UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LARISSA DE OLIVEIRA OKAMA

Avaliação da função mitocondrial muscular e sua repercussão na capacidade funcional nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne

Ribeirão Preto

2018

LARISSA DE OLIVEIRA OKAMA

Avaliação da função mitocondrial muscular e sua repercussão na capacidade funcional nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne

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

Área de concentração: Neurologia.

Orientadora: Profa Dra Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Okama, Larissa de Oliveira

Avaliação da função mitocondrial muscular e sua repercussão na capacidade funcional nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne. Ribeirão Preto, 2018.

90 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Sobreira, Cláudia Ferreira da Rosa.

1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Mitocôndria. 3. Coenzima Q10. 4. Cadeira respiratória. 5. Capacidade funcional.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Okama, L. O. Avaliação da função mitocondrial muscular e sua repercussão na capacidade funcional nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne.

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

Área de concentração: Neurologia.

Aprovado(a) em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Luiz Kazuo e Edenice, a quem eu agradeço a minha existência e a forma como eles me ensinaram a ver a vida. Vocês são tudo para mim!

Aos meus irmãos Rodrigo e Júnior e minha avó Terezinha, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram em cada etapa de minha vida. Eu amo vocês!

E ao meu esposo Luiz Cesar, uma pessoa muito especial, que me deu força nas horas mais difíceis, sem palavras para agradecer sua compreensão, carinho e incansável apoio durante esta trajetória. Você é o amor da minha vida!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Profa Dra Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, minha orientadora, pela confiança, pela paciência e dedicação.

Agradecerei eternamente por todos os ensinamentos durante esses anos de convivência.

Obrigada por me guiar nesta trajetória de crescimento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os participantes deste trabalho, bem como seus familiares pela valiosa contribuição na composição da amostra do estudo.

Agradeço a Silvia, sempre presente e disposta a ajudar, obrigada pela colaboração neste trabalho. Sou muito grata a você.

Agradeço a Thaisa, pela agradável convivência, conselhos e contribuição na realização deste estudo.

Agradeço ao Renato, pela colaboração e gentileza em participar desta pesquisa.

Agradeço as amigas Karolina e Marjory, pela amizade e parceria.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Neurologia, do Centro de Reabilitação do HCFMRP-USP e aos residentes do ANEM, que direta ou indiretamente contribuíram para realização da coleta dos dados.

Ao programa CAPES pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

“Não deve haver limites para o esforço humano. Somos todos diferentes. Por pior que a vida possa parecer, sempre há algo que podemos fazer em que podemos obter sucesso. Enquanto houver vida, haverá esperança”.

Stephen Hawking

RESUMO

OKAMA, L. O. **Avaliação da função mitocondrial muscular e sua repercussão na capacidade funcional nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne.** 2018. 90 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária, degenerativa e progressiva dos músculos esqueléticos. É causada pela ausência da proteína distrofina e caracterizada pela perda progressiva da força muscular e deterioração da capacidade funcional. Alterações na regulação da homeostase do cálcio, proteólise e alterações metabólicas, especialmente mitocondriais, são parte da patogênese da doença. A coenzima Q (CoQ₁₀), potente antioxidante que participa da atividade da cadeia respiratória, tem sido utilizada em ensaios clínicos, entretanto, não há estudos que evidencie seu comprometimento na DMD. O objetivo deste estudo foi avaliar a CoQ₁₀ e a da atividade da cadeia respiratória em fragmentos de biópsia muscular de pacientes com DMD e sua correlação com parâmetros clínicos e a capacidade funcional. O estudo constitui de uma etapa retrospectiva, onde foram analisadas 22 biópsias musculares de pacientes com DMD, e outra prospectiva, onde foram avaliados dez pacientes com DMD. Dez pacientes controles foram utilizados nas duas etapas do estudo. A concentração da CoQ₁₀ foi realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta performance de fase reversa. As atividades das enzimas da cadeia respiratória foram medidas através de técnicas espectrofotométricas. A capacidade funcional foi mensurada através das escalas Medida da Função Motora (MFM) e Escala de Avaliação para deambulantes *North Star* (NSAA), e dos testes cronometrados: tempo para percorrer 10 metros (T10), tempo para realizar a manobra de Gowers (TGowers) e teste da caminhada dos 6 minutos (TC6min). Fase retrospectiva: a média de idade dos pacientes com DMD foi de 6,9 anos, (DP $\pm$ 2,4) e controles de 8 anos, (DP $\pm$ 2,69). A dosagem média de CoQ₁₀ nos fragmentos de pacientes com DMD foi de 8,6 μ g/g de tecido (DP $\pm$ 3,9) e nos fragmentos dos controles foi de 31,6 μ g/g de tecido (DP $\pm$ 6,9). A média da área ocupada por fibras musculares nos pacientes com DMD foi de 27,3% (DP $\pm$ 14,2%) e nos controles foi de 89,2% (DP $\pm$ 3,3%). Evidenciou-se alta correlação entre a

quantidade de CoQ₁₀ e a área relativa ocupada por fibras musculares ($r= 0,767$ e $p= 0,016$). As atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória dos pacientes com DMD não demonstraram deficiência. Já o resultado do ensaio conjunto dos complexos II+III, encontra-se significativamente reduzido nos pacientes com DMD. Etapa prospectiva: a média de idade dos pacientes com DMD foi de 6,5 anos, (DP $\pm 2,4$). A dosagem média de CoQ₁₀ nos fragmentos de pacientes com DMD foi de 12,6 $\mu\text{g/g}$ de tecido (DP $\pm 5,1$). A média da área ocupada por fibras musculares nos pacientes com DMD foi de 40,3% (DP $\pm 20,4\%$). Houve alta correlação entre a quantidade de CoQ₁₀ e a área relativa ocupada por fibras musculares ($r= 0,690$ e $p= 0,058$). A correlação da dosagem da CoQ₁₀ com os instrumentos de avaliação da capacidade funcional foi alta com o TGowers e moderada com MFM total e dimensões 1 e 2, NSAA, T10 e TC6min. Em relação à área relativa de fibras musculares, houve moderada correlação com a dimensão 1 da MFM e com o TGowers. Não houve correlação da CoQ₁₀ e da área relativa ocupada por fibras musculares com os parâmetros clínicos: idade no momento da biópsia, idade do início dos sintomas e tempo de evolução da doença. No presente estudo, concluímos que existe uma deficiência secundária de CoQ₁₀ em pacientes com DMD, a qual contribui para entender a fisiopatologia da doença e com grande relevância para as propostas terapêuticas.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchenne, mitocôndria, coenzima Q10, cadeia respiratória, capacidade funcional.

ABSTRACT

OKAMA, L. O. **Assessment of mitochondrial function in muscle and its relation to functional capacity in patients with Duchenne muscular dystrophy.** 2018. 90 pages. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a hereditary, degenerative and progressive skeletal muscles disease. It is caused by the absence of the protein dystrophin and characterized by progressive loss of muscle strength and deterioration of functional capacity. Alterations in the regulation of calcium homeostasis, proteolysis and metabolic abnormalities, especially mitochondrial dysfunction, are part of the pathogenesis of the disease. Coenzyme Q (CoQ₁₀), a potent antioxidant that participates in respiratory chain activity, has been used in clinical trials, however, there are no studies showing its involvement in DMD. The purpose of this study was to investigate CoQ₁₀ content and respiratory chain activity in muscle biopsy of patients with DMD and its correlation with clinical parameters and functional capacity. The study consisted of a retrospective phase, in which 22 muscle biopsies from patients with DMD were analyzed, and a prospective phase, where ten patients with DMD were evaluated. The same control group of ten patients were used in the two phases of the study. The concentration of CoQ₁₀ was measured using the reverse phase high performance liquid chromatography technique. Activities of the respiratory chain enzymes were measured by spectrophotometry. The functional capacity was evaluated using the Motor Function Measurement (MFM) and North Star Ambulatory Assessment (NSAA) and the following timed tests: to run 10 meters (T10), to perform the Gowers maneuver (TGowers) and the 6-minute walk test (6MWT). Retrospective phase: the mean age of patients with DMD was 6.9 years (SD $\pm$ 2.4) and of controls was 8 years (SD $\pm$ 2.69). The mean CoQ₁₀ content in fragments from patients with DMD was 8.6 μ g / g tissue (DP $\pm$ 3.9) and in fragments from controls was 31.6 μ g / g tissue (DP $\pm$ 6.9). The mean area occupied by muscle fibers in patients with DMD was 27.3% (SD $\pm$ 14.2%) and in controls was 89.2% (SD $\pm$ 3.3%). There was a high correlation between the amount of CoQ₁₀ and the relative area occupied by muscle fibers ($r= 0.767$ and $p= 0.016$). The activities of respiratory chain enzymes from patients with DMD were not deficient. On the other hand, the results of the combined analysis of complexes II + III were significantly reduced in patients with DMD. Prospective phase: the mean age of patients with DMD was 6.5 years (SD $\pm$ 2.4). The mean CoQ₁₀ content in fragments from patients with DMD was 12.6 μ g / g tissue (SD $\pm$ 5.1). The mean area occupied by muscle fibers in patients with DMD was 40.3% (SD $\pm$ 20.4%). There was a high correlation between the amount of CoQ₁₀ and the relative area occupied by muscle fibers ($r= 0.690$ and $p= 0.058$). The correlation between the amount of CoQ₁₀ and the functional capacity assessment instruments was high for

