7.3 Concordância entre os dois métodos

A concordância entre os métodos tridimensional e bidimensional para a detecção de VDVE aumentado e para a detecção de VSVE aumentado foi muito forte, sendo que o coeficiente de concordância de Kappa foi de 0,88 (IC95% 0,65-1) e de 0,84 (IC95% 0,62-1), respectivamente. A concordância entre os dois métodos para a detecção de fração de ejeção do VE reduzida foi forte, sendo que o coeficiente de concordância de Kappa foi de 0,71 (IC95% 0,44-0,98). Não houve diferença significativa entre os dois métodos para a detecção de VDVE aumentado ( $p=1,000$ ), de VSVE aumentado ( $p=0,500$ ) e de disfunção sistólica do VE ( $p=0,625$ ).

#### 4.8 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO

##### 4.8.1 Correlação entre os dois métodos

A correlação entre os métodos tridimensional e bidimensional para a mensuração do volume do AE foi forte. O coeficiente de correlação foi de 0,87 ( $p<0,001$ ) (TABELA 13; GRÁFICO 14).

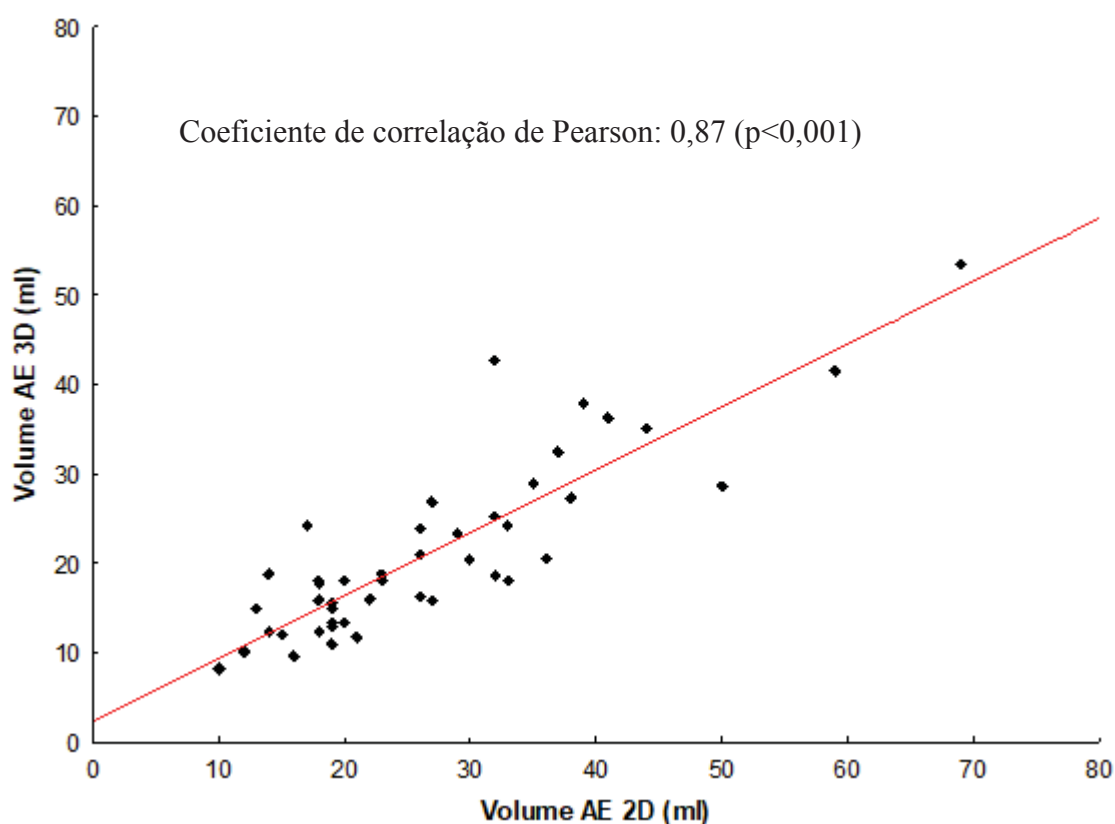
TABELA 13 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL E A TRIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018

Variáveis (n=46)	Coefficiente de correlação de Pearson	Valor de p
Volume AE 2D X Volume AE 3D	0,87	<0,001

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: AE – átrio esquerdo; 2D – método bidimensional; 3D – método tridimensional.

GRÁFICO 14 – CORRELAÇÃO ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL E A BIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO DO VOLUME DO ÁTRIO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: AE – átrio esquerdo; 2D – método bidimensional; 3D – método tridimensional.

#### 4.8.2 Comparação entre os dois métodos

A média do volume do AE ao método bidimensional foi de  $26,6 \pm 12,3$  ml e ao método tridimensional foi de  $21,0 \pm 9,9$  ml ( $p < 0,001$ ) (TABELA 14). Em comparação com a ecocardiografia bidimensional, o método tridimensional apresentou menor volume do AE.

TABELA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL PARA A MENSURAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA DO VOLUME ATRIAL ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2018

Variável (n=46)	Método	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
Volume AE (ml)	2D	26,6	23,0	10,0	69,0	12,3	
	3D	21,0	18,1	8,2	53,4	9,9	<0,001*

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: AE – átrio esquerdo; 2D – método bidimensional; 3D – método tridimensional;  
\*Teste t de Student para amostras pareadas.

#### 4.8.3 Concordância entre os dois métodos

A concordância entre os métodos bidimensional e tridimensional para a detecção de volume do AE aumentado foi moderada, sendo que o coeficiente de concordância de Kappa foi de 0,49 (IC95% 0-1). Não houve diferença significativa entre os dois métodos para a detecção de volume do AE aumentado ( $p=0,500$ ).





## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

No nosso estudo, a média de idade dos pacientes com DMD foi de aproximadamente 12 anos, semelhante àquela encontrada no estudo de Taqatqa e colaboradores, que compararam o *strain* miocárdico ecocardiográfico do ventrículo esquerdo avaliado pela técnica de *speckle tracking*, incluindo a medida do *strain* longitudinal global, entre pacientes com DMD e crianças saudáveis (TAQATQA *et al.*, 2016). Outros dois estudos, que utilizaram técnicas diferentes para a avaliação do *strain* miocárdico ecocardiográfico, também apresentaram médias de idade semelhantes à observada no nosso estudo (OGATA *et al.*, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2013).

No estudo de Taqatqa *et al* citado acima, aproximadamente um terço dos pacientes com DMD já haviam perdido a deambulação, achado semelhante àquele observado no nosso estudo (TAQATQA *et al.*, 2016). Poucos pacientes com DMB estavam restritos à cadeira de rodas na nossa amostra, possivelmente porque esses pacientes não estavam em uma fase avançada da doença, uma vez que a média de idade desse subgrupo foi de aproximadamente 18 anos. Isso ocorre pois na DMB há uma evolução mais lenta da fraqueza muscular quando comparada à DMD (HERMANS *et al.*, 2010).

A frequência das mutações no gene *DMD* foi semelhante àquela relatada na literatura europeia, mostrando 46 (70,0%) deleções, 4 (6,0%) duplicações e 14 (21,0%) pequenas mutações (AARTSMA-RUS *et al.*, 2016). Nossos resultados diferem daqueles encontrados por De Almeida e colaboradores, que avaliaram os tipos de mutação no gene *DMD* em pacientes brasileiros com DMD e DMB e identificaram uma menor porcentagem de deleções, uma porcentagem semelhante de duplicações e uma maior porcentagem de pequenas mutações (DE ALMEIDA *et al.*, 2017). Esta diferença pode ser explicada pela grande variedade étnica presente no nosso

país, uma vez que foram encontradas mais mutações *nonsense* (um tipo de pequena mutação) em pacientes da região Nordeste do Brasil, que apresenta descendência predominantemente africana (DE ALMEIDA *et al.*, 2017). Nós avaliamos pacientes da região Sul do Brasil, com descendência predominantemente europeia, encontrando, portanto, uma distribuição dos tipos de mutação no gene *DMD* semelhante àquela descrita em estudos europeus (AARTSMA-RUS *et al.*, 2016). Não foram detectadas mutações no gene *DMD* em dois pacientes (3,0%), provavelmente devido ao fato de que o MLPA e o sequenciamento do gene *DMD* não conseguem detectar todos os tipos de mutação, como, por exemplo, as mutações intrônicas profundas (AARTSMA-RUS *et al.*, 2016). Como esperado, os éxons mais comumente afetados estavam dentro da região de "hot spot" do gene *DMD*, entre os éxons 45 e 55 (AARTSMA-RUS *et al.*, 2016; DE ALMEIDA *et al.*, 2017; ZHONG *et al.*, 2016).

A imunomarcção da distrofina revelou uma predominância de ausência de expressão da distrofina nos pacientes com DMD e de redução difusa na maioria das fibras nos pacientes com DMB, o que é compatível com os achados imunohistoquímicos utilizados para o diagnóstico de DMD e de DMB, respectivamente (FREUND *et al.*, 2007; WERNECK *et al.*, 1992).

A maioria dos pacientes da nossa amostra estava usando ou havia usado corticosteroides. No estudo de Taqatqa e colaboradores aproximadamente 50% dos pacientes com DMD estavam em uso de corticoterapia (TAQATQA *et al.*, 2016). Apesar de estudos anteriores já terem mostrado a importância do IECA ou BRA-II e dos betabloqueadores na prevenção da DSVE (DUBOC *et al.*, 2005) e no tratamento da DSVE já estabelecida (FEVE reduzida) (JEFFERIES *et al.*, 2005; OGATA *et al.*, 2009; VIOLLET *et al.*, 2012), poucos dos nossos pacientes estavam em uso dessas medicações para prevenção e/ou tratamento da DSVE e da insuficiência cardíaca.

Como já reconhecido na literatura, os pacientes do nosso estudo apresentaram-se oligossintomáticos do ponto de vista cardíaco e com poucas

alterações ao exame físico cardiovascular, mesmo aqueles com fração de ejeção do VE reduzida (D'AMARIO *et al.*, 2017). Em relação ao ECG, a presença de onda R maior do que onda S em V1 foi o achado mais frequente, semelhante ao estudo de Galvão e colaboradores (GALVÃO *et al.*, 1984). Sobrecarga ventricular esquerda também foi um achado eletrocardiográfico frequente na nossa população, o que corrobora o estudo de James *et al.*, que demonstrou que as alterações eletrocardiográficas mais frequentes nos pacientes com DMD são aquelas referentes à doença do ventrículo esquerdo (JAMES *et al.*, 2011). Taquicardia sinusal, intervalo PR curto e sobrecarga ventricular direita foram menos frequentes nos nossos pacientes, apesar de outros estudos terem demonstrado uma maior frequência dessas alterações nos pacientes com DMD (D'AMARIO *et al.*, 2017; THRUSH *et al.*, 2009).

## 5.2 ALTERAÇÕES ECOCARDIOGRÁFICAS

A qualidade das imagens ecocardiográficas é importante para a realização do ETT, seja pelo método bidimensional como pelo método tridimensional (LANG *et al.*, 2015). Quatro pacientes não foram incluídos no estudo devido à “janela” ecocardiográfica inadequada, uma porcentagem muito menor em comparação com outro estudo de pacientes com DMD, no qual não foi possível calcular a FEVE pelo método bidimensional em 76,5% dos pacientes (TSUBURAYA *et al.*, 2014). Neste estudo de Tsuburaya e colaboradores, os pacientes apresentavam uma maior média de idade e, provavelmente, estavam em um estágio mais avançado da doença, com deformidades torácicas mais proeminentes. O mesmo estudo demonstrou que a ecocardiografia tridimensional é útil em pacientes com DMD e “janela” ecocardiográfica subótima (TSUBURAYA *et al.*, 2014). Por outro lado, no nosso estudo, a presença de uma “janela” ecocardiográfica inadequada tornou impossível a correta avaliação das imagens por ambos os métodos, bidimensional e tridimensional. Esses resultados divergentes podem estar relacionados à plataforma usada para a realização do exame ou às características da população estudada.

Comparando os achados ecocardiográficos entre os pacientes com DMD e aqueles com DMB, observou-se maiores espessura da parede e dimensões do VE e do AE nos pacientes com DMB, mesmo quando corrigidas para a área de superfície corporal. Em parte, essa diferença reflete a maior média de idade dos pacientes com DMB na nossa amostra, uma vez que a espessura da parede e o tamanho do VE aumentam com a idade na primeira e na segunda décadas de vida (BUCCHERI *et al.*, 2015). Além disso, um estudo que comparou pacientes com DMD e DMB, que tinham idades semelhantes e que já apresentavam cardiomiopatia estabelecida, mostrou maiores dimensões diastólica e sistólica do VE nos pacientes com DMB (CONNUCK *et al.*, 2008). Os demais parâmetros avaliados, incluindo encurtamento percentual do VE, fração de ejeção do VE, *strain* longitudinal do VE e análise do fluxo de entrada mitral e da velocidade anular mitral, não foram diferentes entre os dois grupos, já que esses parâmetros, que refletem primordialmente as funções sistólica e diastólica do VE, não se alteram significativamente com a idade na segunda década de vida (CHOI *et al.*, 2016). O estudo de Connuck e colaboradores também não encontrou diferença no encurtamento percentual do VE, uma medida da função sistólica do VE, entre os pacientes com DMD e DMB (CONNUCK *et al.*, 2008).