TGowers and moderate for MFM total and dimensions 1 and 2, NSAA, T10 and TC6min. Regarding the relative area of muscle fibers, there was a moderate correlation with MFM dimension 1 (standing position and transfers) and TGowers. There was no correlation between CoQ₁₀ and relative area occupied by muscle fibers with clinical parameters: age at time of biopsy, age of onset of symptoms and time of disease progression. In the present study, we conclude that there is a secondary deficiency of CoQ₁₀ in patients with DMD, which contributes for the understanding of its physiopathology and is relevant for therapy.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, mitochondria, coenzyme Q10, respiratory chain, functional capacity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina-5'-difosfato
ANEM	Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-FMRP-USP
ATP	Adenosina trifosfato
CK	Enzima creatina quinase
CoQ	Coenzima Q, ubiquinona
D1	Dimensão 1 da MFM – posição em pé e transferências
D2	Dimensão 2 da MFM – função motora axial e proximal
D3	Dimensão 3 da MFM – função motora distal
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
FADH ₂	Dinucleotidio de flavina e adenina reduzido
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HC-FMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
kDa	Kilodaltons
MFM	Medida da Função Motora
NADH	Dinucleotidio de nicotinamida e adenina reduzido
NSAA	Escala de Avaliação para deambulantes <i>North Star</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TC6min	Teste da Caminhada dos 6 minutos
T10	Tempo para percorrer 10 metros
TGowers	Tempo para realizar a manobra de Gowers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da distribuição e extensão das deleções e duplicações no gene <i>DMD</i> nos pacientes avaliados.....	35
Figura 2. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente com <i>DMD</i> aos 5,9 anos de idade.....	44
Figura 3. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente com <i>DMD</i> aos 9 anos de idade.....	45
Figura 4. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente controle aos 10 anos de idade.....	45
Figura 5. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente com <i>DMD</i> aos 8,7 anos de idade.....	50
Figura 6. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente com <i>DMD</i> aos 6,1 anos de idade.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do diagnóstico molecular dos pacientes com DMD.....	34
Tabela 2. Quantificação de CoQ ₁₀ nas biópsias musculares – etapa retrospectiva.....	43
Tabela 3. Área relativa de fibras musculares e quantificação da CoQ ₁₀ em pacientes com DMD – etapa retrospectiva.....	46
Tabela 4. Ensaio enzimático da cadeia respiratória e da citrato sintase.....	47
Tabela 5. A atividade dos complexos II+III da cadeia respiratória sem e com adição de CoQ ₁₀	48
Tabela 6. Caracterização dos pacientes com DMD (n=10) – etapa prospectiva.....	48
Tabela 7. Quantificação de CoQ ₁₀ nos pacientes e controles – etapa prospectiva.....	49
Tabela 8. Área relativa de fibras musculares e quantificação da CoQ ₁₀ em pacientes com DMD – etapa prospectiva.....	51
Tabela 9. Estatística descritiva dos instrumentos de avaliação da capacidade funcional dos pacientes com DMD.....	52
Tabela 10. Correlação da dosagem da CoQ ₁₀ e da área relativa de fibras musculares com parâmetros clínicos.....	53
Tabela 11. Correlação da CoQ ₁₀ com os instrumentos de avaliação da capacidade funcional.....	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos clínicos e funcionais da distrofia muscular de Duchenne	18
1.1.1 Definição.....	18
1.1.2 Histórico.....	18
1.1.3 Quadro clínico.....	20
1.1.4 Capacidade funcional	22
1.1.5 Diagnóstico e tratamento	24
1.2 Etiopatogenia e fisiopatologia da DMD	26
1.2.1 Mecanismos gerais.....	26
1.2.2 Disfunção mitocondrial.....	27
1.2.3 Coenzima Q.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivos gerais.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. HIPÓTESES DO ESTUDO.....	32
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
4.1 Casuística.....	33
4.1.1 Grupo de pacientes do estudo retrospectivo	35
4.1.2 Grupo de pacientes do estudo prospectivo	36
4.1.3 Grupo controle	36
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Biópsia muscular.....	37
4.2.2 Análise morfométrica	37
4.2.3 Quantificação da CoQ ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular.....	38
4.2.4 Análise das atividades das enzimas da cadeia respiratória	38
4.2.5 Avaliação da capacidade funcional	39
4.3 Análise estatística	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1 Etapa retrospectiva	43
5.1.1 Casuística	43
5.1.2 Quantificação de CoQ ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular.....	43
5.1.3 Dosagem de CoQ ₁₀ e a sua relação com a perda de fibras musculares	44
5.1.4 Ensaio enzimáticos da cadeia respiratória	47

5.2 Etapa prospectiva.....	48
5.2.1 Casuística	48
5.2.2 Quantificação de CoQ ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular.....	49
5.2.3 Dosagem de CoQ ₁₀ e a sua relação com a perda de fibras musculares	49
5.2.4 Avaliação da capacidade funcional	52
5.2.5 Correlação da CoQ ₁₀ com parâmetros clínicos e avaliação da capacidade funcional.....	53
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS	71
APÊNDICES	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos clínicos e funcionais da distrofia muscular de Duchenne

1.1.1 Definição

O termo distrofia muscular descreve um grupo de doenças geneticamente determinadas, caracterizadas por acometimento muscular causando fraqueza progressiva. As distrofias musculares são classificadas de acordo com a distribuição da fraqueza muscular, o modo de hereditariedade e o gene envolvido. A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum das distrofias musculares da infância e acomete cerca de 1 a cada 3500 – 5000 meninos nascidos vivos (EMERY, 1991; MAH et al, 2014; STARK, 2015).

A DMD apresenta gravidade acentuada, com início precoce e rápida evolução. Acomete de forma simétrica predominantemente a cintura pélvica e a região proximal dos membros inferiores e, posteriormente, progride para a cintura escapular, tronco e a porção distal dos membros. Há um padrão hereditário ligado ao cromossomo X, sendo assim, os indivíduos afetados são homens e as mulheres são portadoras do gene afetado, podendo apresentar sintomas leves ou desenvolver a doença no caso da síndrome de Turner (XO), síndrome de Turner mosaico (X/XX) ou situações mais raras de translocação do cromossomo X ou inativação preferencial do cromossomo X que não contém a mutação no gene *DMD* (SWAIMAN; SMITH, 1989; EMERY, 1998).

1.1.2 Histórico

A DMD foi descrita primeiramente em 1851, por um médico inglês chamado Edward Meryon, que relatou algumas manifestações da doença descrevendo oito crianças em três famílias. Em sua publicação ele descreveu o início precoce da doença com fraqueza muscular, a predileção por meninos e relatou que na necropsia a medula espinal não estava acometida. No estudo histológico, Meryon observou que a membrana muscular, ou sarcolema, estava destruída. Apesar de seus achados serem muito importantes, tal descoberta foi negligenciada por muitos anos. Somente anos mais tarde, com os relatos do neurologista francês Guillaume Benjamin Amand

Duchenne, mais conhecido como “Duchenne de Bologne”, a doença foi detalhada clínica e histologicamente e denominada paraplegia hipertrófica da infância de causa cerebral. Em 1861 Duchenne publicou, no livro intitulado *De l'électrisation localisée*, a ilustração de um menino evidenciando a hiperlordose lombar e a pseudohipertrofia de panturrilha. Duchenne descreveu diversos casos da doença, incluindo o acometimento de meninas. Em 1868, em sua descrição mais completa, Duchenne evidenciou que a doença não tinha danos cerebrais e sim do próprio músculo, caracterizando-a como uma fraqueza muscular progressiva que acomete primeiramente a região proximal dos membros inferiores. Na biópsia muscular evidenciou aumento do tecido conjuntivo, com fibrose e presença de células adiposas nos estágios mais avançados da doença, por isso denominou-a distrofia muscular pseudo-hipertrófica. Duchenne também concluiu, através de suas observações, que a doença era hereditária, confirmando o acometimento principalmente de meninos (EMERY, 1987; MOXLEY, 2006).

Após essas descrições, vários autores desempenharam papéis importantes no histórico da doença. Em 1879, Willian R. Gowers descreveu vários casos de meninos afetados e observou um sinal clássico entre eles, que posteriormente foi nomeado manobra de Gowers: para se levantarem do chão, os meninos apoiavam o tronco sobre os membros superiores enquanto posicionavam os membros inferiores em pé, para, a seguir, elevarem o tronco apoiando as mãos nas coxas até ficarem eretos. Em 1884, Wilhelm Heinrich Erb, após análise patológica, confirmou a degeneração do tecido muscular e denominou-a distrofia muscular progressiva. Erb, através de suas observações, identificou que muitos casos estudados por ele eram claramente diferentes dos casos descritos por Duchenne, concluindo que não se tratava de uma única doença, mas sim de um grupo heterogêneo (EMERY, 1987; MOXLEY, 2006). Nas décadas subsequentes, através de contribuição de diversos autores, foi possível categorizar os diferentes tipos de distrofias de acordo com vários critérios, tais como distribuição da fraqueza muscular, idade de início da doença e, posteriormente, o modo de herança.

Ao longo de muitos anos, muitas pesquisas surgiram para determinar a etiopatogenia e a fisiopatologia da DMD. No entanto, somente em meados de 1980 foi descoberta uma ligação entre o marcador polimórfico de DNA (RC8) e o gene relacionado à doença. Esta descoberta levou à localização do gene *DMD* no braço curto do cromossomo X (Xp21) (DAVIES et al., 1983). Pouco depois, o gene foi

isolado, clonado e sequenciado; em 1987 a proteína codificada foi identificada e denominada distrofina (KOENING et al., 1987; HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987). Com os estudos seguintes, foi constatado que na DMD a distrofina estava ausente (BONILLA et al., 1988).

Os anos subsequentes focaram na caracterização do histórico natural da doença, na elucidação de aspectos relacionados à sua fisiopatologia e na busca por estratégias terapêuticas. A busca pelo tratamento da doença determinou que a utilização de corticosteroides era capaz de mudar o histórico natural da doença. Nos dias atuais, o desenvolvimento de terapias genéticas tem avançado, havendo a possibilidade de utilização de técnicas de salto de exon (*exon skipping*), leitura através de códigos de paradas, além de outras terapias em experimentação (ENGEL; OSAWA, 2004).

1.1.3 Quadro clínico

O quadro clínico da DMD é caracterizado por uma perda progressiva da força muscular, que se inicia na região proximal dos membros inferiores, geralmente antes dos cinco anos de idade (EMERY, 1998). Os primeiros sinais clínicos evidenciados são: alterações da marcha com alargamento da base, andar nas pontas dos pés e báscula de bacia (marcha miopática); dificuldade de correr, pular e subir escadas; quedas frequentes; dificuldade para levantar do chão, com evolução para a manobra de Gowers; e hiperlordose lombar (EMERY, 2002; ENGEL; OSAWA, 2004). O acometimento dos membros superiores ocorre em um estágio tardio em comparação com os membros inferiores, sendo os músculos mais acometidos, o deltoide, o infraespinhoso e o serrátil anterior. Entretanto, estudos demonstram, através da avaliação dinamométrica, fraqueza nas mãos desde os estágios iniciais da doença (WAGNER et al., 1993; MATTAR; SOBREIRA, 2008). A pseudohipertrofia é comumente observada na musculatura da panturrilha e menos frequentemente nos músculos infraespinhoso, deltoide e musculatura do antebraço (FLORENCE, 2002). Há o desenvolvimento de contraturas dos flexores plantares, da banda iliotibial e dos flexores de quadril e joelho com a progressão da doença (FLORENCE, 2002; EAGLE, 2008; MCDONALD et al, 2013).

Na evolução do quadro da DMD ocorre perda da capacidade de deambular. Estudos demonstram que um tempo de 10 a 12 segundos no teste de percorrer 10 metros está associado a um alto risco de perda de deambulação nos próximos 12 meses, assim como uma mudança de 10% ou aumento de 30 metros na performance do Teste da Caminhada de 6 minutos (TC6min) (MCDONALD et al., 2013). Vários fatores contribuem para a perda da deambulação, dentre eles destacam-se: a fraqueza muscular proximal nos membros inferiores, a gravidade das deformidades nesses membros, o aumento excessivo do peso corporal, a imobilização prolongada (devido a procedimentos cirúrgicos) e até mesmo a falta de apoio familiar e motivação da criança. O confinamento na cadeira de rodas favorece o surgimento de retrações musculares e o desenvolvimento de escoliose.

Alguns meninos podem apresentar transtorno mental ou neuropsiquiátrico. Altas taxas de incapacidade intelectual (17-27%), dificuldade de aprendizagem (26%), transtorno do espectro autista (15%), transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (32%) e ansiedade (27%) foram relatadas em pacientes com DMD (BIRNKRANT et al., 2018c).

Geralmente no início da fase adulta surgem as complicações cardiorrespiratórias. O comprometimento respiratório representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com DMD. As complicações incluem doença respiratória restritiva resultante de fraqueza e fadiga da musculatura respiratória e tosse ineficaz, atelectasia, pneumonia e insuficiência respiratória (MEIER et al., 2017; BIRNKRANT et al., 2018b). A cardiomiopatia está se tornando mais prevalente devido à evolução dos tratamentos disponíveis para o sistema esquelético e respiratório. Entretanto, ainda são responsáveis por 20% dos óbitos dos pacientes (SPURNEY, 2011). Em um estudo realizado em 2014, 15% dos participantes com idades entre 6 e 13 anos preenchiam os critérios de cardiomiopatia e este número aumentava consideravelmente para 50% em meninos com mais de 14 anos de idade (SPURNEY et al., 2014). Dentre as alterações encontradas estão: alargamento do intervalo QT, fibrose do miocárdio, disfunção ventricular, anormalidades de ritmo cardíaco incluindo fibrilação atrial, flutter e/ou ventricular e taquicardia ventricular, que resultam em insuficiência cardíaca, geralmente nas fases mais avançadas da doença (BIRNKRANT et al., 2018b). Outras complicações como disfunções gastrointestinais, constipação, distensão e hipomotilidade intestinal podem estar presentes, assim como alteração da deglutição. Com a evolução da doença,

agravam-se também os problemas ortopédicos relacionados às contraturas articulares progressivas, escoliose e osteoporose (MOXLEY, 2006; BUSHBY et al, 2010a).

A progressão da doença e o agravamento do quadro motor levam a complicações cada vez mais acentuadas e graves, culminando com o óbito no final da adolescência ou fase adulta. Entretanto, estudos têm demonstrado aumento da sobrevida dos pacientes com DMD nos últimos anos. Dentre os fatores que contribuem para maior expectativa de vida estão o uso de corticosteroides e de ventilação noturna (EAGLE et al., 2002; BACH; MARTINEZ, 2011; MCDONALD et al, 2018). Em 2011, Ishikawa et al. avaliaram 187 pacientes com DMD divididos em três grupos: grupo 1 composto por indivíduos que não foram tratados com ventilação mecânica antes de 1984; grupo 2 caracterizado por indivíduos submetidos à traqueostomia de 1984 a 1991; grupo 3 constituído de indivíduos com ventilação mecânica não invasiva e em uso de medicamentos cardioprotetores. Os resultados demonstraram que, dentre os indivíduos que vieram a óbito, os do grupo 1 faleceram em média com $18,6 \pm 2,9$ anos; os do grupo 2 faleceram em média com $28,1 \pm 8,3$ anos; os do grupo 3 faleceram em média com 39,6 anos. Cabe ressaltar que estudo recente relata um paciente com DMD com sobrevida até a sexta década de vida, visto que o mesmo se encontra sob ventilação mecânica não invasiva desde dos 22 anos de idade (VILLANOVA; KAZIBWE, 2017). Desta forma, recursos que aumentem a sobrevida e melhorem a qualidade de vida desses pacientes têm sido amplamente estudados. Embora ainda não exista cura para DMD, espera-se que os tratamentos paliativos interfiram de alguma forma na progressão da doença e na sobrevida do indivíduo.

1.1.4 Capacidade funcional

A capacidade funcional reflete a habilidade do indivíduo em realizar atividades do dia-a-dia. Na DMD, embora a capacidade funcional aparentemente permaneça em uma constante, parâmetros como força muscular tendem a diminuir insidiosamente (FLORENCE, 2002).

Beenakker et al. (2005) sugerem que a perda da força muscular é notada somente após diminuição de força significativa a ponto de comprometer a capacidade

funcional. Nos estágios iniciais da doença, quando os pacientes ainda deambulam e as atividades funcionais são exercidas normalmente, espera-se que a dinamometria já evidencie uma diminuição na força muscular. Já nos estágios avançados da doença, quando os pacientes são cadeirantes, há comprometimento funcional significativo, embora alguma força muscular residual ainda possa ser medida pela dinamometria.

Vários tipos de instrumentos têm sido utilizados para avaliação da capacidade funcional dos meninos com DMD.

Vignos Jr e Archibald, em 1960, foram os pioneiros em avaliar o desempenho motor através de testes funcionais, com uma proposta de classificação baseada nas habilidades funcionais dos membros inferiores. A escala avalia a capacidade de caminhar, subir escadas e levantar da cadeira, sendo maior nota obtida indica pior desempenho do paciente. Tal classificação foi levemente modificada em 1963 e hoje é conhecida como Escala de Vignos, amplamente utilizada na prática clínica e em estudos científicos (VIGNOS Jr; ARCHIBALD, 1960; VIGNOS Jr; SPENCER Jr; ARCHIBALD, 1963). Mais tarde, Brooke et al. (1981) acrescentaram à escala proposta por Vignos Jr, Spencer Jr e Archibald (1963) a classificação funcional dos membros superiores: a Escala de Brooke. Brooke et al. (1981; 1983) propuseram, em seus estudos, um protocolo de avaliação dividido em três partes: avaliação da força muscular, avaliação da amplitude de movimento e avaliação da função, que incluía função pulmonar, habilidades funcionais com os membros superiores e inferiores e desempenho nos seguintes testes cronometrados: levantar do chão, subir quatro degraus, correr ou andar 10 metros, levantar da cadeira, percorrer 10 metros com cadeira de rodas, vestir a camiseta e cortar um quadrado 3x3 cm com uma tesoura sem ponta. Porém, tal protocolo, assim como as escalas, apesar de serem amplamente utilizados no meio científico, nunca foram traduzidos e validados para o português, assim como os testes funcionais nunca foram descritos detalhadamente e padronizados.

A partir dos estudos de Vignos e colaboradores e de Brooke e colaboradores outros trabalhos surgiram relatando a importância dos testes funcionais na avaliação do paciente com DMD. Em 1990, Moxley citou os testes funcionais mais utilizados para DMD: levantar da posição supina, subir quatro degraus e caminhar 10 metros, enfatizando como vantagens os testes serem instrumentos baratos, de fácil aplicação em ambiente clínico e que evidenciam a progressão da doença. Porém, podem não

ser apropriados para todos os estágios da doença e, por vezes, apresentar baixa sensibilidade para detectar melhoras ou pioras sutis funcionais e da força muscular. Recentemente, McDonald et al. (2010) adaptaram o TC6min e o descreveram como um teste viável, seguro e reprodutível, que documenta as limitações relacionadas à deambulação na DMD, sendo, portanto, um método adequado para avaliar a história natural da DMD.

Paralelamente aos testes funcionais, outros instrumentos, como as escalas de avaliação da capacidade funcional, permitem uma avaliação mais abrangente, além de serem instrumentos práticos e reprodutíveis. Consistem da realização de atividades funcionais que devem ser pontuadas seguindo critérios previamente estabelecidos. Há instrumentos genéricos como a Medida da Função Motora (MFM), que se aplica a todas as fases da doença e é utilizada na avaliação funcional de várias doenças neuromusculares, e instrumentos específicos, como a Escala de Avaliação para Deambulantes *North Star*, desenvolvida especificamente para a DMD na fase em que a criança ainda deambula e a *Egel Klassifikation (EK)*, específica para meninos cadeirantes com DMD (STEFFENSEN et al. 2001; BÉRARD et al., 2005; SCOTT; MAWSON, 2006).

Na literatura, estudos avaliaram a história natural da doença em meninos com DMD utilizando medidas de força muscular e testes cronometrados para avaliação da capacidade funcional (SCOTT et al., 1982; BROOKE et al, 1983; FLORENCE, 1984).

Após a introdução de corticoterapia e aprimoramento das técnicas de reabilitação e tratamento, estudos demonstram retardo na perda da marcha e da capacidade funcional e aumento da sobrevida (MAZZONE et al, 2011; MCDONALD et al, 2013; MAZZONE et al., 2013; PANE et al., 2014; SPURNEY et al., 2014; MERCURI et al., 2016). A capacidade funcional nesses estudos é avaliada utilizando medida da força muscular, escalas funcionais e o TC6min.

1.1.5 Diagnóstico e tratamento

A suspeita do diagnóstico deve ser considerada mesmo se não houver história familiar da doença, na presença do seguinte quadro: fraqueza muscular em uma criança do sexo masculino, com um aumento nos níveis séricos da enzima creatina quinase (CK) (BUSHBY et al., 2010a). A presença da manobra de Gowers e

alterações da marcha, indicando fraqueza muscular proximal, e a hipertrofia da musculatura das panturrilhas reforçam a suspeita da doença. A confirmação do diagnóstico de DMD pode ser feita através da demonstração da ausência da proteína distrofina à imuno-histoquímica na biópsia muscular, na qual também se observa um padrão distrófico, com perda de fibras musculares e aumento dos tecidos conjuntivo e adiposo; e/ou análise do DNA comprovando mutação no gene *DMD*, que codifica a proteína distrofina (EMERY, 2002; BUSHBY et al., 2010a). O teste genético é recomendado para detecção da mutação relacionada à DMD no paciente e familiares em risco, permitindo adequado aconselhamento genético para a família e possibilitando o estabelecimento de protocolos terapêuticos mais adequados para o paciente (MUNTONI; TORELLI; FERLINI, 2003; BUSHBY et al., 2010a).

Atualmente não há uma terapia efetiva que cure a DMD, embora diferentes formas de terapias genéticas estejam em estudo ou em fase inicial de utilização. Os tratamentos atuais visam: manter a força muscular e a função motora, retardando ao máximo a perda da marcha e prolongando a capacidade funcional dos membros superiores e a respiratória; prevenir e tratar as complicações respiratórias, cardíacas e musculoesqueléticas. Bushby et al. (2010b) enfatizam a importância da assistência multidisciplinar aos pacientes com DMD.

A recomendação do tratamento multidisciplinar, que inclui o uso dos corticosteroides, a reabilitação física e respiratória, terapias cardíacas e nutricionais e apoio psicológico, têm prolongado o período de independência do paciente (BUSHBY et al., 2010a; ARAUJO et al., 2017). Embora os corticosteroides tragam benefícios, os efeitos adversos do uso prolongado precisam ser controlados.

Dentre as novas terapias ou perspectivas terapêuticas no campo da genética, destacam-se as interferências na expressão do gene mutante e o aumento da expressão da utrofina. As técnicas de modificação do gene mutante já em aplicação terapêutica são: salto do exon (exon *skipping*) e leitura através de código de parada prematuro. Na técnica de salto do exon (exon *skipping*), a estratégia é utilizar um oligonucleotídeo complementar, que se liga covalentemente a uma região específica do gene *DMD* para impedir a transcrição de um exon, fazendo com que essa transcrição se inicie no exon subsequente, restaurando a matriz de leitura e favorecendo a produção de uma proteína viável (AARTSMA-RUS et al., 2017). A leitura através de código de parada prematura é feita através de medicamento que faz com que o aparato ribossômico consiga prosseguir a transcrição mesmo na presença

de uma mutação de ponto sem sentido (*nonsense*), que gera um código de parada prematuro, permitindo a produção de uma proteína funcional ao invés da proteína truncada, não funcional (REINING; MIRZAEI; BERLAU, 2017). A superexpressão da utrofina tem sido avaliada como método terapêutico; esta proteína, codificada por um gene autossômico, é análoga à distrofina, havendo 80% de similaridade entre elas. Estudos avaliam se a utrofina seria um substituto eficaz da distrofina nos pacientes com DMD (REINING; MIRZAEI; BERLAU, 2017). Técnicas de introdução do gene *DMD* selvagem, ou seja, não mutante, através de vetores virais ou em células tronco também estão em desenvolvimento.

Terapias antioxidantes e anti-inflamatórias têm sido empregadas no tratamento suplementar da doença, tais como: coenzima Q10, idebenona, carnitina, aminoácidos (glutamina e arginina), vitamina E e extrato de chá verde, porém são necessários mais estudos que comprovem a eficácia terapêutica na DMD (BUETLER et al., 2002; BUSHBY et al., 2010a; SPURNEY et al., 2011; REINING; MIRZAEI; BERLAU, 2017; BUYSE et al., 2017).