No nosso estudo, dos 51 meninos com FEVE preservada, 41% apresentaram disfunção sistólica precoce do VE (SLG > -18%). Nos pacientes com DMD, detectou-se disfunção sistólica precoce do VE em 50% dos casos, enquanto nos pacientes com DMB, apenas 9,1% apresentaram esse diagnóstico. Outros estudos demonstraram resultados semelhantes, mostrando que a análise do *strain* miocárdico ecocardiográfico pode ser utilizada para detectar disfunção sistólica precoce do VE em pacientes com DMD (TAQATQA *et al.*, 2016; OGATA *et al.*, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2013). Taqatqa e colaboradores utilizaram a técnica de *speckle tracking* para a análise do *strain* miocárdico e demonstraram que os pacientes com DMD, em comparação com crianças saudáveis, apresentam menores valores absolutos do *strain* longitudinal do VE e do *strain* circunferencial do VE (TAQATQA *et al.*, 2016). Diferentemente do estudo de Taqatqa *et al* e do nosso estudo, Yamamoto *et al* e Ogata *et al* utilizaram o Doppler tecidual, e não a técnica de *speckle tracking*,

para a análise do strain miocárdico do VE (OGATA *et al.*, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2013). Em comparação com o estudo de Taqatqa *et al.*, que se assemelhou mais ao nosso estudo por utilizar o mesmo aparelho, o mesmo software e a mesma técnica para a medida do SLG (TAQATQA *et al.*, 2016), o nosso estudo incluiu um maior número de pacientes, seja com DMD ou com DMB, e demonstrou não apenas que esses pacientes apresentam menores valores absolutos do SLG em relação às crianças saudáveis, mas que uma grande parte deles se beneficia dessa técnica para a detecção precoce de DSVE.

Não existem estudos que avaliaram a análise do *strain* miocárdico ecocardiográfico na DMB, porém, no nosso estudo, dentre esses pacientes houve apenas um caso de disfunção sistólica precoce do VE. Possíveis justificativas para esse achado são: (1) os pacientes com DMB incluídos no nosso estudo eram relativamente jovens considerando a evolução natural da DMB e, portanto, estavam em uma fase mais inicial da doença (HERMANS *et al.*, 2010); (2) os pacientes com DMB poderiam ter uma menor chance de desenvolver cardiomiopatia em relação aos pacientes com DMD. No entanto, essas hipóteses parecem pouco prováveis, uma vez que, no nosso estudo, uma porcentagem maior de pacientes com DMB apresentaram disfunção sistólica franca do VE. Logo, a real utilidade da análise do *strain* miocárdico nos pacientes com DMB permanece incerta, mas como este é um método que vem se estabelecendo no contexto de diversas outras cardiopatias (BARBOSA *et al.*, 2014; BERTINI *et al.*, 2012; JO *et al.*, 2016; JOYCE *et al.*, 2015; KAMPERIDIS *et al.*, 2016; KRAMANN *et al.*, 2014; MIYAZAKI *et al.*, 2011; MARCUS *et al.*, 2011; REANT *et al.*, 2016; TAQATQA *et al.*, 2016; THAVENDIRANATHAN *et al.*, 2014), é de se esperar que também haja benefício em algum subgrupo de pacientes com DMB, todavia ainda não há evidência suficiente na literatura para afirmarmos esse benefício.

Apesar de ainda não haver estudos mostrando o benefício das medicações utilizadas no tratamento da insuficiência cardíaca, incluindo IECA, BRA-II e betabloqueadores, nos pacientes com disfunção sistólica precoce do VE (FEVE preservada e SLG alterado), a perspectiva de diagnóstico precoce da DSVE por meio da análise do *strain* miocárdico poderá permitir a realização

de novos estudos e, possivelmente, uma mudança na indicação dessas medicações, que deverão fazer parte do arsenal terapêutico inicial nesse subgrupo de pacientes (FAYSSOIL *et al.*, 2017).

O aumento do índice de volume do AE, uma medida reprodutível do volume atrial esquerdo em crianças (TAGGART *et al.*, 2010), foi detectado em um pequeno número de pacientes com DMD. A baixa frequência de aumento do volume atrial esquerdo em pacientes com DMD pode estar relacionada à predominância de disfunção sistólica em relação à disfunção diastólica do VE, o que já foi demonstrado em outros estudos (TAKENAKA *et al.*, 1993). Outro achado que reforça essa hipótese é a baixa frequência de aumento das pressões de enchimento do VE no nosso estudo. Esses resultados também podem estar relacionados às características da nossa população, que era mais jovem e não apresentava, na sua maior parte, doença avançada.

### 5.3 ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO

Quando analisados os fatores associados à DSVE avaliada pela ecocardiografia tridimensional, apenas o tempo de duração da doença esteve associado ao grupo com DSVE. Esse resultado já era esperado, uma vez que a idade do paciente é um fator classicamente associado ao desenvolvimento de cardiomiopatia nessa população (SPURNEY *et al.*, 2014). Observou-se também, restrito a pacientes com mutação do tipo deleção, uma maior frequência de acometimento dos éxons 46 e 47 no grupo sem DSVE, o que diverge dos resultados encontrados na análise dos fatores associados à disfunção sistólica precoce do VE, comentada a seguir. Essa divergência pode ter ocorrido devido ao fato de que os nossos pacientes apresentavam uma menor média de idade e havia poucos pacientes com DSVE na nossa amostra. O reduzido número de pacientes no grupo com DSVE pode ter prejudicado também a análise das outras variáveis estudadas. Logo, os principais achados em relação ao estudo dos fatores associados à disfunção sistólica do VE foram encontrados no estudo dos fatores associados à disfunção sistólica precoce do VE, já que esse grupo apresentava um maior número de pacientes com DSVE

para a análise. Outro dado importante a ser comentado é o pequeno número de pacientes com DMB, o que faz com que os resultados se apliquem principalmente, mas não exclusivamente, aos pacientes com DMD, uma vez que esses pacientes compuseram a maior parte da amostra, em especial na análise dos fatores associados à disfunção sistólica precoce do VE, a qual esteve presente em apenas um paciente com DMB. Portanto, os resultados discutidos a seguir se referem principalmente ao estudo dos fatores associados à disfunção sistólica precoce do VE nos pacientes com DMD.

O grupo com disfunção sistólica precoce do VE apresentou maior idade e duração mais longa da doença, o que corrobora os achados de Spurney e colaboradores, os quais demonstraram que o desenvolvimento de cardiomiopatia nos pacientes com DMD está associado à idade do paciente e ao estágio clínico da doença (SPURNEY *et al.*, 2014).

Curiosamente, uma maior frequência de uso de corticosteróides esteve associada com disfunção sistólica precoce do VE. Além disso, o tempo de uso de corticosteróides foi maior nos pacientes com disfunção sistólica precoce do VE do que naqueles com função sistólica do VE preservada, porém, como os pacientes com disfunção sistólica precoce do VE eram mais velhos, esses resultados podem refletir a diferença de idade entre os dois grupos. Um estudo experimental demonstrou que o uso excessivo de corticosteróides pode induzir alterações fisiopatológicas do miocárdio e remodelamento cardíaco por meio da via de sinalização da angiotensina-II (ROY *et al.*, 2009). De *et al* mostraram que a dexametasona pode induzir disfunção cardíaca através do comprometimento da cinética do cálcio (DE *et al.*, 2011). Janssen e colaboradores demonstraram que a prednisolona pode atenuar a melhora da função cardíaca de camundongos que tomam lisinopril, um IECA, e espironolactona, um antagonista da aldosterona (JANSSEN *et al.*, 2014). No entanto, outros estudos e uma diretriz recente da Academia Americana de Neurologia afirmam que o uso de prednisona ou deflazacort está associado a um início mais tardio da cardiomiopatia (BIGGAR *et al.*, 2006; BUSHBY *et al.*, 2010a; GLOSS *et al.*, 2016; KOEKS *et al.*, 2017; MARKHAM *et al.*, 2008; MATTHEWS *et al.*, 2016; SCHRAM *et al.*, 2013). Devido a esses resultados



conflitantes e ao fato de não ter sido possível realizar uma análise multivariada no nosso estudo, podendo haver vies de confusão, sugerimos manter o uso dos corticosteroides quando indicado, atentar ao uso adequado dessas medicações e considerar um rastreio precoce para cardiomiopatia nesses pacientes.

Algumas mutações no gene *DMD* foram associadas a diferentes idades de início, gravidade e grau de progressão da cardiomiopatia. No entanto, essas associações não foram completamente compreendidas (ASHWATH *et al.*, 2014; AARTSMA-RUS *et al.*, 2016; TSUDA *et al.*, 2015; BARP *et al.*, 2015). No nosso estudo, encontramos uma maior frequência de envolvimento dos éxons 46, 47, 48, 49, 50 e 52 do gene *DMD* nos pacientes com disfunção sistólica precoce do VE. Além disso, a deleção de múltiplos éxons dentro da região de "hot spot" associada à ausência de deleção fora da região de "hot spot" foi mais frequente nesses pacientes. Esses achados sugerem uma possível associação entre esses locais de mutação e disfunção sistólica precoce do VE. Um estudo demonstrou uma possível associação entre mutações nos éxons 12, 14 a 17 e 31 a 42 e o desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada, enquanto mutações nos éxons 51 e 52 estiveram associadas a um menor risco de comprometimento cardíaco (JEFFERIES *et al.*, 2005). Kaspar e colaboradores demonstraram que os pacientes com DMB que possuem deleções localizadas entre os éxons 45 e 49 com a região *hinge* 3 preservada e com perda da fase de leitura apresentam início mais precoce da cardiomiopatia do que aqueles com deleções localizadas entre os éxons 50 e 51 com a região *hinge* 3 removida ou alterada e entre os éxons 45 e 49 com a região *hinge* 3 preservada e sem perda da fase de leitura (KASPAR *et al.*, 2009). Em comparação com esses estudos, o nosso estudo encontrou, assim como Kaspar *et al.*, uma possível associação entre mutações na região de "hot spot" do gene *DMD* e disfunção sistólica precoce do VE (KASPAR *et al.*, 2009), porém, nós utilizamos a alteração do *strain* miocárdico como critério diagnóstico para disfunção sistólica precoce do VE e não a detecção mais precoce de uma FEVE reduzida. Não existem estudos que tentaram identificar preditores genéticos para o desenvolvimento de disfunção sistólica precoce do VE diagnosticada por meio da análise do *strain* miocárdico. Esses resultados



podem contribuir para melhorar as estratégias de rastreio da cardiomiopatia nos pacientes com DMD e DMB.

No nosso estudo, não foi encontrada associação entre ausência de distrofina na análise imunohistoquímica e disfunção sistólica do VE. O pequeno número de pacientes submetidos à biópsia muscular e à análise imunohistoquímica pode ter desempenhado um papel nesses resultados. Também não foi identificada nenhuma associação entre SVE e disfunção sistólica do VE no presente estudo, o que corrobora os achados de Thrush e colaboradores, que demonstraram não haver diferenças no padrão eletrocardiográfico de pacientes com DMD com ou sem cardiomiopatia associada (THRUSH *et al.*, 2009).

#### 5.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL E A ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL

No nosso estudo, o VDVE e o VSVE foram menores pelo método tridimensional do que pelo método bidimensional, enquanto a FEVE foi semelhante entre os dois métodos. Aune e colaboradores já haviam demonstrado que o VDVE e o VSVE avaliados pelo método tridimensional eram menores quando comparados com as medidas obtidas pelo método bidimensional (AUNE *et al.*, 2010). Na população pediátrica, um estudo mostrou que o VDVE medido pela ecocardiografia bidimensional e tridimensional é menor quando comparado àquele medido pela ressonância magnética cardíaca, mas o mesmo não foi observado para o VSVE (LU *et al.*, 2008). Esse estudo também demonstrou uma melhor correlação da ecocardiografia tridimensional com a ressonância magnética cardíaca para a realização de medidas do ventrículo esquerdo, no entanto, não comparou diretamente os métodos bidimensional e tridimensional (LU *et al.*, 2008). Os resultados do nosso estudo, referentes aos volumes do VE, são semelhantes àqueles obtidos no estudo de Aune *et al* que, apesar de ter incluído apenas adultos saudáveis, utilizou o mesmo aparelho e o mesmo software para a análise tridimensional. Portanto, apesar de não existirem estudos comparando diretamente os métodos bidimensional e tridimensional na população

pediátrica, no nosso estudo os pacientes com DMD e DMB apresentaram menores volumes do VE quando avaliados pelo método tridimensional. Para a detecção de aumento dos volumes do VE e de disfunção sistólica do VE, os dois métodos foram semelhantes, com bom nível de concordância. Logo, o método bidimensional se mostrou não inferior ao método tridimensional para a detecção de anormalidades no tamanho e na função sistólica do VE nos pacientes com DMD e DMB sendo, portanto, uma boa alternativa para ser utilizada nos laboratórios de ecocardiografia que não dispõem da ecocardiografia tridimensional.

O volume do AE medido pela ecocardiografia tridimensional foi menor quando comparado ao medido pela ecocardiografia bidimensional, o que corrobora os achados de Tanaka e colaboradores (TANAKA *et al.*, 2015). O fato de o plano de corte do AE nas incidências apicais de quatro e de duas câmaras estar mais próximo do maior eixo do AE poderia ser uma causa para os maiores volumes encontrados na ecocardiografia bidimensional (TANAKA *et al.*, 2015). Para a detecção de aumento do volume do AE, os dois métodos foram semelhantes, com moderado nível de concordância. Portanto, também para a detecção de anormalidades no tamanho do AE, o método bidimensional torna-se uma boa alternativa na avaliação dos pacientes com DMD e DMB.

## 5.5 LIMITAÇÕES

Este estudo tem algumas limitações. Primeiro, o pequeno número de pacientes com DMB pode influenciar a interpretação dos resultados para esse subgrupo, portanto, deve-se ter cautela ao generalizar os resultados deste estudo para todos os pacientes portadores de distrofinopatias. Em segundo lugar, os pacientes foram recrutados em um único centro, um hospital de alta complexidade; no entanto, é um centro de referência para o tratamento de doenças neuromusculares, e os pacientes são referenciados de todo o estado, bem como de outras regiões do país.