1.2 Etiopatogenia e fisiopatologia da DMD

1.2.1 Mecanismos gerais

O gene da distrofina, denominado *DMD*, localiza-se no braço curto do cromossomo X, entre as posições p21.2 e 21.1. É um dos maiores genes humanos conhecidos, correspondendo a 0,1% do genoma humano total e a 1,5% do cromossomo X. Apresenta 79 exons e cerca de 2,4 milhões de pares de bases (ROBERTS et al., 1993; MUNTONI; TORELLI; FERLINI, 2003).

A mutação no gene *DMD* é transmitida pela mãe em 2/3 dos casos; no restante, a mutação desenvolveu-se no próprio menino afetado. A DMD pode resultar de deleção, duplicação ou mutação de ponto no gene *DMD*. As deleções de exon(s) são responsáveis por 60 a 73% dos casos na população mundial de DMD; 5 a 10% das mutações são duplicações de exon(s); 30 a 35 % são mutações que afetam um único nucleotídeo, também chamadas mutações de ponto, sendo 10 a 15% mutações sem sentido (*nonsense*) (PRIOR, 2006; BLADEN et al., 2015). As mutações acima

referidas, resultam na ausência da proteína distrofina ou em uma proteína não funcional.

A proteína distrofina possui peso molecular de aproximadamente 427 kilodaltons (kDa) e pertence ao complexo de proteínas do citoesqueleto; está diretamente ligada às proteínas β distroglicana, situada no sarcolema, e actina no sarcoplasma. É predominantemente expressa na musculatura estriada esquelética e cardíaca, com pequenas quantidades no tecido cerebral. (BLAKE et al., 2002).

Dentre as funções da distrofina, sugere-se que: 1) mantenha a integridade do sarcolema durante o estresse mecânico e o estabilize durante o ciclo de contração e relaxamento muscular (KOENING; MONACO; KUNKEL, 1988); 2) regule parcialmente o cálcio intracelular e os eventos que envolvem a cascata do cálcio (FRANCO; LANSMAN, 1990; VALLEJO-ILLARRAMENDI et al., 2014); 3) atue na sinalização molecular para o interior das fibras musculares (GEE et al., 1998); 4) influencie a agregação de neurotransmissores a receptores (KONG; ANDERSON, 1999); e 5) previna a geração de espécies reativas de oxigênio (BROWN, 1995; NIEBRÓJ-DOBOSZ; HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ, 2005). A deficiência de distrofina resulta na instabilidade do sarcolema e em uma membrana celular enfraquecida, que pode ser mais facilmente danificada (PETROF et al., 1993). Esse é um dos principais eventos precoces que resulta em várias alterações secundárias, como o influxo de cálcio, alteração na homeostase desse íon, proteólise, necrose de fibras, resposta inflamatória, fibrose, autofagia e apoptose, que levam à degeneração da fibra muscular (SHIN et al., 2013). O tecido muscular responderia com miogênese e regeneração da fibra. No entanto, ciclos repetidos de dano e inflamação, ao longo de meses e anos, progridem para a substituição das fibras musculares pelos tecidos conjuntivo e adiposo, favorecendo a perda da função muscular (CHANG et al., 1996; DECONINCK, 2007; ALLEN; WHITEHEAD; FROEHNER, 2016). Durante esse processo observam-se alterações metabólicas, especialmente mitocondriais (ALLEN; WHITEHEAD; FROEHNER, 2016).

1.2.2 Disfunção mitocondrial

Alterações metabólicas têm sido observadas na musculatura esquelética de modelos animais de distrofia muscular (EVEN; DECROUY; CHINET, 1994;

KUZNETSOV et al., 1998), assim como em biópsias de músculo de pacientes com DMD (SCHOLTE et al., 1985; YAMAMOTO, 1989; JONGPIPUTVANICH; SUEBLINVONG; NORAPUCSUNTON, 2005). Há indícios de que a disfunção metabólica presente na distrofia muscular envolva o metabolismo da glicose e o metabolismo mitocondrial (SHARMA et al., 2003). Alterações na regulação da homeostase do cálcio, proteólise e susceptibilidade ao estresse oxidativo são fenômenos potencialmente relevantes na patogênese da doença. A mitocôndria, enquanto organela que apresenta papel relevante na homeostase do cálcio, parece ser alvo de disfunção secundária que, por sua função na produção de ATP, tem o potencial de amplificar o insulto inicial, resultando em eventos irreversíveis que contribuem para perda celular. O estresse oxidativo desempenha papel importante na perda de massa muscular na DMD. A produção de espécies reativas de oxigênio causa dano celular por alterar direta e irreversivelmente macromoléculas, como proteínas, lipídios de membranas e DNA (RANDO, 2002; TERRIL et al., 2013; PETRILLO et al., 2017). Os experimentos de Dudley et al. (2006) sugeriram que o dano sarcolemal na deficiência de distrofina seja modulado por interações sinérgicas entre estresses mecânico e oxidativo, que juntos fornecem evidências do padrão de fibrose, inflamação e degeneração e regeneração muscular característicos da DMD. Embora seja necessária a ausência da distrofina, esta não é suficiente para causar tais anormalidades.

1.2.3 Coenzima Q

A coenzima Q (CoQ ou ubiquinona) é uma molécula lipofílica presente nas membranas celulares, mas especialmente abundante nas mitocôndrias pois participa diretamente do processo de produção energética pela fosforilação oxidativa (ACOSTA et al., 2016). É expressa em todos os tecidos, mas em maior concentração naqueles que requerem maior quantidade de energia (ATP) para seu funcionamento, como o tecido nervoso, os músculos esquelético e cardíaco, o fígado e os rins (STEFELY; PAGLIARINI, 2017). A CoQ é constituída por um anel benzoquinona ligado a uma cadeia de poliprenil de comprimento variável em diferentes espécies: leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) têm seis unidades (CoQ₆), camundongos nove (CoQ₉) e humanos dez (CoQ₁₀) (KAWAMUKAI, 2009).

A CoQ₁₀ é sintetizada nas mitocôndrias por um conjunto de pelo menos doze enzimas, as quais formam um complexo proteico que ainda não está bem definido. A obtenção de CoQ₁₀ também pode ocorrer por via exógena, através da alimentação e suplementação oral (ACOSTA et al., 2016).

A CoQ nas células eucariontes atua como molécula móvel que participa do transporte de elétrons da cadeia respiratória. O processo completo, chamado de fosforilação oxidativa, consiste na biossíntese de ATP a partir da energia gerada pelo transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória. Inicia-se com a entrada de elétrons na cadeia respiratória a partir da oxidação das coenzimas NADH e FADH₂. O complexo I (NADH-ubiquinona oxidoredutase) promove a oxidação do NADH enquanto a oxidação do FADH₂ é realizada pelo complexo II (succinato-ubiquinona oxidoredutase). Durante esta etapa, os elétrons são transferidos sequencialmente para a ubiquinona, originando a sua forma totalmente reduzida, ubiquinol. A molécula de ubiquinol então transfere seus elétrons para o complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoredutase), que em seguida os transfere para a proteína transportadora de elétrons citocromo c. A partir do citocromo c, os elétrons fluem para o complexo IV (citocromo c oxidase) e, finalmente para o oxigênio, formando moléculas de água, a etapa final da cadeia de transporte de elétrons. A energia liberada pelo fluxo dos elétrons através da cadeia respiratória é utilizada para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos I, III e IV. O complexo V (ATP sintase) utiliza a energia potencial armazenada no gradiente de prótons para condensar o ADP e o fosfato inorgânico em ATP, formando, a cada NADH oxidado, aproximadamente três moléculas de ATP e a cada FADH₂, duas moléculas de ATP (LENAZ et al., 1993; LENAZ et al, 2007).

Além de seu papel na cadeia respiratória, outras funções foram consideradas para a CoQ. É um dos mais potentes antioxidantes lipossolúveis sintetizados endogenamente, presente em todas as membranas. Seu efeito protetor é estendido aos lipídios, proteínas e DNA, atuando também como estabilizador de membrana (MILES et al, 2005; BENTINGER; BRISMAR; DALLNER, 2007). É comumente considerado que esses papéis não bioenergéticos podem ser responsáveis pelos efeitos de sua deficiência e por suas ações terapêuticas. Deficiência de CoQ₁₀ pode ser causada por mutações em genes envolvidos na sua biossíntese – deficiência primária, ou causada por alterações em outras funções mitocondriais que não estão diretamente envolvidas na biossíntese de CoQ₁₀ – deficiência secundária (QUINZII;

HIRANO, 2011; STEFELY; PAGLIARINI, 2017). Estudos relatam a deficiência primária de CoQ₁₀ nas doenças mitocondriais com manifestações clínicas variando de desordens multissistêmicas fatais a encefalomiopatia ou nefropatia isoladas (DIMAURO et al., 1998; ZEVIANI; DI DONATO, 2004; LÓPEZ et al., 2006). Deficiência secundária foi associada a cardiomiopatia, doença de Parkinson, ataxia cerebelar, entre outras (SHULTS et al., 1997; PEPE et al., 2007; GALPERN; CUDKOWICZ, 2007; LAGIER-TOURENNE et al., 2008). Entretanto, não há estudos que evidenciam a deficiência de CoQ₁₀ na DMD.

Ensaio clínico com coenzima CoQ₁₀ foram realizados em grupos de pacientes com várias doenças neuromusculares e em pacientes com DMD (FOLKERS et al., 1985; FOLKERS e SIMONSEN, 1995; SPURNEY et al., 2011; SALEHI et al., 2017). Um estudo piloto, aberto, no qual foi administrada CoQ₁₀ por via oral em pacientes com DMD em vigência de tratamento com corticoesteroides, sugere que a associação da coenzima aumenta a força muscular (SPURNEY et al., 2011). Em relação aos efeitos cardíacos dessa terapia, não foi possível demonstrar a eficácia da CoQ₁₀ nos parâmetros ecocardiográficos em pacientes com DMD (SALEHI et al., 2017). A idebenona, um análogo da CoQ₁₀, também foi investigada em ensaios clínicos na DMD (BUYSE et al., 2011; BUYSE et al., 2013; BUYSE et al., 2015; MCDONALD et al., 2016; BUYSE et al., 2017). No estudo clínico DELOS, que consistiu em um estudo controlado e randomizado de fase 3 em pacientes com DMD, a idebenona preservou a função muscular inspiratória, reduzindo o declínio do pico de fluxo expiratório e a capacidade vital forçada em comparação ao placebo (BUYSE et al., 2015).

Apesar dos resultados promissores dos estudos terapêuticos com CoQ₁₀ e idebenona, os efeitos na doença não foram relevantes do ponto de vista clínico, o que pode decorrer de vários fatores, incluindo o estágio da doença, a presença de alterações irreversíveis e, eventualmente, a ausência de relação entre CoQ₁₀ e a fisiopatologia da DMD. Portanto, é essencial a caracterização do envolvimento da CoQ₁₀ no processo fisiopatológico que se desenvolve na musculatura esquelética de pacientes com DMD, para que novos estudos terapêuticos com CoQ₁₀ ou idebenona possam ser delineados de forma mais adequada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Avaliar se há deficiência da CoQ₁₀ e comprometimento da atividade da cadeia respiratória em fragmentos de biópsia muscular de meninos com DMD;
- Avaliar a relação entre a dosagem da CoQ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular de meninos com DMD e parâmetros clínicos e a capacidade funcional.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar a CoQ₁₀ no músculo esquelético de meninos com DMD;
- Analisar se ocorre comprometimento das enzimas da cadeia respiratória no músculo esquelético;
- Verificar se a dosagem de CoQ₁₀ se correlaciona com a perda de fibras musculares e com parâmetros clínicos como a idade do paciente no momento da biópsia, a idade de início dos sintomas e o tempo de evolução da doença;
- Verificar se a dosagem de CoQ₁₀ e a área relativa de fibras musculares se correlacionam com a capacidade funcional, mensurada através das escalas Medida da Função Motora (MFM) e Escala de Avaliação para deambulantes *North Star* (NSAA), e testes cronometrados tempo para percorrer 10 metros (T10), tempo para realizar a manobra de Gowers (TGowers) e teste da caminhada dos 6 minutos (TC6min).