A variabilidade dos valores normais do SLG é ampla. O valor de corte de -18% nos pareceu apropriado porque foi derivado de estudos prévios que

incluiram crianças saudáveis e que representavam os grupos etários dos pacientes incluídos no nosso estudo (JASHARI *et al.*, 2015; LEVY *et al.*, 2016; LABOMBARDA *et al.*, 2014; PATRIANAKOS *et al.*, 2015).

Este foi um estudo transversal e, portanto, foi capaz apenas de sugerir uma relação de causa e efeito entre as variáveis, embora algumas variáveis, como as mutações genéticas, representem características inatas desses pacientes. Não foi possível realizar uma análise multivariada, incluindo idade do paciente, tempo de duração da doença, uso de corticosteróides e éxons afetados, porque o tamanho da amostra era pequeno e a frequência de algumas variáveis era nula nos grupos comparados. No entanto, quando possível, foram ajustados modelos bivariados com a idade, um fator comprovadamente associado com o desenvolvimento de cardiomiopatia nessa população (SPURNEY *et al.*, 2014).

## 5.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados deste estudo sugerem que metade dos pacientes com DMD poderiam se beneficiar da análise ecocardiográfica do *strain* miocárdico para o diagnóstico de disfunção sistólica precoce do VE. A importância da detecção precoce de disfunção sistólica do VE reside no fato de que o início precoce de tratamento específico poderia prevenir a progressão da cardiomiopatia e, eventualmente, melhorar a função cardíaca e prevenir complicações graves, como a morte súbita, que é cada vez mais frequente nessa população (ASHWATH *et al.*, 2014; JO *et al.*, 2016; FAYSSOIL *et al.*, 2017; JEFFERIES *et al.*, 2005). Estudos adicionais são necessários para confirmar esses achados e para estabelecer seu impacto no manejo clínico desses pacientes.

Neste estudo, nós avaliamos os preditores de disfunção sistólica precoce do VE. Não existem estudos que fizeram essa avaliação, especialmente utilizando a técnica de *speckle tracking* para medir o *strain* miocárdico ecocardiográfico. Quanto a essa análise, tempo de duração da doença, uso de corticosteróides e mutações específicas no gene da distrofina

foram identificados como possíveis preditores de disfunção sistólica precoce do VE. Esses resultados podem contribuir para melhorar as estratégias de rastreio da cardiomiopatia nos pacientes com DMD.

A partir deste trabalho, novos estudos poderão ser desenvolvidos para esclarecer algumas questões ainda sem resposta: (1) Iniciar o uso de drogas específicas para o tratamento da insuficiência cardíaca nos pacientes com disfunção sistólica precoce do VE é capaz de retardar a progressão e reduzir a morbimortalidade da cardiomiopatia nos pacientes com DMD e DMB? (2) Existe um momento ideal para iniciar o rastreio de disfunção sistólica precoce nessa população? (3) Esse rastreio deve ser o mesmo para todos os pacientes ou devemos individualizar baseado no tipo e localização da mutação?

## 5.7 CONCLUSÕES

1. A análise do *strain* miocárdico ecocardiográfico é uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo nos pacientes com DMD.
2. Os fatores associados à disfunção sistólica precoce do VE nos pacientes com DMD e DMB são:
  - a. Maior tempo de duração da doença.
  - b. Uso de corticosteróides.
  - c. Mutações na região de “*hot spot*” do gene *DMD*
3. Os resultados deste estudo mostram que:
  - a. Os volumes diastólico e sistólico do VE e o volume do AE são menores com o método tridimensional quando comparados aos medidos pela ecocardiografia bidimensional nos pacientes com DMD e DMB.
  - b. A FEVE é semelhante entre os métodos tridimensional e bidimensional nos pacientes com DMD e DMB.
  - c. A correlação entre os métodos tridimensional e bidimensional é muito forte para a mensuração dos volumes diastólico e sistólico do VE, forte para a mensuração do volume do AE e moderada para o cálculo da fração de ejeção do VE nos pacientes com DMD e DMB.
  - d. A concordância entre os métodos tridimensional e bidimensional é muito forte para a detecção de volumes diastólico e sistólico do VE aumentados, forte para a detecção de fração de ejeção do VE reduzida e moderada para a detecção de volume do AE aumentado nos pacientes com DMD e DMB.



## REFERÊNCIAS

- AARTSMA-RUS, A. *et al.* Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. **Muscle Nerve**, v. 34, n. 2, p. 135-144, 2006.
- AARTSMA-RUS, A.; GINJAAR, I. B.; BUSHBY, K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. **J Med Genet**, v. 53, n. 3, p. 145-151, 2016.
- ABDUCH, M. C. D. *et al.* Estudo da mecânica cardíaca pelo *Speckle Tracking* – Cardiac Mechanics Evaluated by Speckle Tracking Echocardiography. **Arq Bras Cardiol**, v. 102, n. 4, p. 403-412, 2014.
- ARAUJO, A. P. Q. C. *et al.* Brazilian consensus on Duchenne muscular dystrophy. Part 1: diagnosis, steroid therapy and perspectives. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 75, n. 8, p. 104-113, 2017.
- ARMSTRONG, W. F.; RYAN T. Avaliação da Função Diastólica Ventricular Esquerda. In: ARMSTRONG, W. F.; RYAN T. **Feigenbaum Ecocardiografia, Sétima Edição**. Tradução de: Lélis Borges do Couto. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 157-181.
- ARMSTRONG, W. F.; RYAN T. Avaliação da Função Sistólica do Ventrículo Esquerdo. In: ARMSTRONG, W. F.; RYAN T. **Feigenbaum Ecocardiografia, Sétima Edição**. Tradução de: Lélis Borges do Couto. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 122-156.
- ASHWATH, M. L. *et al.* Left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy and genotype. **Am J Cardiol**, v. 114, n. 2, p. 284-289, 2014.
- AUNE, E. *et al.* Reference values for left ventricular volumes with real-time 3-dimensional echocardiography. **Scand Cardiovasc J**, v. 44, n. 1, p. 24-30, 2010.
- BARBOSA, M. M. *et al.* Early detection of left ventricular contractility abnormalities by two-dimensional speckle tracking strain in Chagas' disease. **Echocardiography**, v. 31, n. 5, p. 623-630, 2014.
- BARP, A. *et al.* Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.
- BERTINI, M. *et al.* Global longitudinal strain predicts long-term survival in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. **Circ Cardiovasc Imaging**, v. 5, n. 3, p. 383-391, 2012.

BICKLEY, L. S. Sistema Cardiovascular. In: BICKLEY, L. S.; SZILAGYI, P. G. **Bates Propedêutica Médica, Oitava Edição**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 264-266.

BIGGAR, W. D. *et al.* Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. **Neuromuscul Disord**, v. 16, n. 4, p. 249-255, 2006.

BIRNKRANT, D. J.; ARARAT, E.; MHANNA, M. J. Cardiac Phenotype Determines Survival in Duchenne Muscular Dystrophy. **Pediatr Pulmonol**, v. 51, n. 1, p. 70-76, 2016.

BUCCHERI, S. *et al.* Reference Values for Real Time Three-Dimensional Echocardiography-Derived Left Ventricular Volumes and Ejection Fraction: Review and Meta-Analysis of Currently Available Studies. **Echocardiography**, v. 32, n. 12, p. 1841-1850, 2015.

BUSHBY, K. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **Lancet Neurol**, v. 9, n. 1, p. 77-93, 2010a.

BUSHBY, K. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. **Lancet Neurol**, v. 9, n. 2, p. 177-189, 2010b.

CHOI, S. *et al.* Myocardial Tissue Doppler Velocity in Child Growth. **J Cardiovasc Ultrasound**, v. 24, n. 1, p. 40-47, 2016.

COLLIER, P.; PHELAN, D.; KLEIN, A. A Test in Context: Myocardial Strain Measured by Speckle-Tracking Echocardiography. **J Am Coll Cardiol**, v. 69, n. 8, p. 1043-1056, 2017.

CONNUCK, D. M. *et al.* Characteristics and outcomes of cardiomyopathy in children with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a comparative study from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. **Am Heart J**, v. 155, n. 6, p. 998-1005, 2008.

CORRADO, G. *et al.* Prognostic Value of Electrocardiograms, Ventricular Late Potentials, Ventricular Arrhythmias, and Left Ventricular Systolic Dysfunction in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy. **Am J Cardiol**, v. 89, n. 7, p. 838-841, 2002.

D'AMARIO, D. *et al.* A current approach to heart failure in Duchenne muscular dystrophy. **Heart**, v. 103, n. 22, p. 1770-1779, 2017.

DANIELS, S. R. *et al.* Echocardiographically determined left ventricular mass index in normal children, adolescents and young adults. **J Am Coll Cardiol**, v. 12, n. 3, p. 703-708, 1988.



DE, P. *et al.* Excess of glucocorticoid induces myocardial remodelling and alteration of calcium signalling in cardiomyocytes. **J Endocrinol**, v. 209, n. 1, p. 105-114, 2011.

DE ALMEIDA, P. A. D. *et al.* Genetic profile of Brazilian patients with dystrophinopathies. **Clin Genet**, v. 92, n. 2, p. 199-203, 2017.

DE BACKER, J. *et al.* The use of Tissue Doppler Imaging for the assessment of changes in myocardial structure and function in inherited cardiomyopathies. **Eur J Echocardiography**, v. 6, n. 4, p. 243-250, 2005.

DEBURGRAVE, N. *et al.* Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. **Hum Mutat**, v. 28, n. 2, p. 183-195, 2007.

DUBOC, D. *et al.* Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. **J Am Coll Cardiol**, v. 45, n. 6, p. 855-857, 2005.

FAYSSOIL, A.; ABASSE, S.; SILVERSTON, K. Cardiac Involvement Classification and Therapeutic Management in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. **J Neuromuscul Dis**, v. 4, n. 1, p. 17-23, 2017.

FERREIRA, B. A. Identificando o Nível de Bloqueio AV pelo ECG Convencional. In: PASTORE, C. A.; GRUPI, C. J.; MOFFA, P. J. **Eletrocardiologia Atual – Curso do Serviço de Eletrocardiologia do Incor, Segunda Edição**. São Paulo: Ateneu, 2008, p. 289-297.

FINE, D. M. *et al.* Age-matched comparison reveals early electrocardiography and echocardiography changes in dystrophin-deficient dogs. **Neuromuscul Disord**, v. 21, n. 7, p. 453-461, 2011.

FINSTERER, J.; STOLLBERGER, C. Cardiac involvement in Becker muscular dystrophy. **Can J Cardiol**, v. 24, n. 10, p. 786-792, 2008.

FREUND, A. A. *et al.* Duchenne and Becker muscular dystrophy: a molecular and immunohistochemical approach. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 1, p. 73-76, 2007.

GALVÃO, P. B. A. *et al.* O eletrocardiograma nas distrofias musculares progressivas e doenças miotônicas. Estudo de 77 pacientes. **Arq Bras Cardiol**, v. 42, p. 273-279, 1984.

GATTA, V. *et al.* Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). **Hum Genet**, v. 117, n. 1, p. 92-98, 2005.

GIATRAKOS, N. *et al.* Cardiac tissue velocities and strain rate in the early detection of myocardial dysfunction of asymptomatic boys with Duchenne's

muscular dystrophy: relationship to clinical outcome. **Heart**, v. 92, n. 6, p. 840-842, 2006.

GLOSS, D. *et al.* Practice guideline update summary: Corticosteroid treatment of Duchenne muscular dystrophy: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 86, n. 5, p. 465-472, 2016.

GRIGGS, R. C. *et al.* Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group. **Arch Neurol**, v. 48. n. 4, p. 383-388, 1991.

GROH, W. J.; ZIPES, D. P. Os Distúrbios Neurológicos e a Doença Cardiovascular. In: BONOW, R. O.; MANN, D. L.; ZIPES, D. P.; LIBBY, P. **Braunwald Tratado de Doenças Cardiovasculares, Nona Edição**. Tradução de: Alcir Costa Fernandes *et al.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p.1968-1971.

GRUPI, C. J.; LIMA, M. Extrassístoles: Apresentação e Classificação – Diagrama de Lewis. In: PASTORE, C. A.; GRUPI, C. J.; MOFFA, P. J. **Eletrocardiologia Atual – Curso do Serviço de Eletrocardiologia do Incor, Segunda Edição**. São Paulo: Ateneu, 2008, p. 261-271.

HENRICSON, E. *et al.* Percent-predicted 6-minute walk distance in duchenne muscular dystrophy to account for maturational influences. **PLoS Curr**, 2012. DOI: 10.1371/currents.RRN1297. Disponível em: <<http://currents.plos.org/md/article/percent-predicted-6-minute-walk-3vct9230jm3zq-1/>>. Acesso em: 7 out, 2017.

HERMANS, M. C. E. *et al.* Hereditary muscular dystrophies and the heart. **Neuromuscul Disord**, v. 20, n. 8, p. 479-492, 2010.

IINO, M. *et al.* Volume measurement of a pediatric ventricular phantom model using three-dimensional echocardiography. **J Med Ultrason**, v. 33, n. 4, p. 197-201, 2006.

JAMES, J. *et al.* Electrocardiographic abnormalities in very young Duchenne muscular dystrophy patients precede the onset of cardiac dysfunction. **Neuromuscul Disord**, v. 21, n. 7, p. 462-467, 2011.

JANSSEN, P. M. *et al.* Prednisolone attenuates improvement of cardiac and skeletal contractile function and histopathology by lisinopril and spironolactone in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **PLoS One**, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0088360 Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0088360>>. Acesso em: 7 out, 2017.

JASHARI, H. *et al.* Normal ranges of left ventricular strain in children: a meta-analysis. **Cardiovasc Ultrasound**, v. 13, p. 37, 2015.

JEFFERIES, J. L. *et al.* Genetic Predictors and Remodeling of Dilated Cardiomyopathy in Muscular Dystrophy. **Circulation**, v. 112, n. 18, p. 2799-2804, 2005.