3. HIPÓTESES DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido para testar as seguintes hipóteses:

- A disfunção mitocondrial observada nos pacientes com DMD, se relaciona em parte à deficiência secundária de CoQ₁₀;
- A disfunção mitocondrial é maior quanto maior a idade e o tempo de evolução da doença;
- A disfunção mitocondrial contribui para o comprometimento da capacidade funcional.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de corte transversal, observacional, analítico, com abordagens retrospectiva e prospectiva.

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). Os pacientes foram avaliados ao comparecerem ao hospital para uma consulta de rotina no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-FMRP-USP (ANEM) ou no Ambulatório de Miopatias do Centro de Reabilitação do HC-FMRP-USP.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

O projeto de pesquisa intitulado “Avaliação quantitativa da capacidade funcional e da função mitocondrial muscular nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne” juntamente com os termos de consentimento livre e esclarecido, foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP, sendo aprovados em sua 349ª Reunião Ordinária, de acordo com o processo 14604/2011 (ANEXO A).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

4.1 Casuística

Participaram do estudo 42 meninos, sendo 32 pacientes com DMD e dez controles. O estudo foi dividido em duas etapas, uma composta de análise retrospectiva e outra prospectiva. Dentre os 32 pacientes com DMD, 22 participaram da etapa retrospectiva, enquanto que dez participaram da etapa prospectiva. O mesmo grupo controle de dez pacientes foi utilizado nas duas etapas durante as análises realizadas nas biópsias musculares.

Todos os pacientes e/ou responsáveis foram consultados e informados sobre os propósitos e etapas do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP (APÊNDICE A-pacientes, APÊNDICE B-controles).

O diagnóstico dos pacientes com DMD foi confirmado por análise imuno-histoquímica da distrofina na biópsia muscular e/ou estudo molecular, através dos métodos de PCR multiplex (do inglês *Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase), MLPA (do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* ou amplificação de sondas dependente de ligação) ou sequenciamento genético. Os diagnósticos moleculares dos pacientes com DMD estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização do diagnóstico molecular dos pacientes com DMD.

Mutações genéticas	n (%)
Deleção de um ou mais exons	14 (43,75%)
Deleção de um nucleotídeo	2 (6,25%)
Duplicação de um ou mais exons	2 (6,25%)
Deleção + duplicação de um ou mais exons	1 (3,12%)
Mutação de ponto	4 (12,5%)
Mutação intrônica	2 (6,25%)
Mutação ausente*	1 (3,12%)
Deleções ausentes no PCR multiplex	6 (18,75%)

*nenhuma mutação foi encontrada após análise do gene *DMD* por MLPA e sequenciamento.

Observamos que cerca de metade dos pacientes apresentaram deleções e/ou duplicações de um ou mais exons. A avaliação genética em um dos pacientes não evidenciou deleções, duplicações ou mutações de ponto, entretanto, não se descarta a presença de mutações intrônicas. Em seis pacientes foi realizado apenas o PCR multiplex, que não evidenciou a presença de deleções. Nesses casos, o diagnóstico foi determinado pela ausência da proteína distrofina na biópsia muscular.

Os exons do gene *DMD* acometidos nas deleções e duplicações estão apresentados na figura 1, na qual podemos observar deleções de até 35 exons.

Figura 1. Ilustração da distribuição e extensão das deleções e duplicações no gene *DMD* nos pacientes avaliados.

Em relação aos diagnósticos dos pacientes controles, um menino apresentava miopatia congênita (desproporção congênita dos tipos de fibras) e os demais apresentavam quadro clínico inespecífico, variando de hiperCKemia assintomática a fraqueza muscular discreta. As biópsias musculares desses pacientes mostraram achados leves e inespecíficos.

4.1.1 Grupo de pacientes do estudo retrospectivo

Foram selecionadas biópsias musculares de pacientes com DMD atendidos no ANEM até 2011, sendo estabelecidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Pacientes do sexo masculino com DMD, cujo diagnóstico tenha sido estabelecido por quadro clínico compatível, níveis séricos elevados da enzima CK e biópsia muscular com teste imuno-histoquímico evidenciando ausência da proteína distrofina e/ou teste genético evidenciando a mutação patogênica;
- Ter fragmento da biópsia de músculo disponível, armazenado em nitrogênio líquido.

Critérios de exclusão:

- Quantidade insuficiente da amostra de biópsia muscular para realização das análises.

4.1.2 Grupo de pacientes do estudo prospectivo

Participam do estudo, pacientes com DMD atendidos no ANEM entre 2011 e 2017, sendo estabelecidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Pacientes do sexo masculino com DMD, cujo diagnóstico tenha sido estabelecido por quadro clínico compatível, níveis séricos elevados da enzima CK, biópsia muscular com teste imuno-histoquímico evidenciando ausência da proteína distrofina e/ou teste genético evidenciando a mutação patogênica;
- Submetidos à biópsia muscular no processo de rotina de investigação diagnóstica durante a vigência do presente estudo;
- Capaz de compreender comandos e instruções simples;

Critérios de exclusão:

- Impossibilidade de ser realizada avaliação da capacidade funcional em um período de até seis meses em relação à data da coleta da biópsia muscular.

4.1.3 Grupo controle

Foram selecionadas biópsias musculares de pacientes com doenças neuromusculares atendidos no ANEM, sendo estabelecidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Pacientes do sexo masculino com idade semelhante à dos pacientes do estudo, que tenham sido submetidos à biópsia muscular durante o processo de rotina de investigação diagnóstica de suas doenças;
- Apresentar diagnóstico de doença neuromuscular não degenerativa e não metabólica;
- Ter fragmento de biópsia considerado normal ou com mínimas alterações, armazenado em nitrogênio líquido.

Critérios de exclusão:

- Quantidade insuficiente da amostra de biópsia muscular para realização das análises.

4.2 Métodos

4.2.1 Biópsia muscular

Foram coletadas amostras do músculo quadríceps de pacientes durante a investigação de rotina. Os fragmentos foram imediatamente congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido a temperaturas inferiores a -196°C .

Para o presente estudo, um fragmento longitudinal da biópsia de cada paciente foi seccionado transversalmente em dois fragmentos consecutivos, de forma que contivessem grosseiramente a mesma representação de fibras musculares, para a realização de morfometria e dosagem da CoQ_{10} . Um terceiro fragmento foi utilizado para os ensaios enzimáticos da cadeia respiratória na etapa retrospectiva do estudo. Em 15 pacientes, tratava-se também de um fragmento consecutivo aos utilizados para dosagem de CoQ_{10} . Nos demais, não foi possível utilizar fragmento consecutivo em decorrência do tamanho das amostras disponíveis para análise.

4.2.2 Análise morfométrica

Cortes histológicos transversais de músculo esquelético congelado foram corados com hematoxilina e eosina para identificação das fibras musculares e dos tecidos de sustentação e adiposo. Foram obtidas imagens digitalizadas dos cortes transversais do tecido muscular utilizando um sistema de análise de imagens Axiovision Rel. 4.8. Após obtenção das imagens, foi utilizado o programa Image-J, (um programa de processamento de imagens de domínio público criado pelo *National Institutes of Health* - NIH), para as análises morfométricas. Foram determinadas: a área transversal total do fragmento muscular, circundando todo o contorno do fragmento, e a área ocupada pelas fibras musculares, circundando-as uma a uma para obtenção da área transversal das fibras. A área relativa ocupada pelas fibras

musculares foi calculada através da somatória da área transversal de cada fibra, dividida pela área transversal total do fragmento.

4.2.3 Quantificação da CoQ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular

A concentração da CoQ₁₀ foi quantificada em homogeneizados de tecido muscular congelado, através da técnica de cromatografia líquida de alta performance de fase reversa. Os resultados foram obtidos da média de 3 a 4 mensurações e expressos em µg/g de tecido.

Aproximadamente 45 mg do fragmento congelado da biópsia muscular foi homogeneizado na presença de 0,25 µg/ml de CoQ₉ e 50 mM de dodecilsulfato de sódio. A extração da CoQ₁₀ com 90% de 1-propanol foi realizada por centrifugação a 14000xg a 4°C, durante cinco minutos. O sobrenadante foi analisado em equipamento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com sistema de detecção eletroquímica (ultra HPLC, marca Thermo Scientific) (NAINI et al, 2003).

4.2.4 Análise das atividades das enzimas da cadeia respiratória

As atividades das enzimas da cadeia respiratória foram medidas através de técnicas espectrofotométricas.

Para obtenção de um homogeneizado na concentração de 10% (peso/volume), o fragmento de músculo esquelético congelado foi pesado, colocado em um volume apropriado de tampão contendo 50 mM de Tris-hidróxido de sódio (HCl) e 150 mM de cloreto de potássio (KCl) no pH 7,5 e submetido à homogeneização em equipamento homogeneizador do tipo Turrax (PowerGen 125 Tissue Homogenizer, marca Fisher Scientific). Durante todo o procedimento o material biológico foi mantido em banho de gelo. As atividades das enzimas da cadeia respiratória NADH-ubiquinona oxidoreductase (complexo I), succinato-ubiquinona oxidoreductase (complexo II), succinato-citocromo c redutase (complexos II+III), ubiquinol-citocromo c oxidoreductase (complexo III), citocromo c oxidase (COX) (complexo IV) e citrato sintase foram quantificadas em espectrofotômetro à temperatura de 30°C (DIMAURO et al., 1987; BIRCH-MACHIN et al., 1994).

Os complexos II + III foram medidos monitorizando a oxidação do citocromo c a 550 nm em tampão de reação contendo 50 mM de fosfato de potássio, succinato e

0,5 mM de cianeto de potássio (KCN). Sua atividade foi mensurada, em experimentos concomitantes, com e sem a adição de CoQ₁₀ no ensaio enzimático, em quantidades de saturação da reação.

Os resultados foram corrigidos de acordo com o peso do fragmento e expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tecido. Os resultados foram também corrigidos de acordo com a atividade da citrato sintase, uma medida estimada da massa mitocondrial.

4.2.5 Avaliação da capacidade funcional

A avaliação da capacidade funcional foi realizada através dos seguintes instrumentos: MFM, Escala de avaliação para deambulantes *North Star* (NSAA), T10 e TC6min, abaixo descritos.

Medida da Função Motora (MFM)

A escala MFM foi desenvolvida por Bérard et al. (2005) e avalia a função motora de pacientes com doenças neuromusculares. Apresenta 32 itens, divididos em três dimensões: D1 avalia a posição em pé e transferências, com 13 itens; D2 avalia a função motora axial e proximal, com 12 itens e D3 avalia a função motora distal, com 7 itens. Cada item é graduado de 0 a 3 pontos, sendo 0 quando não realiza a tarefa, 1 realiza parcialmente a tarefa, 2 realiza completamente, mas com compensações ou lentamente, e 3 realiza a tarefa de forma correta. O instrumento apresenta um manual com as instruções de cada atividade descritas detalhadamente e os critérios de pontuação. A pontuação total é calculada através da somatória dos pontos obtidos em cada item e expressa em porcentagem em relação ao escore máximo, que é de 96 pontos (BÉRARD et al., 2005). Quanto maior a pontuação, que varia de 0 a 100%, melhor a função motora do paciente.