JO, W. H. *et al.* Early Marker of Myocardial Deformation in Children with Duchenne Muscular Dystrophy Assessed Using Echocardiographic Myocardial Strain Analysis. **Yonsei Med J**, v. 57, n. 4, p. 900-904, 2016.

JOYCE, E. *et al.* Subclinical left ventricular dysfunction by echocardiographic speckle-tracking strain analysis relates to outcome in sarcoidosis. **Eur J Heart Fail**, v. 17, n. 1, p. 51-62, 2015.

KAMPERIDIS, V. *et al.* Left ventricular systolic function assessment in secondary mitral regurgitation: left ventricular ejection fraction vs. speckle tracking global longitudinal strain. **Eur Heart J**, v. 37, n. 10, p. 811-816, 2016.

KASPAR, R. W. *et al.* Analysis of dystrophin deletion mutations predicts age of cardiomyopathy onset in Becker Muscular Dystrophy. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 2, n. 6, p. 544-551, 2009.

KAUFMANN, P.; WEIMER, L. H.; HIRANO, M.; ROWLAND, L. P. Distrofias Musculares Progressivas. In: ROWLAND, L. P.; PEDLEY, T. A. **Merritt Tratado de Neurologia, Décima Segunda Edição**. Tradução de: Fernando Diniz Mundim. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 867-872.

KOEKS, Z. *et al.* Clinical Outcomes in Duchenne Muscular Dystrophy: A Study of 5345 Patients from the TREAT-NMD DMD Global Database. **J Neuromuscul Dis**. [Epub ahead of print].

KRAMANN, R. *et al.* Speckle tracking echocardiography detects uremic cardiomyopathy early and predicts cardiovascular mortality in ESRD. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, n. 10, p. 2351-2365, 2014.

LABOMBARDA, F. *et al.* Longitudinal left ventricular strain impairment in type 1 diabetes children and adolescents: A 2D speckle strain imaging study. **Diabetes Metab**, v. 40, n. 4, p. 292-298, 2014.

LANG, R. M. *et al.* Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 28, n. 1, p. 1-39, 2015.

LEVY, P. T. *et al.* Reference Ranges of Left Ventricular Strain Measures by Two-Dimensional Speckle Tracking Echocardiography in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 29, n. 3, p. 209-225, 2016.

LU, X. *et al.* How accurately, reproducibly, and efficiently can we measure left ventricular indices using M-mode, 2-dimensional, and 3-dimensional echocardiography in children? **Am Heart J**, v. 155, n. 5, p. 946-953, 2008.

MANZUR, A. Y. *et al.* Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1:CD003725, 2008.

MARCUS, K. A. *et al.* Early detection of myocardial dysfunction in children with mitochondrial disease: An ultrasound and two-dimensional strain echocardiography study. **Mitochondrion**, v. 11, n. 3, p. 405-412, 2011.

MATTHEWS, E. *et al.* Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 5:CD003725.

MARKHAM, L. W. *et al.* Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**, v. 18, n. 5, p. 365-370, 2008.

MCDONALD, C. M. *et al.* The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. **Muscle Nerve**, v. 48, n. 3, p. 343-356, 2013.

MESA, L. E. *et al.* Steroids in Duchenne muscular dystrophy-deflazacort trial. **Neuromuscul Disord**, v. 1, n. 4, p. 261-266, 1991.

MIYAZAKI, S. *et al.* Global longitudinal strain in relation to the severity of aortic stenosis: a two-dimensional speckle-tracking study. **Echocardiography**, v. 28, n. 7, p. 703-708, 2011.

MOLINA, M. S.; PASTORE, C. A. Padrão Eletrocardiográfico das Crianças. In: PASTORE, C. A.; GRUPI, C. J.; MOFFA, P. J. **Eletrocardiologia Atual – Curso do Serviço de Eletrocardiologia do Incor, Segunda Edição**. São Paulo: Ateneu, 2008, p. 23-39.

NOWAK, K. J.; DAVIES, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **EMBO reports**, v. 5, n. 9, p. 872-876, 2004.

OGATA, H. *et al.* Beneficial effects of beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in Duchenne muscular dystrophy. **J Cardiol**, v. 53, n. 1, p. 72-78, 2009.

OGATA, H. *et al.* Myocardial strain changes in Duchenne muscular dystrophy without overt cardiomyopathy. **Int J Cardiol**, v. 115, n. 2, p. 190-195, 2007.

OKUBO M. *et al.* Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. **J Hum Genet**, v. 61, n. 6, p. 483-489, 2016.

PASTORE, C. A. *et al.* Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 3, supl. 2, p. 2-19, 2009.

PATRIANAKOS, A. P. *et al.* Two-dimensional global and segmental longitudinal strain: are the results from software in different high-end ultrasound systems comparable? **Echo Res Pract**, v. 2, n. 1, p. 29-39, 2015.

QUADROS, C. M.; PASTORE, C. A. Índices de Sobrecarga no ECG e Causas de Desvio de Eixo do SÂQRS. In: PASTORE, C. A.; GRUPI, C. J.; MOFFA, P. J. **Eletrocardiologia Atual – Curso do Serviço de Eletrocardiologia do Incor, Segunda Edição**. São Paulo: Ateneu, 2008, p. 9-21.

RAMAN, S. V. *et al.* Eplerenone for early cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy; a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 2, p. 153-161, 2015.

REANT, P. *et al.* Global longitudinal strain is associated with heart failure outcomes in hypertrophic cardiomyopathy. **Heart**, v. 102, n. 10, p. 741-747, 2016.

ROPPER, A. H.; SAMUELS, M. A. The Muscular Dystrophies. In: ROPPER, A. H.; SAMUELS, M. A. **Adams and Victor's Principles of Neurology, Ninth Edition**. United States of America: McGraw-Hill Professional, 2009, p. 1366-1370.

ROY, S. G. *et al.* Excess of glucocorticoid induces cardiac dysfunction via activating angiotensin II pathway. **Cell Physiol Biochem**, v. 24, n. 1-2, p. 1-10, 2009.

RUDDOX, V. *et al.* Is 3D echocardiography superior to 2D echocardiography in general practice? A systematic review of studies published between 2007 and 2012. **Int J Cardiol**, v. 168, n. 2, p. 1306-1315, 2013.

SASAKI, K. *et al.* Sequential changes in cardiac structure and function in patients with Duchenne type muscular dystrophy: A two-dimensional echocardiographic study. **Am Heart J**, v. 135, n. 6, pt. 1, p. 937-944, 1998.

SCHRAM, G. *et al.* All-cause mortality and cardiovascular outcomes with prophylactic steroid therapy in Duchenne muscular dystrophy. **J Am Coll Cardiol**, v. 61, n. 9, p. 948-954, 2013.

SMISETH, O. A. *et al.* Myocardial strain imaging: how useful is it in clinical decision making? **Eur Heart J**, v. 37, n. 15, p. 1196-1207, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. V

Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, n. 3, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 1, p. 1-51, 2010.

SPURNEY, C. *et al.* Cooperative International Neuromuscular Research Group Duchenne Natural History Study demonstrates insufficient diagnosis and treatment of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 50, n. 2, p. 250-256, 2014.

SQUERI, A. *et al.* Three-dimensional echocardiography in various types of heart disease: a comparison study of magnetic resonance imaging and 64-slice computed tomography in a real-world population. **J Echocardiogr**, v. 15, n. 1, p. 18-26, 2017.

TAGGART, N. W. *et al.* Left atrial volume in children without heart disease and in those with ventricular septal defect or patent ductus arteriosus or hypertrophic cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v. 106, n. 10, p. 1500-1504, 2010.

TAKENAKA, A. *et al.* Discrepancy between systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Eur Heart J**, v. 14, n. 5, p. 669-676, 1993.

TANAKA, N. *et al.* Assessment of the developmental change in the left atrial volume using real time three-dimensional echocardiography. **Echocardiography**, v. 32, n. 7, p. 1131-1139, 2015.

TAQATQA, A. *et al.* The Use of Speckle Tracking Echocardiography for Early Detection of Myocardial Dysfunction in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. **Pediatr Cardiol**, v. 37, n. 8, p. 1422-1428, 2016.

THAVENDIRANATHAN, P. *et al.* Use of myocardial strain imaging by echocardiography for the early detection of cardiotoxicity in patients during and after cancer chemotherapy: a systematic review. **J Am Coll Cardiol**, v. 63, n. 25, pt. A, p. 2751-2768, 2014.

THRUSH, P. T. *et al.* Re-examination of the Electrocardiogram in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy and Correlation With Its Dilated Cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v. 103, n. 2, p. 262-265, 2009.

TSUBURAYA, R. S. *et al.* Utility of real-time three-dimensional echocardiography for Duchenne muscular dystrophy with echocardiographic limitations. **Neuromuscul Disord**, v. 24, n. 5, p. 402-408, 2014.



TSUDA, T. *et al.* Early Progressive Dilated Cardiomyopathy in a Family with Becker Muscular Dystrophy Related to a Novel Frameshift Mutation in the Dystrophin Gene Exon 27. **J Hum Genet**, v. 60, n. 3, p. 151-155, 2015.

VIOLLET, L. *et al.* Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and/or Beta Blockers on the Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy. **Am J Cardiol**, v. 110, n. 1, p. 98-102, 2012.

VAN WESTERING, T. L.; BETTS, C. A.; WOOD, M. J. Current Understanding of Molecular Pathology and Treatment of Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8823-8855, 2015.

WANG, Y. *et al.* Assessment of left ventricular function in chronic alcoholics by real-time three-dimensional echocardiography. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, n. 5, 2017.

WERNECK, L. C.; FERRAZ, L. E.; SCOLA, R. H. Early differentiation between Duchenne and Becker muscular dystrophy: clinical, laboratory, electrophysiology, histochemical, and immunohistochemical study of 138 cases. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 50, n. 4, p. 468-477, 1992.

WERNECK, L. C. *et al.* Comparative analysis of PCR-deletion detection and immunohistochemistry in Brazilian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. **Am J Med Genet**, v. 103, n. 2, p. 115-120, 2001.

WHITE, S. J. *et al.* Duplications in the DMD gene. **Hum Mutat**, v. 27, n. 9, p. 938-945, 2006.

YAMAMOTO, T. *et al.* Utility of transmural myocardial strain profile for prediction of early left ventricular dysfunction in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Am J Cardiol**, v. 111, n. 6, p. 902-907, 2013.

ZHONG, J. *et al.* Genetic analysis of the dystrophin gene in children with Duchenne and Becker muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, v. 56, n. 1, p. 117-121, 2016.