A versão da MFM utilizada no estudo da MFM foi traduzida e adaptada para a língua portuguesa falada no Brasil e apresenta elevada reprodutibilidade intra e interobservador (IWABE; MIRANDA-PFEILSTICKER; NUCCI, 2008) (ANEXO C).

Escala de Avaliação para deambulantes *North Star* (NSAA)

A NSAA foi desenvolvida por um grupo de fisioterapeutas do projeto *North Star* do Reino Unido, a partir da adaptação da *Hammersmith motor ability scale* (HMAS) (SCOTT; MAWSON, 2006). A NSAA consiste de 17 atividades, variando de ações

mais simples como ficar em pé, caminhar e levantar da cadeira, a atividades mais complexas como levantar do chão, pular, pular com uma perna e correr (10 metros). Cada item deve ser graduado de 0 a 2: sendo 0 quando incapaz de realizar a tarefa, 1 realiza com ajuda ou compensações e 2 realiza a tarefa normalmente. Para que não haja dúvidas quanto à pontuação, a escala apresenta os critérios de avaliação descritos para cada item. A pontuação total é calculada através da somatória das pontuações de cada item e varia de 0 a 34; quanto maior a pontuação, melhor a capacidade funcional. Os itens levantar do chão e correr 10 metros devem ser cronometrados, porém o tempo obtido não é considerado na pontuação total, é um detalhe a mais na avaliação que pode ser monitorado ao longo do tempo (MAZZONE et al., 2009).

A versão da NSAA utilizada no estudo foi traduzida e adaptada para a língua portuguesa falada no Brasil em 2017, pelos autores deste estudo. Análise da confiabilidade da escala mostrou elevada consistência interna e adequada reprodutibilidade intra e interobservador (OKAMA et al., 2017).

Tempo para percorrer 10 metros

O teste consiste em percorrer 10 metros em uma pista de superfície plana, devidamente marcada com faixas no solo no início e no final da pista. O tempo para executar o percurso foi registrado considerando o momento em que o participante tocou com o pé a faixa do final da pista. Não foi permitido o uso de qualquer tipo de órtese durante o teste. Participaram do teste duas avaliadoras, uma responsável por posicionar o paciente na faixa de início da pista e outra posicionada na faixa do fim da pista. A segunda avaliadora foi responsável pela cronometragem do teste, registrando o tempo para percorrer 10 metros (BROOKE et al., 1983; FLORENCE et al., 1984).

Análise da confiabilidade do teste, mostrou adequada reprodutibilidade intra e interobservador (BENÁ et al, 2016).

Tempo para realizar a manobra de Gowers (TGowers)

A partir do decúbito dorsal, o participante foi orientado a levantar do chão, sem auxílio de terceiros e sem apoiar em objetos. O cronômetro foi disparado no momento em que ele iniciou o movimento e foi interrompido no momento em que ele assumiu a posição ortostática (BROOKE et al., 1983; FLORENCE et al., 1984).

Se o participante for incapaz de completar o teste após alguns minutos do disparo do cronômetro, este será considerado incapaz de realizá-lo.

Teste da caminhada dos 6 minutos (TC6min)

O TC6min é uma adaptação do teste de caminhada de 12 minutos, proposta por Butland et al. (1982), o qual foi desenvolvido para avaliar a capacidade física de pacientes com alterações cardíacas e pulmonares e a capacidade submáxima ao exercício (ENRIGHT, 2003). Geiger et al. (2007) descrevem em seu estudo a realização do teste em crianças e adolescentes. Recentemente, o teste da caminhada dos 6 minutos foi utilizado para avaliar a capacidade funcional nos pacientes com DMD (MCDONALD et al., 2010).

Para a realização do teste, o indivíduo deve caminhar por 6 minutos, não sendo permitido correr, e ao final do teste é realizada a medida da distância percorrida. Devem ser registradas antes e após o término do teste as seguintes medidas: frequência cardíaca, pressão arterial e escala facial para dispneia. O paciente pode interromper o teste quando desejar descansar e/ou referir dispneia ou fadiga intensa, podendo retomar o teste no mesmo ponto em que foi interrompido (MCDONALD et al.; 2010).

Para os participantes do nosso estudo, padronizamos uma pista de 20 metros de comprimento, com marcações de fita adesiva a cada metro. Cones foram colocados nas extremidades, indicando o local no qual o participante deveria fazer a meia volta. Duas fisioterapeutas participaram do teste. Antes de iniciar, a fisioterapeuta responsável dava as orientações de como realizar o teste, sendo comumente usadas as expressões “ande normalmente, como de costume”. Como os testes foram realizados em uma pista localizada em uma área externa, porém coberta, os participantes utilizavam calçados confortáveis para a realização do teste. Não foi permitido o uso de chinelos e órteses. Durante o teste, uma fisioterapeuta andava atrás do paciente para segurá-lo em uma possível queda; esta pessoa também era responsável por dar o incentivo à criança, dizendo “você está indo bem!”, “continue assim!”. A outra fisioterapeuta marcava o tempo e a distância e avisava aos participantes o tempo restante.

A análise da confiabilidade do TC6min realizada pelos autores deste estudo, mostrou muito boa concordância na reprodutibilidade intra e interobservador (OKAMA et al., 2016).

4.3 Análise estatística

Os dados coletados foram estruturados em planilhas no programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 17.0.

As variáveis numéricas (discretas ou contínuas) foram descritas através da média como medida de tendência central, desvio padrão (DP) como medida de dispersão, valores mínimos e máximos para indicar a faixa de variação dos valores. Para as variáveis categóricas foram apresentadas as suas frequências relativas.

A idade, assim como os resultados da quantificação de CoQ₁₀ e das atividades das enzimas mitocondriais nas amostras de tecido muscular de pacientes com DMD foram comparados aos resultados obtidos de indivíduos controles, através do teste não paramétrico de Mann-Whitney para duas amostras independentes pois os dados não apresentaram distribuição normal.

As correlações entre quantificação da CoQ₁₀, área relativa ocupada por fibras musculares, capacidade funcional e parâmetros clínicos como idade no momento da biópsia, idade do início dos sintomas e tempo de evolução da doença, foram realizadas pelo teste de correlação não paramétrico de Spearman. A magnitude da correlação foi estabelecida de acordo com o proposto por Ajzen (1998): $\leq 0,20$ muito baixa; 0,21-0,40 baixa; 0,41-0,60 moderada; 0,61-0,80 alta; 0,81-1,0 muito alta.

O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Etapa retrospectiva

5.1.1 Casuística

Participaram desta etapa do estudo 32 meninos, sendo 22 pacientes com DMD e dez controles. A média de idade dos pacientes com DMD no momento da biópsia foi de 6,9 anos, DP $\pm 2,4$, variando de 1,9 a 11,8 anos. A média de idade dos controles no momento da biópsia foi de 8 anos, DP $\pm 2,69$, variando de 4 a 12 anos. Quando comparadas, as idades de pacientes e controles apresentaram similaridade ($p=0,294$).

5.1.2 Quantificação de CoQ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular

Foram analisados, para quantificação de CoQ₁₀, fragmentos de músculo esquelético de 22 pacientes com DMD e dez controles. A média dos valores obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Quantificação de CoQ₁₀ nas biópsias musculares – etapa retrospectiva.

Quantificação de CoQ₁₀ ($\mu\text{g/g}$ de tecido)	DMD (n=22)	Controles (n=10)
Média $\pm$ DP	8,6 $\pm$ 3,9	31,6 $\pm$ 6,9
Mín-Máx	1,2 – 16,7	20,6 – 39,4

n= número de participantes; DP= desvio padrão; Mín= mínimo valor encontrado; máx= máximo valor encontrado

Os resultados evidenciam redução significativa de CoQ₁₀ na biópsia muscular de pacientes com DMD em comparação aos controles ($p<0,001$). Em decorrência da possibilidade de que a grande deficiência de CoQ₁₀ nas biópsias musculares nos pacientes com DMD resultasse da perda de fibras musculares pelo processo degenerativo, vimos a necessidade de estudar a relação dessa deficiência com a grau de perda de fibras musculares nesses pacientes, para tanto procedemos à realização das análises morfométricas.

5.1.3 Dosagem de CoQ₁₀ e a sua relação com a perda de fibras musculares

A perda de fibras musculares foi quantificada através da análise morfométrica com o cálculo da área ocupada por fibras musculares em relação a área total do fragmento de biópsia muscular. Tal análise foi realizada em 9 pacientes com DMD e 2 controles representativos. As figuras 2 a 4 retratam as características histológicas encontradas nas biópsias e ilustram claramente o comprometimento muscular nos pacientes com DMD, quando comparado aos controles.

Figura 2. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente com DMD aos 11,8 anos de idade. A área ocupada por fibras musculares corresponde a 5,9% da área transversal total do fragmento. É possível visualizar variação no diâmetro das fibras, sendo a maioria delas atróficas. Nota-se também a presença de muitos adipócitos e tecido conjuntivo.

Figura 3. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente com DMD aos 9,5 anos de idade. A área ocupada por fibras musculares corresponde a 35,2% da área transversal total do fragmento. É possível visualizar algumas fibras atroficas. Nota-se também a presença de adipócitos e tecido conjuntivo.

Figura 4. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente controle aos 10 anos de idade. A área ocupada por fibras musculares corresponde a 85% da área transversal total do fragmento. Nota-se a distribuição normal do tecido conjuntivo, sendo mais abundante no perimísio.

A média da área ocupada por fibras musculares nos pacientes com DMD foi de 27,3% (DP $\pm$ 14,2%), variando de 5,9% a 51,1% nos pacientes com DMD e de 89,2% (DP $\pm$ 3,3%), variando de 85% a 93,2% nos controles.

A dosagem de CoQ₁₀ foi realizada em fragmentos consecutivos aos utilizados na análise morfométrica dos pacientes com DMD.

O teste de Spearman evidenciou alta correlação entre a quantidade de CoQ₁₀ e área relativa ocupada por fibras musculares ($r= 0,767$ e $p= 0,016$), sugerindo que a baixa concentração de CoQ₁₀ nas biópsias musculares de pacientes com DMD seja decorrente da perda de fibras musculares. Entretanto, a análise individualizada dos resultados, apresentada na tabela 3 suscitou a possibilidade de haver deficiência real da CoQ₁₀ nas fibras musculares de pacientes com DMD. Tomando como exemplo o paciente 1, observa-se que apresenta área relativa de fibras musculares de 51,2% e dosagem de CoQ₁₀ de 7,5 μ g/g de tecido.

Tabela 3. Área relativa de fibras musculares e quantificação da CoQ₁₀ em pacientes com DMD – etapa retrospectiva.