## APÊNDICE 1 - FOLHA DE COLETA DE DADOS

FICHA DE COLETA DE DADOS: DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER: AVALIAÇÃO CARDIOLÓGICA E ANÁLISE MOLECULAR	
<p>Pesquisador:.....</p> <p>Nome:..... Data:..... Registro:.....</p> <p>Gênero: <input type="radio"/> M <input type="radio"/> F Idade:..... Data de nascimento:...../...../.....</p> <p>Diagnóstico final:.....</p> <p><b>Dados iniciais:</b>            Idade de início da deambulação:..... Idade de início dos sintomas:.....            Idade de diagnóstico:..... Tempo de duração da doença:.....            Idade na última consulta:..... Última consulta em:.....            Perda da deambulação: <input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Sim, Idade:.....</p> <p><b>Sintomas e Sinais:</b>  <input type="radio"/> Dispneia <input type="radio"/> Ortopneia <input type="radio"/> DPN <input type="radio"/> Palpitação <input type="radio"/> Dor torácica <input type="radio"/> Fadiga <input type="radio"/> Edema MMII  <input type="radio"/> Tontura <input type="radio"/> Lipotímia <input type="radio"/> Síncope; Classe funcional NYHA:.....            PA:..... FC:..... SaO2:.....  <input type="radio"/> Cianose <input type="radio"/> Ingurgitamento jugular <input type="radio"/> Hepatomegalia <input type="radio"/> Edema MMII <input type="radio"/> Sibilos  <input type="radio"/> Estertores crepitantes <input type="radio"/> Escoliose <input type="radio"/> Gifose <input type="radio"/> Lordose  <input type="radio"/> Ictus cordis:..... <input type="radio"/> Frêmito cardíaco:.....  <input type="radio"/> Hipofonese:..... <input type="radio"/> Hipertofone:..... <input type="radio"/> Sopro cardíaco:.....            Ritmo cardíaco: <input type="radio"/> Regular <input type="radio"/> Irregular; Pulso arterial:.....</p> <p><b>HMP, HMF e desenvolvimento:</b>  <input type="radio"/> Comorbidades, quais:.....            HMF positiva: <input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Sim, quem:.....            Atraso no DNP: <input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Sim; Déficit cognitivo: <input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Sim</p> <p><b>CK inicial:</b>..... <b>Outros exames laboratoriais:</b>.....</p> <p><b>Análise do DNA:</b>  <input type="radio"/> Não realizado <input type="radio"/> Realizado, data:...../...../....., idade:.....            Exons analisados:.....            Resultado:.....</p> <p><b>Imunohistoquímica:</b>  <input type="radio"/> Não realizado <input type="radio"/> Realizado, data:...../...../....., idade:.....            Resultado:.....</p> <p><b>Primeiro ECG:</b>  <input type="radio"/> Não realizado <input type="radio"/> Realizado, data:...../...../....., idade:.....  <input type="radio"/> Normal <input type="radio"/> Alteração do ritmo, qual:..... <input type="radio"/> BAV <input type="radio"/> PR curto  <input type="radio"/> Desvio do eixo para direita <input type="radio"/> Desvio do eixo para esquerda <input type="radio"/> BRD <input type="radio"/> BRE <input type="radio"/> BDAS <input type="radio"/> SAE <input type="radio"/> SAD <input type="radio"/> SVE <input type="radio"/> SVD <input type="radio"/> ARV, onde:..... <input type="radio"/> R&gt;S V1 <input type="radio"/> Outros:.....</p> <p><b>Primeiro ECG alterado:</b>  <input type="radio"/> Não realizado <input type="radio"/> Realizado, data:...../...../....., idade:.....  <input type="radio"/> Alteração do ritmo, qual:..... <input type="radio"/> BAV <input type="radio"/> PR curto <input type="radio"/> Desvio do eixo para direita  <input type="radio"/> Desvio do eixo para esquerda <input type="radio"/> BRD <input type="radio"/> BRE <input type="radio"/> BDAS <input type="radio"/> SAE <input type="radio"/> SAD <input type="radio"/> SVE <input type="radio"/> SVD <input type="radio"/> ARV, onde:..... <input type="radio"/> R&gt;S V1 <input type="radio"/> Outros:.....</p>	<p><b>Último ECG:</b>  <input type="radio"/> Não realizado <input type="radio"/> Realizado, data:...../...../....., idade:..... <input type="radio"/> Normal  <input type="radio"/> Alteração do ritmo, qual:..... <input type="radio"/> BAV <input type="radio"/> 1º <input type="radio"/> 2º <input type="radio"/> 1º <input type="radio"/> 2º II <input type="radio"/> 3º <input type="radio"/> PR curto  <input type="radio"/> Desvio do eixo para direita <input type="radio"/> Desvio do eixo para esquerda <input type="radio"/> BRD <input type="radio"/> BRE <input type="radio"/> BDAS <input type="radio"/> SAE <input type="radio"/> SAD <input type="radio"/> SVE <input type="radio"/> SVD <input type="radio"/> ARV, onde:..... <input type="radio"/> R&gt;S V1 <input type="radio"/> Outros:.....</p> <p><b>Primeiro Ecocardiograma:</b>  <input type="radio"/> Não realizado <input type="radio"/> Realizado, data:...../...../....., idade:.....  <input type="radio"/> Normal <input type="radio"/> Alteração do relaxamento <input type="radio"/> I <input type="radio"/> II <input type="radio"/> III <input type="radio"/> IV  <input type="radio"/> Hipocinesia, onde:..... <input type="radio"/> Acinesia, onde:.....  <input type="radio"/> Discinesia, onde:..... <input type="radio"/> Disfunção VE, EP:....., FE:.....  <input type="radio"/> Disfunção valvar, qual:....., gravidade:.....            RA:..... AE:....., SV:....., PP:....., DDVE:....., DSVE:.....  <input type="radio"/> Outros:.....</p> <p><b>Primeiro Ecocardiograma alterado:</b>  <input type="radio"/> Não realizado <input type="radio"/> Realizado, data:...../...../....., idade:.....  <input type="radio"/> Normal <input type="radio"/> Alteração do relaxamento <input type="radio"/> I <input type="radio"/> II <input type="radio"/> III <input type="radio"/> IV  <input type="radio"/> Hipocinesia, onde:..... <input type="radio"/> Acinesia, onde:.....  <input type="radio"/> Discinesia, onde:..... <input type="radio"/> Disfunção VE, EP:....., FE:.....  <input type="radio"/> Disfunção valvar, qual:....., gravidade:.....            RA:..... AE:....., SV:....., PP:....., DDVE:....., DSVE:.....  <input type="radio"/> Outros:.....</p> <p><b>Último Ecocardiograma:</b>  <input type="radio"/> Não realizado <input type="radio"/> Realizado, data:...../...../....., idade:.....  <input type="radio"/> Normal <input type="radio"/> Alteração do relaxamento <input type="radio"/> I <input type="radio"/> II <input type="radio"/> III <input type="radio"/> IV  <input type="radio"/> Hipocinesia, onde:..... <input type="radio"/> Acinesia, onde:.....  <input type="radio"/> Discinesia, onde:..... <input type="radio"/> Disfunção VE, EP:....., FE:.....  <input type="radio"/> Disfunção valvar, qual:....., gravidade:.....            RA:..... AE:....., SV:....., PP:....., DDVE:....., DSVE:.....  <input type="radio"/> Outros:.....</p> <p><b>Outros exames cardiológicos:</b>            Quais:..... Data:...../...../.....            Resultado:.....</p> <p><b>Outros exames:</b>            Espirometria:..... Data:...../...../.....            Teste de caminhada 6':..... Data:...../...../.....</p> <p><b>Evolução:</b>  <input type="radio"/> Prednisona, dose:....., início:....., término:....., motivo:.....  <input type="radio"/> IECA, dose:....., início:....., término:....., motivo:.....  <input type="radio"/> Betabloqueador, dose:....., início:....., término:....., motivo:.....  <input type="radio"/> Outros:.....  <input type="radio"/> FST respiratória <input type="radio"/> FST motora            Óbito: <input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Sim, causa:....., idade:.....</p>

## APÊNDICE 2 - FOLHA DE COLETA DE DADOS ECOCARDIOGRÁFICOS

### PLANILHA DE COLETA DE DADOS

Iniciais do paciente:

Registro no HC:

Número na pesquisa:

Idade:

Sexo:

Superfície corporal:

Telefone:

PARÂMETROS AVALIADOS	DATA
Septo ventricular (mm)	
Parede posterior (mm)	
DDVE modo M (mm)	
DSVE modo M (mm)	
Massa VE	
AE diâmetro modo M (mm)	
Encurtamento percentual (%)	
FE Teicholz (%)	
VDVE 2D (ml)	
VSVE 2D (ml)	
FE Simpson (%)	
AE volume 2D (ml/m <sup>2</sup> )	
Velocidade E mitral (m/s)	
Velocidade A mitral (m/s)	
Relação E/A	
TD onda E (s)	
Velocidade E' anel mitral septal (cm/s)	
Velocidade E' anel mitral lateral (cm/s)	
Velocidade E' média (septal + lateral) (cm/s)	
Velocidade S' anel mitral septal (cm/s)	
Velocidade S' anel mitral lateral (cm/s)	
Relação E/E' septal	
Relação E/E' lateral	
Relação E/E' média (septal + lateral)	
VDVE 3D (ml)	
VSVE 3D (ml)	
FE 3D (%)	
AE volume 3D (ml/m <sup>2</sup> )	
Strain longitudinal (ST) 4 Câmaras	
Strain longitudinal (ST) 2 Câmaras	
Strain longitudinal (ST) 3 Câmaras	
Strain longitudinal (ST) média	



**ANEXO 1 - VALORES DE REFERÊNCIA DOS PARÂMETROS  
ELETROCARDIOGRÁFICOS EM CRIANÇAS DE DIFERENTES FAIXAS  
ETÁRIAS**

ANEXO 1 - VALORES DE REFERÊNCIA DOS PARÂMETROS ELETROCARDIOGRÁFICOS EM CRIANÇAS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS

	1-3 ANOS	3-5 ANOS	5-8 ANOS	8-12 ANOS	12-16 ANOS
FC (bpm)	89-152	73-137	65-133	62-130	60-120
PR DII (ms)	0,08-0,15	0,08-0,16	0,09-0,16	0,09-0,17	0,09-0,18

FONTE: Adaptado de MOLINA (2008) e PASTORE (2009).

LEGENDA: FC – frequência cardíaca; PR – intervalo PR; DII – derivação II.

**ANEXO 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E  
DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA  
ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM  
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER**

ANEXO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO  
SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA  
ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM  
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-  
2016

(continua)

Éxon acometido	FE3D≥52% (n=51)	FE3D<52% (n=9)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
1	1 (2)	0 (0)	1
2	1 (2)	0 (0)	1
3	2 (3,9)	1 (11,1)	0,391
4	2 (3,9)	1 (11,1)	0,391
5	1 (2)	1 (11,1)	0,280
6	2 (3,9)	1 (11,1)	0,391
7	2 (3,9)	2 (22,2)	0,103
8	2 (3,9)	0 (0)	1
9	3 (5,9)	0 (0)	1
10	3 (5,9)	0 (0)	1
11	4 (7,8)	0 (0)	1
12	6 (11,8)	0 (0)	0,578
13	5 (9,8)	0 (0)	1
14	6 (11,8)	0 (0)	0,578
15	4 (7,8)	0 (0)	1
16	4 (7,8)	0 (0)	1
17	4 (7,8)	0 (0)	1
18	4 (7,8)	0 (0)	1

ANEXO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2016

(continuação)

Éxon acometido	FE3D $\geq$ 52% (n=51)	FE3D<52% (n=9)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
19	4 (7,8)	0 (0)	1
20	4 (7,8)	0 (0)	1
21	3 (5,9)	0 (0)	1
22	2 (3,9)	0 (0)	1
23	3 (5,9)	0 (0)	1
24	2 (3,9)	0 (0)	1
25	2 (3,9)	0 (0)	1
26	2 (3,9)	0 (0)	1
27	2 (3,9)	0 (0)	1
28	1 (2)	0 (0)	1
29	1 (2)	0 (0)	1
30	1 (2)	0 (0)	1
31	1 (2)	0 (0)	1
32	2 (3,9)	0 (0)	1
33	1 (2)	1 (11,1)	0,280
34	1 (2)	0 (0)	1
35	1 (2)	0 (0)	1
36	1 (2)	0 (0)	1
37	1 (2)	0 (0)	1
38	1 (2)	0 (0)	1
39	1 (2)	0 (0)	1

ANEXO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2016

(continuação)

Éxon acometido	FE3D $\geq$ 52% (n=51)	FE3D<52% (n=9)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
40	1 (2)	0 (0)	1
41	1 (2)	0 (0)	1
42	0 (0)	0 (0)	1
43	1 (2)	0 (0)	1
44	1 (2)	1 (11,1)	0,280
45	15 (29,4)	1 (11,1)	0,421
46	15 (29,4)	0 (0)	0,096
47	15 (29,4)	0 (0)	0,096
48	14 (27,5)	1 (11,1)	0,427
49	13 (25,5)	1 (11,1)	0,670
50	11 (21,6)	2 (22,2)	1
51	7 (13,7)	3 (33,3)	0,163
52	5 (9,8)	1 (11,1)	1
53	3 (5,9)	0 (0)	1
54	3 (5,9)	0 (0)	1
55	2 (3,9)	0 (0)	1
56	0 (0)	0 (0)	1
57	0 (0)	0 (0)	1
58	0 (0)	0 (0)	1
59	1 (2)	0 (0)	1
60	0 (0)	0 (0)	1

ANEXO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER CHC-UFPR 2014-2016

Éxon acometido	FE3D $\geq$ 52% (n=51)	FE3D<52% (n=9)	(conclusão)
	n (%)	n (%)	Valor de p*
61	0 (0)	0 (0)	1
62	1 (2)	0 (0)	1
63	0 (0)	0 (0)	1
64	0 (0)	0 (0)	1
65	3 (5,9)	0 (0)	1
66	1 (2)	0 (0)	1
67	1 (2)	0 (0)	1
68-79	0 (0)	0 (0)	1

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; \*Teste exato de Fisher.



**ANEXO 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E  
DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA  
ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM  
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

ANEXO 3 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO  
SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA  
ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM  
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE CHC-UFPR 2014-2016

(continua)

Éxon acometido	FE3D $\geq$ 52% (n=40)	FE3D<52% (n=6)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
1	1 (2,5)	0 (0)	1
2	1 (2,5)	0 (0)	1
3	1 (2,5)	0 (0)	1
4	1 (2,5)	0 (0)	1
5	1 (2,5)	0 (0)	1
6	2 (5)	0 (0)	1
7	2 (5)	1 (16,7)	0,349
8	2 (5)	0 (0)	1
9	2 (5)	0 (0)	1
10	3 (7,5)	0 (0)	1
11	4 (10)	0 (0)	1
12	6 (15)	0 (0)	0,578
13	5 (12,5)	0 (0)	1
14	5 (12,5)	0 (0)	1
15	3 (7,5)	0 (0)	1
16	3 (7,5)	0 (0)	1
17	3 (7,5)	0 (0)	1
18	3 (7,5)	0 (0)	1

ANEXO 3 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE CHC-UFPR 2014-2016

(continuação)

Éxon acometido	FE3D $\geq$ 52% (n=40)	FE3D<52% (n=6)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
19	3 (7,5)	0 (0)	1
20	3 (7,5)	0 (0)	1
21	3 (7,5)	0 (0)	1
22	2 (5)	0 (0)	1
23	3 (7,5)	0 (0)	1
24	2 (5)	0 (0)	1
25	2 (5)	0 (0)	1
26	2 (5)	0 (0)	1
27	2 (5)	0 (0)	1
28	1 (2,5)	0 (0)	1
29	1 (2,5)	0 (0)	1
30	1 (2,5)	0 (0)	1
31	1 (2,5)	0 (0)	1
32	2 (5)	0 (0)	1
33	1 (2,5)	0 (0)	1
34	1 (2,5)	0 (0)	1
35	1 (2,5)	0 (0)	1
36	1 (2,5)	0 (0)	1
37	1 (2,5)	0 (0)	1
38	1 (2,5)	0 (0)	1
39	1 (2,5)	0 (0)	1

ANEXO 3 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE CHC-UFPR 2014-2016

(continuação)

Éxon acometido	FE3D $\geq$ 52% (n=40)	FE3D<52% (n=6)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
40	1 (2,5)	0 (0)	1
41	1 (2,5)	0 (0)	1
42	0 (0)	0 (0)	1
43	1 (2,5)	0 (0)	1
44	1 (2,5)	0 (0)	1
45	8 (20)	1 (16,7)	0,349
46	8 (20)	0 (0)	0,571
47	8 (20)	0 (0)	0,571
48	12 (30)	1 (16,7)	0,659
49	11 (27,5)	1 (16,7)	1
50	11 (27,5)	2 (33,3)	1
51	7 (17,5)	3 (50)	0,107
52	5 (12,5)	1 (16,7)	1
53	3 (7,5)	0 (0)	1
54	3 (7,5)	0 (0)	1
55	2 (5)	0 (0)	1
56	0 (0)	0 (0)	1
57	0 (0)	0 (0)	1
58	0 (0)	0 (0)	1
59	0 (0)	0 (0)	1
60	0 (0)	0 (0)	1

ANEXO 3 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO AVALIADA PELA ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE CHC-UFPR 2014-2016

(conclusão)

Éxon acometido	FE3D $\geq$ 52% (n=40)	FE3D<52% (n=6)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
61	0 (0)	0 (0)	1
62	1 (2,5)	0 (0)	1
63	0 (0)	0 (0)	1
64	0 (0)	0 (0)	1
65	3 (7,5)	0 (0)	1
66	1 (2,5)	0 (0)	1
67	1 (2,5)	0 (0)	1
68-79	0 (0)	0 (0)	1

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; \*Teste exato de Fisher.