Pacientes	Área relativa de fibras musculares (%)	Quantificação de CoQ ₁₀ (μ g/g de tecido)
1	51,2	7,5
2	40,5	16,7
3	35,2	8,8
4	28,1	7,2
5	27,7	10,2
6	24,7	6,8
7	23	1,2
8	9,3	1,6
9	5,9	5,0

A fim de determinar se a redução da quantidade de CoQ₁₀ representava deficiência da coenzima nas fibras musculares, ou simplesmente refletia a carência de fibras, prosseguimos com a realização de ensaios enzimáticos da cadeia respiratória. Nesses ensaios, que podem ser normalizados relativamente à quantidade de mitocôndrias na amostra, a presença de CoQ₁₀ é essencial para o funcionamento

dos complexos II+III, cuja atividade pode, portanto, refletir a deficiência real da coenzima.

5.1.4 Ensaios enzimáticos da cadeia respiratória

As atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória dos pacientes com DMD e controles estão apresentadas na tabela 4. Nessa tabela pode-se observar uma redução significativa da massa mitocondrial, representada pela atividade da enzima citrato sintase, nas biópsias musculares dos pacientes com DMD e relação aos controles ($p < 0,001$). Por essa razão, a comparação das atividades enzimáticas da cadeia respiratória entre pacientes e controles foi realizada apenas considerando-se os valores corrigidos pela massa mitocondrial, ou seja, os valores representados pela relação com a atividade da citrato sintase.

Tabela 4. Ensaios enzimáticos da cadeia respiratória e da citrato sintase.

Complexos enzimáticos	Valores absolutos*		Relação com a citrato sintase		
	Pacientes (n=22)	Controles (n=10)	Pacientes (n=22)	Controles (n=10)	p^{**}
CI	2,89 ± 1,23	6,28 ± 1,96	0,31 ± 0,08	0,36 ± 0,06	0,166
CII	7,36 ± 3,62	5,19 ± 1,42	0,95 ± 0,61	0,30 ± 0,04	<0,001
CII+III	0,96 ± 0,45	3,49 ± 1,20	0,11 ± 0,03	0,20 ± 0,04	<0,001
CIII	7,10 ± 3,38	7,52 ± 1,88	0,79 ± 0,33	0,44 ± 0,11	0,003
CIV	9,04 ± 3,66	16,95 ± 5,39	1,01 ± 0,33	0,96 ± 0,19	0,730
CS	9,09 ± 3,20	17,36 ± 3,95			

Resultados apresentados como média ± desvio padrão; *valor absoluto expresso em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tecido; n= número de participantes; **comparação dos valores normalizados para atividade da citrato sintase; C = complexo da cadeia respiratória; CS = citrato sintase.

Os resultados demonstram não haver deficiência dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória. Tanto a atividade do complexo II quanto a do complexo III se encontram acima dos valores obtidos para os controles. Já o resultado do ensaio conjunto dos complexos II+III, para o qual a presença de CoQ_{10} é essencial, encontra-se significativamente reduzida nos pacientes com DMD. Esse achado comprova a ocorrência de deficiência de CoQ_{10} nas fibras musculares de pacientes com DMD. A resposta da atividade dos complexos II+III à adição de CoQ_{10} ao ensaio enzimático, apresentada na tabela 5, reforça a existência de deficiência da coenzima no músculo

esquelético de pacientes com DMD. Nesses, a adição de CoQ₁₀ resultou em significativo aumento da atividade dos complexos II+III (porcentagem de recuperação), quando comparado ao aumento exibido pelos controles.

Tabela 5. A atividade dos complexos II+III da cadeia respiratória sem e com adição de CoQ₁₀.

	CII+III*	CII+III* com CoQ₁₀	% Recuperação
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
	Mín – Máx	Mín – Máx	Mín – Máx
Pacientes	0,8 ± 0,5	5,4 ± 2,0	842 ± 506
(n=22)	0,06 – 2,01	1,64 – 9,2	356 - 2733
Controles	3,3 ± 1,4	11,1 ± 2,5	395 ± 192
(n= 10)	1,71 – 4,8	7,24 – 12,93	128 – 845
p	<0,001	<0,001	0,001

*Valor absoluto expressos em µmoles/min/g de tecido; C= complexo da cadeia respiratória; DP= desvio padrão; Mín= mínimo valor encontrado; máx= máximo valor encontrado; n= número de participantes.

5.2 Etapa prospectiva

5.2.1 Casuística

Participaram desta etapa do estudo 10 meninos com DMD. As análises laboratoriais foram comparadas aos mesmos 10 controles da etapa anterior. Os familiares foram questionados quanto à idade de início dos sintomas, e a partir desses dados, foi calculado o tempo de evolução da doença. A caracterização dos pacientes com DMD está apresentada na tabela 6.

Tabela 6. Caracterização dos pacientes com DMD (n=10) – etapa prospectiva.

	Idade no momento	Idade de início	Tempo de evolução
	da biópsia*	dos sintomas*	da doença*
Média ± DP	6,5 ± 2,4	2,2 ± 1,5	3,5 ± 2,1
Mín-Máx	1,8 – 10,7	0,5 – 5	1,1 – 6,2

*valores expressos em anos; DP= desvio padrão; Mín= mínimo valor encontrado; máx= máximo valor encontrado

A média de idade dos pacientes com DMD no momento da biópsia foi de 6,5 anos, DP= $\pm 2,4$, variando de 1,8 e 10,7 anos. A média de idade dos controles no momento da biópsia foi de 8 anos, DP $\pm 2,69$, variando de 4 a 12 anos. Quando comparadas, as idades de pacientes e controles apresentaram similaridade ($p=0,325$).

5.2.2 Quantificação de CoQ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular

A quantificação da CoQ₁₀ nos fragmentos de músculo esquelético dos 10 pacientes com DMD está apresentada na tabela 7, em comparação aos 10 controles.

Tabela 7. Quantificação de CoQ₁₀ nos pacientes e controles – etapa prospectiva.

Quantificação de CoQ ₁₀ ($\mu\text{g/g}$ de tecido)	DMD (n=10)	Controles (n=10)
Média $\pm$ DP	12,6 $\pm$ 5,1	31,6 $\pm$ 6,9
Mín-Máx	5,3 – 21,8	20,6 – 39,4

n= número de participantes; DP= desvio padrão; Mín= mínimo valor encontrado; máx= máximo valor encontrado

Os resultados evidenciam redução significativa de CoQ₁₀ na biópsia muscular de pacientes com DMD em comparação aos controles ($p<0,001$), confirmando o achado da etapa retrospectiva do estudo.

5.2.3 Dosagem de CoQ₁₀ e a sua relação com a perda de fibras musculares

Análise morfológica para quantificar a perda de fibras musculares foi realizada em oito pacientes com DMD e dois controles representativos. As figuras 6 e 7 retratam as características histológicas encontradas nas biópsias e ilustram claramente o comprometimento muscular nos pacientes com DMD.

Figura 5. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente com DMD aos 8,7 anos de idade. A área ocupada por fibras musculares corresponde a 19,2% da área transversal total do fragmento. É possível visualizar variação no diâmetro das fibras. Nota-se também a presença de muitos adipócitos e tecido conjuntivo.

Figura 6. Fragmento de biópsia do músculo quadríceps de um paciente com DMD aos 6,1 anos de idade. A área ocupada por fibras musculares corresponde a 31,8% da área transversal total do fragmento. É possível visualizar variação no diâmetro das fibras. Nota-se também a presença de adipócitos e tecido conjuntivo.

A média da área ocupada por fibras musculares nos pacientes com DMD foi de 40,3% (DP $\pm$ 20,4%), variando de 7,3% a 65,2%. Conforme apresentado

anteriormente, a área ocupada por fibras musculares nos controles foi de 89,2% (DP $\pm 3,3\%$), variando de 85% a 93,2% nos controles.

A dosagem de CoQ₁₀ foi realizada em fragmentos consecutivos aos utilizados na análise morfométrica nos pacientes com DMD.

Confirmando os resultados obtidos na etapa retrospectiva, o teste de Spearman evidenciou alta correlação entre a quantidade de CoQ₁₀ e área relativa ocupada por fibras musculares ($r = 0,690$ e $p = 0,058$), sugerindo que a baixa concentração de CoQ₁₀ nas biópsias musculares de pacientes com DMD seja decorrente da perda de fibras musculares. Entretanto, a análise individualizada dos resultados, apresentada na tabela 8 corroborou com a hipótese de deficiência real da CoQ₁₀ nas fibras musculares de pacientes com DMD, como exemplificado no paciente 4 que apresenta área relativa de fibras musculares de 43,1% e dosagem de CoQ₁₀ de 8,6 $\mu\text{g/g}$ de tecido.

Tabela 8. Área relativa de fibras musculares e quantificação da CoQ₁₀ em pacientes com DMD – etapa prospectiva.

Pacientes	Área relativa de fibras musculares (%)	Quantificação de CoQ ₁₀ ($\mu\text{g/g}$ de tecido)
1	65,3	18,7
2	63,3	9,0
3	52,4	21,8
4	43,1	8,6
5	40,1	13,7
6	31,8	11,6
7	19,2	8,4
8	7,3	5,3

A fim de determinar se a redução da quantidade de CoQ₁₀ e a porcentagem da área relativa ocupada por fibras musculares repercutia na função motora desses pacientes, prosseguimos com a avaliação da capacidade funcional.

5.2.4 Avaliação da capacidade funcional

A avaliação da capacidade funcional foi realizada por meio dos seguintes instrumentos: MFM, NSAA, T10, TGowers e TC6min. Os resultados obtidos com a avaliação dos pacientes com DMD com esses instrumentos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Estatística descritiva dos instrumentos de avaliação da capacidade funcional dos pacientes com DMD.

	Faixa de variação		Média $\pm$ DP
	Teórica	Obtida	
MFM Total (%)	0 – 100	49 – 94,8	80,5 $\pm$ 16,4
D1 (%)	0 – 100	7,7 – 92,3	61,8 $\pm$ 33,2
D2 (%)	0 – 100	88,9 – 100	97,2 $\pm$ 3,7
D3 (%)	0 – 100	42,9 – 100	86,7 $\pm$ 17,5
NSAA	0 – 34	6 – 34	25,2 $\pm$ 9,8
T10 (seg)	-	4 – 11	6,9 $\pm$ 2,6
TGowers (seg)	-	3 – 10	6,4 $\pm$ 3
TC6min (m)	-	161,6 – 340	276,4 $\pm$ 67

DP= desvio padrão; MFM= Medida da Função Motora; D1= Dimensão 1 da MFM – posição em pé e transferências; D2= Dimensão 2 da MFM – função motora axial e proximal; D3= Dimensão 3 da MFM – função motora distal; NSAA= Escala de Avaliação para deambulantes *North Star*; T10= Tempo para percorrer 10 metros; TGowers= Tempo para manobra de Gowers; TC6min= Teste da Caminhada dos 6 minutos; seg= segundo; m= metros.

A MFM foi aplicada em dez pacientes, já que é um instrumento que pode ser realizado em qualquer fase da doença. Considerando seus escores, a D1 (posição em pé e transferências) foi a que obteve menor média (61,8% DP $\pm$ 33,2) indicando maior dificuldade na realização das atividades que compreendem esta dimensão. A pontuação total máxima da MFM não foi observada em nenhum paciente. A NSAA, instrumento desenvolvido apenas para meninos que deambulam, foi realizada em seis pacientes. A média da pontuação total pela escala foi de 25,2 pontos (DP $\pm$ 9,8), sendo que um paciente apresentou a pontuação máxima de 34. Em relação aos testes cronometrados T10 e TGowers, altos valores indicam maior comprometimento dos pacientes, sendo então, estes testes inversos aos demais. O T10 foi realizado por oito pacientes, sendo a média obtida de 6,9 segundos (DP $\pm$ 2,6). O TGowers é um teste com um maior grau de dificuldade e, portanto, apenas por cinco pacientes foram

capazes de realiza-lo, sendo a média obtida de 6,4 segundos (DP ± 3). O TC6min exige resistência e maior colaboração dos pacientes; portanto, apenas seis pacientes foram capazes de realiza-lo, com média foi de 276,4 metros (DP ± 67).