**ANEXO 4 - ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E  
DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS  
PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER**

ANEXO 4 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO  
SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES  
COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER E FE3D≥52%  
CHC-UFPR 2014-2016

(continua)

Éxon acometido	SLG≤-18% (n=30)	SLG>-18% (n=21)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
1	0 (0)	1 (4,8)	0,412
2	1 (3,3)	0 (0)	1
3	2 (6,7)	0 (0)	0,506
4	2 (6,7)	0 (0)	0,506
5	1 (3,3)	0 (0)	1
6	2 (6,7)	0 (0)	0,506
7	2 (6,7)	0 (0)	0,506
8	1 (3,3)	1 (4,8)	1
9	2 (6,7)	1 (4,8)	1
10	2 (6,7)	1 (4,8)	1
11	3 (10,0)	1 (4,8)	0,634
12	4 (13,3)	2 (9,5)	1
13	3 (10,0)	2 (9,5)	1
14	3 (10,0)	3 (14,3)	0,680
15	2 (6,7)	2 (9,5)	1
16	2 (6,7)	2 (9,5)	1
17	2 (6,7)	2 (9,5)	1
18	2 (6,7)	2 (9,5)	1

ANEXO 4 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER E FE3D $\geq$ 52%  
CHC-UFPR 2014-2016

(continuação)

Éxon acometido	SLG $\leq$ -18% (n=30)	SLG $>$ -18% (n=21)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
19	2 (6,7)	2 (9,5)	1
20	2 (6,7)	2 (9,5)	1
21	1 (3,3)	2 (9,5)	0,561
22	0 (0)	2 (9,5)	0,165
23	1 (3,3)	2 (9,5)	0,561
24	0 (0)	2 (9,5)	0,165
25	0 (0)	2 (9,5)	0,165
26	0 (0)	2 (9,5)	0,165
27	0 (0)	2 (9,5)	0,165
28	0 (0)	1 (4,8)	0,412
29	0 (0)	1 (4,8)	0,412
30	0 (0)	1 (4,8)	0,412
31	0 (0)	1 (4,8)	0,412
32	1 (3,3)	1 (4,8)	1
33	0 (0)	1 (4,8)	0,412
34	0 (0)	1 (4,8)	0,412
35	0 (0)	1 (4,8)	0,412
36	0 (0)	1 (4,8)	0,412
37	0 (0)	1 (4,8)	0,412
38	0 (0)	1 (4,8)	0,412
39	0 (0)	1 (4,8)	0,412

ANEXO 4 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER E FE3D $\geq$ 52%  
CHC-UFPR 2014-2016

(continuação)

Éxon acometido	SLG $\leq$ -18% (n=30)	SLG $>$ -18% (n=21)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
40	0 (0)	1 (4,8)	0,412
41	0 (0)	1 (4,8)	0,412
42	0 (0)	0 (0)	1
43	1 (3,3)	0 (0)	1
44	0 (0)	1 (4,8)	0,412
45	7 (23,3)	8 (38,1)	0,351
46	6 (20,0)	9 (42,9)	0,119
47	6 (20,0)	9 (42,9)	0,119
48	2 (6,7)	12 (57,1)	<0,001
49	2 (6,7)	11 (52,4)	0,001
50	1 (3,3)	10 (47,6)	<0,001
51	2 (6,7)	5 (23,8)	0,109
52	0 (0)	5 (23,8)	0,009
53	1 (3,3)	2 (9,5)	0,561
54	1 (3,3)	2 (9,5)	0,561
55	1 (3,3)	1 (4,8)	1
56	0 (0)	0 (0)	1
57	0 (0)	0 (0)	1
58	0 (0)	0 (0)	1
59	1 (3,3)	0 (0)	1
60	0 (0)	0 (0)	1

ANEXO 4 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E BECKER E FE3D $\geq$ 52%  
CHC-UFPR 2014-2016

(conclusão)

Éxon acometido	SLG $\leq$ -18% (n=30)	SLG $>$ -18% (n=21)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
61	0 (0)	0 (0)	1
62	0 (0)	1 (4,8)	0,412
63	0 (0)	0 (0)	1
64	0 (0)	0 (0)	1
65	3 (10,0)	0 (0)	0,259
66	1 (3,3)	0 (0)	1
67	1 (3,3)	0 (0)	1
68-79	0 (0)	0 (0)	1

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo; \*Teste exato de Fisher.



**ANEXO 5 - ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E  
DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS  
PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

ANEXO 5 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO  
SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES  
COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E FE3D≥52% CHC-UFPR  
2014-2016

(continua)

Éxon acometido	SLG≤-18% (n=20)	SLG>-18% (n=20)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
1	0 (0)	1 (5)	1
2	1 (5)	0 (0)	1
3	1 (5)	0 (0)	1
4	1 (5)	0 (0)	1
5	1 (5)	0 (0)	1
6	2 (10)	0 (0)	0,487
7	2 (10)	0 (0)	0,487
8	1 (5)	1 (5)	1
9	1 (5)	1 (5)	1
10	2 (10)	1 (5)	1
11	3 (15)	1 (5)	0,605
12	4 (20)	2 (10)	0,661
13	3 (15)	2 (10)	1
14	2 (10)	3 (15)	1
15	1 (5)	2 (10)	1
16	1 (5)	2 (10)	1
17	1 (5)	2 (10)	1
18	1 (5)	2 (10)	1

ANEXO 5 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E FE3D≥52% CHC-UFPR 2014-2016

Éxon acometido	SLG≤-18% (n=20)	SLG>-18% (n=20)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
19	1 (5)	2 (10)	1
20	1 (5)	2 (10)	1
21	1 (5)	2 (10)	1
22	0 (0)	2 (10)	0,487
23	1 (5)	2 (10)	1
24	0 (0)	2 (10)	0,487
25	0 (0)	2 (10)	0,487
26	0 (0)	2 (10)	0,487
27	0 (0)	2 (10)	0,487
28	0 (0)	1 (5)	1
29	0 (0)	1 (5)	1
30	0 (0)	1 (5)	1
31	0 (0)	1 (5)	1
32	1 (5)	1 (5)	1
33	0 (0)	1 (5)	1
34	0 (0)	1 (5)	1
35	0 (0)	1 (5)	1
36	0 (0)	1 (5)	1
37	0 (0)	1 (5)	1
38	0 (0)	1 (5)	1
39	0 (0)	1 (5)	1

ANEXO 5 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E FE3D≥52% CHC-UFPR 2014-2016

(continuação)

Éxon acometido	SLG≤-18% (n=20)	SLG>-18% (n=20)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
40	0 (0)	1 (5)	1
41	0 (0)	1 (5)	1
42	0 (0)	0 (0)	1
43	1 (5)	0 (0)	1
44	0 (0)	1 (5)	1
45	1 (5)	7 (35)	0,044
46	0 (0)	8 (40)	0,003
47	0 (0)	8 (40)	0,003
48	0 (0)	12 (60)	<0,001
49	0 (0)	11 (55)	<0,001
50	1 (5)	10 (50)	0,003
51	2 (10)	5 (25)	0,408
52	0 (0)	5 (25)	0,047
53	1 (5)	2 (10)	1
54	1 (5)	2 (10)	1
55	1 (5)	1 (5)	1
56	0 (0)	0 (0)	1
57	0 (0)	0 (0)	1
58	0 (0)	0 (0)	1
59	0 (0)	0 (0)	1
60	0 (0)	0 (0)	1

ANEXO 5 – ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO E DISFUNÇÃO SISTÓLICA PRECOCE DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E FE3D $\geq$ 52% CHC-UFPR 2014-2016

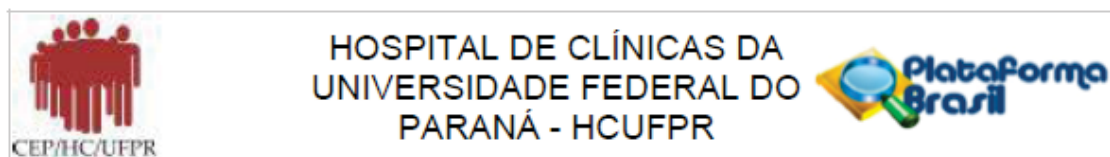
(conclusão)

Éxon acometido	SLG $\leq$ -18% (n=20)	SLG $>$ -18% (n=20)	Valor de p*
	n (%)	n (%)	
61	0 (0)	0 (0)	1
62	0 (0)	1 (5)	1
63	0 (0)	0 (0)	1
64	0 (0)	0 (0)	1
65	3 (15)	0 (0)	0,231
66	1 (5)	0 (0)	1
67	1 (5)	0 (0)	1
68-79	0 (0)	0 (0)	1

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: n – número de pacientes em cada grupo; FE3D – fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo método tridimensional; SLG – *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo; \*Teste exato de Fisher.

## ANEXO 6 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO CHC-UFPR



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA E ECOCARDIOGRÁFICA NAS DISTROFIAS MUSCULARES DE DUCHENNE E BECKER

**Pesquisador:** Raphael Henrique Déa Cirino

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47153115.4.0000.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.175.687

**Data da Relatoria:** 03/08/2015

#### **Apresentação do Projeto:**

Conforme parecer do CEP nº1.164.698 de 27/07/2015.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Conforme parecer do CEP nº1.164.698 de 27/07/2015.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Conforme parecer do CEP nº1.164.698 de 27/07/2015.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Conforme parecer do CEP nº1.164.698 de 27/07/2015.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Conforme parecer do CEP nº1.164.698 de 27/07/2015.

#### **Recomendações:**

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as sugestões e considerações feitas pelo CEP, parecer 1.164.698 de 27/07/15, foram

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

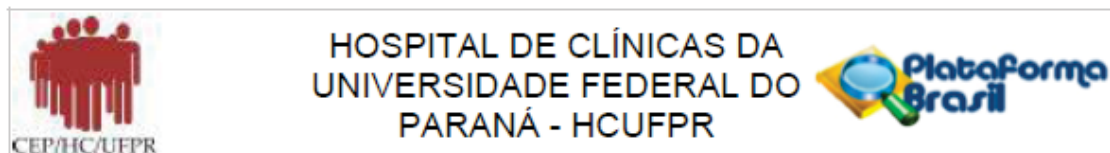
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.175.687

acatadas e sanadas pelo pesquisador, projeto considerado aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

CURITIBA, 07 de Agosto de 2015

---

**Assinado por:**  
**Renato Tambara Filho**  
 (Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181  
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900  
 UF: PR Município: CURITIBA  
 Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



## **PREDICTORS OF EARLY LEFT VENTRICULAR SYSTOLIC DYSFUNCTION IN DMD PATIENTS**

**Authors:** Raphael Henrique Déa Cirino<sup>a</sup> MD, Rosana Herminia Scola<sup>b,c</sup> MD

PhD, Renata Dal-Prá Ducci<sup>b,c</sup> MD PhD, Ana Cristina Camarozano

Wermelinger<sup>a</sup> MD PhD, Claudia Suemi Kamoi Kay<sup>b</sup> MD, Paulo José

Lorenzoni<sup>b,c</sup> MD PhD, Lineu Cesar Werneck<sup>b,c</sup> MD PhD, Eliane Ribeiro Carmes<sup>c</sup>

MD MSc, Claudio Leinig Pereira da Cunha<sup>a,c</sup> MD PhD

<sup>a</sup> Cardiology Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Neuromuscular Service, Neurology Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup> Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

### **Acknowledgements:**

Marcia Olandoski (Pontifícia Universidade Católica do Paraná) for statistical analysis

**Abstract word count:** 150.

**Manuscript word count:** 3,120.

**Corresponding author:** Raphael Henrique Déa Cirino – Service of Cardiology,

Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Rua General Carneiro, 181 – 12º andar, 80060-900 – Curitiba, PR, Brazil

Fax and phone number: (55)4132332845 / (55)4133606154

E-mail: [rapha\\_cirino@yahoo.com.br](mailto:rapha_cirino@yahoo.com.br)

**Running title:** Cardiopathy Predictors in DMD



**Ethical Publication Statement:** we confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

**Disclosure of Conflicts of Interest:** none of the authors has any conflict of interest to disclose. There is no sponsorship or funding in this study.

## Predictors of early left ventricular systolic dysfunction in DMD patients

### Abstract

**Introduction.** Early detection of left ventricular systolic dysfunction (LVSD) is important for therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients. We analyzed the myocardial strain by echocardiography for the early detection of LVSD and determined the predictors of early LVSD. **Methods.** Cross-sectional study of forty DMD patients with normal left ventricular ejection fraction. Global longitudinal strain (GLS) was used to analyse subtle disturbances in the longitudinal contraction of the myocardium. Patients were determined to have early LVSD [GLS>-18] or normal left ventricular systolic function [GLS≤-18]. **Results.** Patients who had early LVSD were older and had a higher frequency of corticosteroid therapy and of mutations in exons 45, 46, 47, 48, 49, 50 and 52. **Discussion.** Myocardial strain measurements are useful for the early diagnosis of LVSD in DMD patients. Older age, use of corticosteroids and mutations within the “hot spot” region of the *DMD* gene are associated with early LVSD.

**Key words:** Duchenne muscular dystrophy, Left ventricular dysfunction; Early diagnosis; Echocardiography; Myocardial strain; Speckle tracking

## Introduction

The life expectancy of Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients has improved over the years, but the management of cardiac complications is still one of the most important challenges in DMD therapy<sup>1,2</sup>. Most DMD patients develop cardiomyopathy, but the symptoms can be masked by severe musculoskeletal weakness<sup>3</sup>. Recently, cardiac-related mortality seems to be increased due to improvements in respiratory support<sup>4</sup>.

Conventional transthoracic echocardiography (TTE) evaluates left ventricular systolic function (LVSF) by analyzing parietal thickening and calculating left ventricular ejection fraction (LVEF). Myocardial strain is an emerging technique that measures myocardial deformation and is able to diagnose left ventricular systolic dysfunction (LVSD) even in the absence of reduced LVEF<sup>5,6,7,8</sup>.

Myocardial strain can be measured by tissue Doppler imaging or by speckle-tracking echocardiography. The latter utilizes the phenomenon in which natural acoustic markers in grey scale ultrasound images form interference patterns (speckles) within myocardial tissue, allowing myocardial strain analysis independently of the ultrasound angle<sup>6</sup>. Global longitudinal strain (GLS) is the most commonly used strain-based measure and reflects the longitudinal contraction of the myocardium<sup>8</sup>. The early detection of LVSD by myocardial strain measurements and the identification of its predictors may be important tools for screening, follow-up and the development of therapeutic strategies for DMD patients<sup>3,7,9,10</sup>.

The aim of this study was to analyze the value of myocardial strain measurements by echocardiography as a main tool for the early detection of LVSD in DMD patients. In addition, clinical features, laboratory data, genetic analyses and electrocardiographic features were correlated with TTE data to identify predictors of early LVSD.

## **Methods**

This was a cross-sectional study of consecutive DMD patients followed at the Neuromuscular Disorders Service of the Hospital de Clínicas of the Federal University of Parana in Curitiba, Brazil between January 2014 and June 2016. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas of the Federal University of Parana. Informed consent was obtained from all patients.

The data for the diagnosis of DMD and previous cardiac evaluations were collected through chart review. Patients and their relatives were interviewed during a prescheduled appointment, and TTE was performed on the patient; both were performed by the same researcher (RHDC).

The inclusion criteria was disease confirmed by a clinical course that was compatible with DMD and at least one of the following: (1) pathogenic mutation detected by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis or sequencing (Sanger sequencing) of the *DMD* gene or (2) dystrophin deficiency as determined by a muscle biopsy (immunohistochemistry)<sup>1,11,12,13</sup>.

We excluded patients who were unable to be present for the prescheduled medical appointment or the TTE examination or had a suboptimal echocardiographic view that prevented the proper evaluation of LVSF or overt LVSD (LVEF < 52%).

#### Clinical, laboratorial and electrocardiographic (ECG) features

The clinical, laboratory and electrocardiographic variables were as follows: age at medical assessment; delayed walk acquisition (walk acquisition at 1 year and 4 months or later)<sup>1</sup>; age at symptom onset; disease duration; gait loss; age at gait loss; distance walked on a 6-minute walk test (6-MWT)<sup>14,15</sup>; past or current use of corticosteroids; time of corticosteroid use; serum creatine kinase (CK) level (first serum CK measured); and left ventricular hypertrophy in the ECG using the Sokolow-Lyon or Cornell criteria<sup>16</sup>. Corticosteroids were routinely started at the time of confirmation of DMD diagnosis.

#### Genetic analysis

The genetic variables were the type of mutation, including deletions, duplications and small mutations (point mutations, small deletions or insertions and nonsense mutations); and the location of the mutation in the *DMD* gene. Regarding the location of the mutation in the *DMD* gene, the correlations were made in 4 different ways: (1) each exon individually, regardless of the type of mutation; (2) deletion of at least 1 exon within the “hot spot” region without mutations outside of the “hot spot” region versus deletion of at least 1 exon outside of the “hot spot” region without mutations within the “hot spot” region; (3) multiple-exon deletions within the “hot spot” region without mutations outside

of the "hot spot" region versus multiple-exon deletions outside of the "hot spot" region without mutations within the "hot spot" region; and (4) single-exon deletions versus multiple-exon deletions, independent of the location. The "hot spot" region in the *DMD* gene includes the region between exons 45 and 55<sup>17</sup>.

#### Immunohistochemical analysis

Dystrophin deficiencies in the carboxyl, rod and amino domains were evaluated in tissue from a muscle biopsy by immunohistochemical analysis<sup>11,18</sup>. Patients were divided into 2 groups: absence of dystrophin or presence of residual dystrophin in 'revertant fibers'.

#### TTE analysis

Myocardial strain analysis was derived from global longitudinal strain (GLS) measurements. LVEF was measured by 3-dimensional TTE, and GLS was measured by 2-dimensional TTE with the speckle tracking technique, following the recommendations from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging<sup>8</sup>. LVEF was considered normal if it was equal to or greater than 52%, as defined in recent guidelines for male patients<sup>8</sup>. GLS was considered normal if it was equal to or less than -18%<sup>19,20,21,22</sup>. The DMD patients with normal LVEF ( $\geq 52\%$ ) were classified, based on TTE features, into the normal LVSF group ( $GLS \leq -18\%$ ) and the early LVSD group ( $GLS > -18\%$ ). TTE was performed in all patients by the same researcher (RHDC) with the Matrix probe of the Philips IE33 machine.

#### Statistical analysis

Independent samples Student's t-test was used to compare continuous variables in the studied groups. For qualitative variables, the comparison was made using Fisher's exact test. Due to the small sample size, it was not possible to evaluate more than 2 variables at a time in the logistic regression analysis for early LVSD. Since patient age is a factor associated with the development of heart disease<sup>23</sup>, we adjusted bivariate logistic regression models for variables with  $p < 0.05$  in the univariate analysis, when possible, including age as covariate. After adjustment, the Wald test was used to assess the significance of the variables included in the model, estimating odds ratios with 95% confidence intervals. P values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Data were analyzed with IBM SPSS v.20.

## **Results**

Fifty-four patients were eligible for inclusion, but 14 patients were excluded from the study due to refusal to participate (1 patient), an inability to be present for the TTE (4 patients), an inadequate TTE window (3 patients) and overt LVSD (6 patients). The study population consisted of 40 DMD male patients aged 2 to 19 years (median: 10.5 years; mean:  $10.7 \pm 3.9$  years). Only 18 patients were still walking. Thirty-one patients used corticosteroids (Table 1). The mean time of corticosteroid use was  $2.0 \pm 2.3$  years in patients with normal LVSF and  $5.0 \pm 3.0$  years in patients with early LVSD ( $p=0.010$ ). The clinical, laboratory and ECG characteristics are summarized in Table 1.

### Genetic analysis

All patients underwent genetic analysis. In the *DMD* gene, deletions were detected in 26 (65.0%) patients, duplications in 4 (10.0%) patients and small mutations in 8 (20.0%) patients (4 with small deletions, 3 with nonsense mutations and 1 with splice site mutation). In 2 patients (5.0%), pathogenic mutations were not found by Sanger sequencing despite dystrophin deficiency in muscle biopsies. The exon most commonly affected was 48 (30.0%), followed by 49 (27.5%), 50 (27.5%), 45 (20.0%), 46 (20.0%), 47 (20.0%) and 51 (17.5%). Considering only patients with deletions, 19 (73.1%) patients had a deletion that involved at least 1 exon within the "hot spot" region without mutations outside of the "hot spot" region and 13 (50.0%) patients had a deletion that involved more than 1 exon within the "hot spot" region without mutations outside of the "hot spot" region. Regarding the number of deleted exons, 8 (30.8%) patients had a single deletion and 18 (69.2%) patients had multiple deletions.

#### Immunohistochemical analysis

Muscle biopsies were performed in 15 (37.5%) patients. Immunohistochemical analysis of dystrophin revealed an absence of the carboxyl domain in 13 (86.7%) patients, the rod domain in 10 (66.7%) patients and the amino domain in 8 (53.3%) patients. An absence of all 3 domains of dystrophin was detected in 8 (53.3%) patients.

#### TTE analysis

Twenty (50.0%) patients had early LVSD. The remaining 20 patients had normal LVSF as determined by GLS measurements. The mean LVEF



determined by 3-dimensional echocardiography was  $63.3 \pm 5.6\%$  (median:  $63.0\%$ ; range:  $52.0$  to  $75.9\%$ ). The mean GLS measured by 2-dimensional echocardiography was  $-17.6 \pm 2.5\%$  (median:  $-17.5\%$ ; range:  $-21.0$  to  $-12.0\%$ ). In patients with early LVSD, the mean LVEF was  $62.2 \pm 6.3\%$  (median:  $61.5\%$ ; range:  $52.0$  to  $75.9\%$ ) and the mean GLS was  $-15.5 \pm 1.6\%$  (median:  $-16.0\%$ ; range:  $-17$  to  $-12\%$ ). In patients with normal LVSF, the mean LVEF was  $64.4 \pm 4.7\%$  (median:  $65.6\%$ ; range:  $56.2$  to  $73.5\%$ ) and the mean GLS was  $-19.6 \pm 1.0\%$  (median:  $-19.5\%$ ; range:  $-21$  to  $-18\%$ ).

#### Correlation between LVSF and other variables

The comparison between DMD patients showed older age, longer disease duration and higher frequency of gait loss and of corticosteroid therapy in patients with early LVSD. Considering the other clinical, laboratory, immunohistochemical and ECG characteristics, there were no significant differences between the groups (Table 2).

#### Correlation between LVSF and genetic analysis

Patients with early LVSD more frequently presented with involvement of exons 45, 46, 47, 48, 49, 50 and 52 (Table 3). The logistic regression model was adjusted for the analysis of exons 45 (OR 9.6, 95% CI 0.90-102.8,  $p=0.053$ ) and 50 (OR 36.1, 95% CI 2.15-604.0,  $p=0.010$ ). Considering only patients with a deletion-type mutation, exons 46 (0% vs. 47.1%,  $p=0.023$ ), 47 (0% vs. 47.1%,  $p=0.023$ ), 48 (0% vs. 70.6%,  $p=0.001$ ), 49 (0% vs. 64.7%,  $p=0.002$ ) and 50 (11.1% vs. 58.8%,  $p=0.036$ ) remained more frequently affected in patients with early LVSD, whereas exon 11 (33.3% vs. 0%,  $p=0.032$ ) was more frequently

affected in patients with normal LVSF. The logistic regression model was adjusted for the analysis of exon 50 (OR 17.7, 95% CI 1.00-363.6,  $p=0.049$ ). Deletion of multiple exons within the "hot spot" region without deletions outside of the "hot spot" region was most frequent among patients with early LVSD ( $p=0.022$ ).

## **Discussion**

In this study, among 40 boys with normal LVEF ( $\geq 52\%$ ), 50% presented with early LVSD (GLS  $>-18\%$ ). Our data showed that echocardiographic myocardial strain analysis can detect LVSD before the reduction of the LVEF in a large number of DMD patients. Other studies have demonstrated similar results, showing that echocardiographic myocardial strain can be used to detect early LVSD<sup>9,24,25,26</sup>.

The group with early LVSD was older and had a longer duration of the disease and a higher frequency of gait loss, which correlates with the findings of Spurney and colleagues, which showed that the development of cardiomyopathy in DMD patients was associated with the patient's age and the clinical stage of the disease<sup>23</sup>. Interestingly, a higher frequency of corticosteroid use was correlated with early LVSD. In addition, time of corticosteroid use was greater in patients with early LVSD than with no LVSD, but, as patients with early LVSD were older, this data might reflect the age difference between the two groups. One experimental study demonstrated that an excess of corticosteroids can induce pathophysiological changes of the myocardium and

cardiac remodeling via the angiotensin-II signaling pathway<sup>27</sup>. Another experimental study showed that dexamethasone may induce cardiac dysfunction through the impairment of calcium kinetics<sup>28</sup>. Janssen and colleagues demonstrated that prednisolone may attenuate the improvement in cardiac function of mice taking lisinopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, and spironolactone, an aldosterone antagonist<sup>29</sup>. Nevertheless, a recent report from the American Academy of Neurology showed that the use of prednisone or deflazacort is associated with a delayed onset of cardiomyopathy<sup>30</sup>. Therefore, considering that it was not possible to adjust the bivariate logistic regression model for corticosteroid therapy and age and that there are conflicting results regarding the use of corticosteroids in the literature, as mentioned above, we suggest maintaining the use of corticosteroids, but with attention to proper dosing and with early cardiomyopathy screening in these patients.

The frequency of mutations in the *DMD* gene concurred with the literature data. Two patients had no mutations in the *DMD* gene, probably due to the inability of MLPA and Sanger sequencing to detect all types of mutations, such as intronic mutations<sup>17</sup>. As expected, the most commonly affected exons were within the “hot spot” region of the *DMD* gene<sup>17,31</sup>.

The genotype-phenotype correlation (clinical severity) in DMD patients followed the reading frame rule in most cases. These patients usually present mutations that disrupt the reading frame or generate a premature stop codon, making it impossible to produce a functional dystrophin. However, there are some

exceptions; for example, patients with DMD and mutations flanking exon 44 have a slightly milder phenotype, with a later loss of ambulation<sup>17</sup>. Some mutations in the DMD gene were associated with different ages of onset, severity and degree of cardiomyopathy progression. Nevertheless, these associations were not completely understood<sup>3,17,32,33</sup>. We found a higher frequency of involvement of exons 45, 46, 47, 48, 49, 50 and 52 in patients with early LVSD. In addition, multiple-exon deletions within the "hot spot" region without deletions outside of the "hot spot" region were most frequent among these patients. These findings suggest a possible association between these mutation sites and early LVSD. One study demonstrated a possible association between mutations in exons 12, exons 14 to 17 and exons 31 to 42 and the development of dilated cardiomyopathy, whereas mutations in exons 51 and 52 were associated with a lower risk of cardiac involvement<sup>34</sup>. However, that study included DMD and Becker muscular dystrophy patients, and the parameter for the diagnosis of LVSD was reduced ejection fraction, which manifests at a later time than changes in myocardial strain.

In our study, no correlation was found between the absence of dystrophin and early LVSD. The small number of patients who underwent a muscle biopsy (immunohistochemical analysis) may have played a role in these results.

This study has some limitations. First, it was a cross-sectional study and may only suggest a cause-and-effect relationship between variables even though some variables, such as genetic mutations, represent inborn characteristics of these patients. Second, our patient population was recruited from a single

center at a tertiary hospital; however, it is a referral center for the treatment of neuromuscular disorders, and patients are referred from all over the state as well as other regions of the country. The variability of normal values of GLS is wide. The cut-off value of -18 seemed appropriate because it was derived from previous studies involving healthy children who represented the age groups of the patients included in our study<sup>19,20,21,22</sup>. Finally, it was not possible to make multiple comparisons between variables such as age, duration of disease, gait loss, use of corticosteroids and affected exons, because the sample size was small and the frequency of some variables was very low in the compared groups.

We found that half of DMD patients could benefit from the echocardiographic myocardial strain analysis for the detection of early LVSD. Besides that, we evaluated the predictors of early LVSD. Use of corticosteroids and specific mutations in the *DMD* gene were identified as possible predictors of early LVSD. These findings may justify changes in cardiomyopathy screening strategies in DMD patients. The importance of the early detection of LVSD lies in the fact that early initiation of specific treatments could prevent the progression of cardiomyopathy and, eventually, improve cardiac function as well as prevent serious complications, such as sudden death, which is increasingly frequent among this population<sup>3,9,10,34</sup>. Further studies are required to confirm these findings and to establish their impact on the clinical management of DMD patients.

Myocardial strain measurement is a useful tool for the early diagnosis of LVSD in DMD patients. The results of this study suggest that older age, longer disease duration, gait loss, use of corticosteroids and mutations in the *DMD* gene within the “hot spot” region, affecting single or multiple exons, especially exons 46 to 50, are predictors of early LVSD.

## Abbreviations

6-MWT – 6-minute walk test.

CK – creatine kinase.

DMD – Duchenne muscular dystrophy.

ECG – electrocardiogram.

GLS – global longitudinal strain.

LVEF – left ventricular ejection fraction.

LVSD – left ventricular systolic dysfunction.

LVSF – left ventricular global systolic function.

MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification.

NS – non-significant.

SD – standard deviation.

TTE – transthoracic echocardiography.

## **Acknowledgements**

We are grateful to Professor Marcia Olandoski (PhD) of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná for her statistical analysis.



## References

1. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 2010;9(1):77-93.
2. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol* 2010;9(2):177-189.
3. Ashwath ML, Jacobs IB, Crowe CA, Ashwath RC, Super DM, Bahler RC. Left ventricular dysfunction in duchenne muscular dystrophy and genotype. *Am J Cardiol* 2014;114(2):284-289.
4. Birnkrant DJ, Ararat E, Mhanna MJ. Cardiac phenotype determines survival in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatric Pulmonology* 2016;51(1):70-76.
5. Collier P, Phelan D, Klein A. A Test in Context: Myocardial Strain Measured by Speckle-Tracking Echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 2017;69(8):1043-1056.
6. Smiseth OA, Torp H, Opdahl A, Haugaa KH, Urheim S. Myocardial strain imaging: how useful is it in clinical decision making? *Eur Heart J* 2016;37(15):1196-1207.

7. Abduch MC, Alencar AM, Mathias W Jr, Vieira ML. Cardiac mechanics evaluated by speckle tracking echocardiography. *Arq Bras Cardiol* 2014;102(4):403-412.
8. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2015;28(1):1-39.
9. Jo WH, Eun LY, Jung JW, Choi JY, Gang SW. Early Marker of Myocardial Deformation in Children with Duchenne Muscular Dystrophy Assessed Using Echocardiographic Myocardial Strain Analysis. *Yonsei Med J* 2016;57(4):900-904.
10. Fayssoil A, Abasse S, Silverston K. Cardiac Involvement Classification and Therapeutic Management in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis* 2017;4(1)17-23.
11. Werneck LC, Ferraz LE, Scola RH. Early differentiation between Duchenne and Becker muscular dystrophy: clinical, laboratory, electrophysiology, histochemical, and immunohistochemical study of 138 cases. *Arq Neuropsiquiat* 1992;50(4):468-477.

12. Okubo M, Minami N, Goto K, Goto Y, Noguchi S, Mitsuhashi S, et al. Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. *J Hum Genet* 2016;61(6):483-489.
13. Werneck LC, Scola RH, Maegawa GH, Werneck MC. Comparative analysis of PCR-deletion detection and immunohistochemistry in Brazilian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Genet* 2001;103(2):115-120.
14. Henricson E, Abresch R, Han JJ, Nicorici A, Goude Keller E, Elfring G, et al. Percent-predicted 6-minute walk distance in duchenne muscular dystrophy to account for maturational influences. *PLoS Curr* 2012;4:RRN1297.
15. McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence JM, Eagle M, Gappmaier E, et al. The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. *Muscle Nerve* 2013;48(3):343-356.
16. Pastore CA, Pinho C, Germiniani H, Samesima N, Mano R, et al. Guidelines of Sociedade Brasileira de Cardiologia about analysis and issuance of expert opinion in electrocardiographic. *Arq Bras Cardiol* 2009;93(3 Suppl 2):2-19.
17. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 2016;53(3):145-151.

18. Freund AA, Scola RH, Arndt RC, Lorenzoni PJ, Kay CK, Werneck LC. Duchenne and Becker muscular dystrophy: a molecular and immunohistochemical approach. *Arq Neuropsiquiatr* 2007;65(1):73-76.
19. Jashari H, Rydberg A, Ibrahim P, Bajraktari G, Kryeziu L, Jashari F, et al. Normal ranges of left ventricular strain in children: a meta-analysis. *Cardiovascular Ultrasound* 2015;13:37.
20. Levy PT, Machefsky A, Sanchez AA, Patel MD, Rogal S, Fowler S, et al. Reference Ranges of Left Ventricular Strain Measures by Two-Dimensional Speckle Tracking Echocardiography in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Soc Echocardiogr* 2016;29(3):209-225.
21. Labombarda F, Leport M, Morello R, Ribault V, Kauffman D, Brouard J, et al. Longitudinal left ventricular strain impairment in type 1 diabetes children and adolescents: A 2D speckle strain imaging study. *Diabetes Metab* 2014;40(4):292-298.
22. Patrianakos AP, Zacharaki AA, Kalogerakis A, Solidakis G, Parthenakis FI, Vardas PE. Two-dimensional global and segmental longitudinal strain: are the results from software in different high-end ultrasound systems comparable? *Echo Res Pract* 2015;2(1)29-39.

23. Spurney C, Shimizu R, Morgenroth LP, Kolski H, Gordish-Dressman H, Clemens PR, et al. Cooperative International Neuromuscular Research Group Duchenne Natural History Study demonstrates insufficient diagnosis and treatment of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2014;50(2):250-256.
24. Yamamoto T, Tanaka H, Matsumoto K, Lee T, Awano H, Yagi M, et al. Utility of transmural myocardial strain profile for prediction of early left ventricular dysfunction in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Cardiol* 2013;111(6):902-907.
25. Ogata H, Nakatani S, Ishikawa Y, Negishi A, Kobayashi M, Ishikawa Y, et al. Myocardial strain changes in Duchenne muscular dystrophy without overt cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2007;115(2):190-195.
26. Taqatqa A, Bokowski J, Al-Kubaisi M, Khalil A, Miranda C, Alaksham H, et al. The Use of Speckle Tracking Echocardiography for Early Detection of Myocardial Dysfunction in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatr Cardiol* 2016;37(8):1422-1428.
27. Roy SG, De P, Mukherjee D, Chander V, Konar A, Bandyopadhyay D, et al. Excess of glucocorticoid induces cardiac dysfunction via activating angiotensin II pathway. *Cell Physiol Biochem* 2009;24(1-2):1-10.

28. De P, Roy SG, Kar D, Bandyopadhyay A. Excess of glucocorticoid induces myocardial remodelling and alteration of calcium signalling in cardiomyocytes. *J Endocrinol* 2011;209(1):105-114.

29. Janssen PM, Murray JD, Schill KE, Rastogi N, Schultz EJ, Tran T, et al. Prednisolone attenuates improvement of cardiac and skeletal contractile function and histopathology by lisinopril and spironolactone in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2014;9(2):e88360.

30. Gloss D, Moxley RT 3rd, Ashwal S, Oskoui M. Practice guideline update summary: Corticosteroid treatment of Duchenne muscular dystrophy: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2016;86(5):465-472.

31. Zhong J, Xu T, Chen G, Liao H, Zhang J, Lan D. Genetic analysis of the dystrophin gene in children with Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2016;56(1):117-121.

32. Tsuda T, Fitzgerald K, Scavena M, Gidding S, Cox MO, Marks H, et al. Early-progressive dilated cardiomyopathy in a family with Becker muscular dystrophy related to a novel frameshift mutation in the dystrophin gene exon 27. *J Hum Genet* 2015;60(3):151-155.

33. Barp A, Bello L, Politano L, Melacini P, Calore C, Polo A, et al. Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy. PLoS ONE 2015;10(10):e0141240.

34. Jefferies JL, Eidem BW, Belmont JW, Craigen WJ, Ware SM, Fernbach SD, et al. Genetic predictors and remodeling of dilated cardiomyopathy in muscular dystrophy. Circulation 2005;112(18):2799-2804.

TABLE 1 – CLINICAL, LABORATORY AND ELECTROCARDIOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION

Variables	DMD patients
Age (n=40; mean±SD)	10.7±3.9 years
Age of onset of ambulation (n=40; mean±SD)	18.8±8.0 months
Age of symptom onset (n=39; median, range)	3.0 years (1.0-7.0)
Duration of disease (n=39; mean±SD)	6.9±3.9 years
Gait loss (n=40)	22 (55.0%)
Age at gait loss (n=22; mean±SD)	9.4±1.9 years
Distance walked in the 6-MWT (n=18; mean±SD)	257.9±76.0 meters
Serum CK level (n=37; mean±SD)	12,151±6,695 mg/dL
Left ventricular hypertrophy on ECG (n=39)	14 (35.9%)
Corticosteroid therapy (n=40)	31 (77.5%)

6-MWT – 6-minute walk test; CK – creatinekinase; ECG – electrocardiogram; and SD – standard deviation.



TABLE 2 – CORRELATION OF CLINICAL, LABORATORY,  
IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ELECTROCARDIOGRAPHIC VARIABLES  
WITH EARLY LEFT VENTRICULAR SYSTOLIC DYSFUNCTION

Variables	Normal LVSF (GLS≤-18%)		Early LVSD (GLS>-18%)		P value
	n	Mean±SD or n(%)	n	Mean±SD or n(%)	
Age (years)	20	9.2±3.7	20	12.2±3.7	0.014*
Disease duration (years)	20	5.5±3.2	19	8.5±3.9	0.003*
Corticosteroid therapy	20	11 (55%)	20	20 (100%)	0.001 <sup>†</sup>
Delayed walk acquisition	20	9 (45%)	20	10 (50%)	1.000 <sup>†</sup>
Gait loss	20	7 (35%)	20	15 (75%)	0.025 <sup>†</sup>
Age at gait loss (years)	7	8.3±1.5	15	9.9±1.8	0.062*
Distance walked in the 6-MWT (meters)	13	275.7±66.1	5	209.2±86.4	0.097*
Serum CK level (mg/dL)	18	11,272±6,669	19	12,984±6,794	0.445*
Left ventricular hypertrophy on ECG	19	7 (37%)	20	7 (35%)	1.000 <sup>†</sup>
Absence of the carboxyl terminal of dystrophin	11	10 (91%)	4	3 (75%)	0.476 <sup>†</sup>
Absence of the rod domain of dystrophin	11	7 (64%)	4	3 (75%)	1.000 <sup>†</sup>

Variables	Normal LVSF (GLS≤-18%)		Early LVSD (GLS>-18%)		P value
	n	Mean±SD or n(%)	n	Mean±SD or n(%)	
Absence of the amino terminal of dystrophin	11	6 (54.5%)	4	2 (50%)	1.000 <sup>†</sup>
Absence of all three domains of dystrophin	11	6 (54.5%)	4	2 (50%)	1.000 <sup>†</sup>

n – number of patients in each group; GLS – global longitudinal strain; 6-MWT – 6-minute walk test; CK – creatine kinase; ECG – electrocardiogram; and SD – standard deviation. \*t Student test for independent samples; and <sup>†</sup>Fisher's exact test.

TABLE 3 – CORRELATION BETWEEN EARLY LEFT VENTRICULAR SYSTOLIC DYSFUNCTION AND EXON MUTATION IN THE *DMD* GENE

Exon	Normal LVSF (GLS≤-18%) (n=20)	Early LVSD (GLS>-18%) (n=20)	P value <sup>†</sup>
1-44	10	5	NS
45	1	7	0.044
46	0	8	0.003
47	0	8	0.003
48	0	12	<0.001
49	0	11	<0.001
50	1	10	0.003
51	2	5	0.408
52	0	5	0.047
53-79	4	3	NS

"n" corresponds to the number of patients with a mutation in that exon, but these patients may have mutations in other exons as well; two patients did not present mutations. GLS – global longitudinal strain; and NS – non-significant.

<sup>†</sup>Fisher's exact test.