5.2.5 Correlação da CoQ₁₀ com parâmetros clínicos e avaliação da capacidade funcional

A correlação da dosagem da CoQ₁₀ e da área relativa de fibras musculares com os parâmetros clínicos nos pacientes com DMD estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Correlação da dosagem da CoQ₁₀ e da área relativa de fibras musculares com parâmetros clínicos.

	Idade no momento da biópsia	Idade de início dos sintomas	Tempo de evolução da doença
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
CoQ₁₀	-0,16	-0,30	0,14
% fibras	-0,07	0,89*	-0,20

r= coeficiente de correlação de Spearman; nível de significância **p*<0,05.

Confrontando as hipóteses estabelecidas para o estudo, a correlação da quantificação de CoQ₁₀ e idade no momento da biópsia, idade de início dos sintomas e tempo de evolução da doença foi muito baixa.

A tabela 11 apresenta os valores de correlação da dosagem da CoQ₁₀ e da área relativa de fibras musculares com os instrumentos de avaliação da capacidade funcional.

Tabela 11. Correlação da CoQ₁₀ com os instrumentos de avaliação da capacidade funcional.

	MFM Total	MFM D1	MFM D2	MFM D3	NSAA	T10	TGowers	TC6min
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
CoQ₁₀	0,41	0,57*	0,43	0,01	0,49	-0,54	-0,97**	0,54
% fibras	0,36	0,44	0,35	0,24	-0,05	-0,21	-0,40	-0,30

MFM= Medida da Função Motora; D1= Dimensão 1 da MFM – posição em pé e transferências; D2= Dimensão 2 da MFM – função motora distal; D3= Dimensão 3 da MFM – função motora axial e proximal; NSAA= Escala de Avaliação para deambulantes *North Star*; TC6min= Teste da Caminhada dos 6 minutos; T10= Tempo para percorrer 10 metros; TGowers= Tempo para manobra de Gowers; *r*= coeficiente de correlação de Spearman; nível de significância **p*<0,05; ***p*<0,01.

A correlação da CoQ₁₀ com os instrumentos de avaliação da capacidade funcional foi predominantemente moderada, com exceção da dimensão 3 da MFM (função motora distal) que não se correlacionou com a dosagem de CoQ₁₀ ($r=0,01$) e o TGowers que obteve o melhor índice de correlação ($r= -0,97$, muito alta correlação). Em relação à área relativa de fibras musculares, houve moderada correlação com a dimensão 1 da MFM (posição em pé e transferências) e com o TGowers ($r=0,44$ e $-0,40$, respectivamente). Os demais instrumentos apresentaram baixa correlação com a área percentual de fibras no fragmento da biópsia muscular. Os valores negativos de correlação para os testes cronometrados T10 e TGowers indicam que estes instrumentos são inversos na sua pontuação, ou seja, maiores valores indicam pior capacidade funcional.

6. DISCUSSÃO

Estudos anteriores sugeriram haver disfunção mitocondrial na DMD, sendo documentadas alterações na fosforilação oxidativa, estresse oxidativo e apoptose em pacientes com a doença (TERRIL et al., 2013; PETRILLO et al, 2017).

Aspecto importante da função mitocondrial é o funcionamento da cadeia respiratória, que pode ser avaliado considerando a atividade dos complexos enzimáticos isoladamente, ou através de análise global que resulta no consumo de O_2 . Para a análise dos complexos enzimáticos isoladamente, os substratos, cofatores e coenzimas necessários para a atividade daquele complexo são acrescentados à reação, portanto avalia o funcionamento do complexo enzimático propriamente dito, enquanto que o consumo de O_2 avalia o processo da cadeia respiratória como um todo.

A avaliação da respirometria e consumo de O_2 em estudos prévios, demonstraram taxas de oxidação diminuídas e um fraco acoplamento da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias de pacientes com DMD (SPERL et al., 1997). Entretanto, a literatura é escassa no que se refere a estudos que avaliaram isoladamente a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial no músculo esquelético de pacientes com DMD e não encontramos estudos que realizaram a quantificação da CoQ_{10} nesses pacientes. A identificação de uma possível deficiência de CoQ_{10} tem implicações importantes para a compreensão da fisiopatologia da DMD, assim como das respostas terapêuticas a essa coenzima, ou ao seu análogo sintético idebenona. Compreender o papel da CoQ_{10} na DMD deverá resultar em novas propostas terapêuticas para a doença.

A estruturação do presente estudo baseou-se na realização de uma análise retrospectiva e outra prospectiva. Este desenho de estudo justifica-se pela expectativa de observarmos alterações leves relacionadas à disfunção mitocondrial nos pacientes com DMD, já que o defeito primário é a ausência da distrofina e não uma anormalidade de fundo metabólico. Nesse caso, embora não tenha sido realizado um cálculo amostral, seria necessária uma amostra robusta para se obter significância estatística. A possibilidade de avaliação de biópsias musculares de pacientes com DMD nos dias atuais é também bastante restrita. Com o avanço nos métodos diagnósticos, a realização de biópsia muscular na investigação de rotina da doença tem sido muito menos frequente. Portanto, a análise retrospectiva foi necessária para que

podéssemos utilizar amostras armazenadas de biópsias musculares e obter número amostral que permitisse chegar a significância estatística, caso fossem observadas alterações. Portanto, o presente estudo foi realizado com amostragem de conveniência, a partir das biópsias disponíveis no laboratório. Com a necessidade de investigar a correlação da dosagem da CoQ₁₀ com a capacidade funcional, foi elaborada uma etapa prospectiva, para a qual recrutamos menor número de pacientes, em decorrência das restritas indicações de biópsia muscular na DMD nos dias atuais.

No que se refere ao tempo de armazenamento das biópsias musculares, não consideramos ser este um fator relevante para os resultados. Observamos que, embora as biópsias da etapa retrospectiva estivessem armazenadas há longo tempo (entre 7 e 18 anos), as mesmas ficaram preservadas em nitrogênio líquido e não constatamos diferenças significativas na quantificação de CoQ₁₀ entre os pacientes com DMD da etapa retrospectiva e da prospectiva.

Quanto aos valores normais, constituímos um grupo restrito de pacientes controles, pois as especificidades de faixa etária, sexo e a necessidade de se tratar de biópsia muscular com anormalidades mínimas restringe o tamanho da amostra. Entretanto, Lamperti et al. (2003) analisaram 121 amostras de músculo e obtiveram uma média de 27,64 ($\pm$ 4,43) μ g/g de tecido fresco e Pastore et al. (2005) avaliaram 40 crianças saudáveis e reportaram uma média de CoQ₁₀ de 18,34 ($\pm$ 5,48) pmoles/mg de tecido, que corresponde a aproximadamente 21,2 ($\pm$ 6,35) μ g/g de tecido, demonstrando similaridade com os nossos resultados controles (30,6 $\pm$ 7,1 μ g/g de tecido). Subsequentemente, Pastore et al. (2012) avaliaram 148 crianças para determinar os níveis de deficiência de CoQ₁₀ no músculo esquelético nessa população. Os valores normais de CoQ₁₀ total, correspondentes a 80 crianças, variaram entre 21,7 e 88,75 μ mol/g de tecido; valores entre 0,82 e 4,88 μ mol/g de tecido representam deficiência grave; entre 5,43 e 9,76 μ mol/g de tecido indicam deficiência intermediária; entre 10,21 a 19,1 μ mol/g de tecido representam deficiência leve.

Os nossos resultados demonstram que a CoQ₁₀ está deficiente nos pacientes com DMD e, seguindo os critérios de Pastore et al. (2012), cerca de 60% dos nossos pacientes apresentariam deficiência moderada ou grave. Uma das dificuldades na interpretação desse dado em pacientes com distrofia muscular é o fato da biópsia muscular conter representação variável de fibras musculares, conforme o estado de

degeneração do tecido muscular biopsiado. Portanto, avaliar a quantificação da CoQ₁₀ em relação à representatividade de fibras musculares no fragmento de biópsia utilizado é essencial para auxiliar na interpretação da deficiência.

Não é do nosso conhecimento a existência de estudos que quantificaram a CoQ₁₀ em pacientes com DMD. Por outro lado, Miles et al. (2005), em um grupo de cinco pacientes com distrofia muscular (2 pacientes com distrofia muscular congênita; 2 com distrofias muscular do tipo cinturas e 1 com distrofia muscular de Becker), detectaram deficiência de CoQ₁₀ e aumento da razão redox, sendo sugerido que este aumento seria um processo compensatório de defesa antioxidante do organismo. Como esses autores não analisaram a relação da dosagem da CoQ₁₀ e a representatividade de fibras no fragmento de biópsia muscular utilizado, não é possível discutir se a deficiência observada foi decorrente de menor proporção de fibras musculares na amostra, comparativamente ao peso do fragmento. Entretanto, os resultados foram analisados em relação à massa mitocondrial, mensurada pela atividade da citrato sintase. A ausência de correlação entre a atividade desta enzima e a dosagem de CoQ₁₀ sugere deficiência real da coenzima.

Com a finalidade de elucidar se a diminuição de CoQ₁₀ observada nos nossos pacientes com DMD era real ou resultava da perda de fibras musculares decorrentes do processo degenerativo, analisamos a relação da dosagem da coenzima com o grau de perda de fibras musculares. A análise morfométrica foi então realizada em fragmentos consecutivos aos utilizados para a mensuração da CoQ₁₀, para determinar a área relativa ocupada por fibras musculares. A correlação da quantificação de CoQ₁₀ no músculo e a proporção da área ocupada por fibras musculares foi elevada, sugerindo que a diminuição na concentração de CoQ₁₀ nas biópsias musculares de pacientes com DMD pudesse ser decorrente da perda de fibras musculares. Como a deficiência observada foi exuberante e não associada a redução proporcional do número de fibras em todos os pacientes, ficou claro que seria necessário prosseguir com a investigação da real situação em relação ao comprometimento da CoQ₁₀ no músculo esquelético de pacientes com DMD.

O estudo da atividade da cadeia respiratória poderia confirmar a alteração na quantificação da CoQ₁₀, evidenciando atividade normal dos complexos II e III quando mensurados isoladamente, e redução da atividade desses complexos quando medidos em conjuntos, por necessitarem da presença da coenzima para a atividade nessa situação.

Nessa análise, os resultados são corrigidos de acordo com a concentração de proteínas, o peso do fragmento e a atividade de uma enzima não pertencente à cadeia respiratória (usualmente a citrato sintase) para representar a massa mitocondrial. A correção da atividade em relação à massa mitocondrial é essencial para obter resultados mais fidedignos, pois obviamente a situação de menor concentração de mitocôndrias resultará em menor atividade enzimática.

Podemos observar, nos nossos resultados, que a massa mitocondrial foi menor nos pacientes com DMD do que nos controles, pois o processo degenerativo resulta em perda de fibras musculares e, portanto, o fragmento utilizado contém menor representatividade de fibras musculares e maior conteúdo de tecido de sustentação. Em decorrência da elevada demanda de energia da fibra muscular, o conteúdo de mitocôndrias na fibra é maior do que do tecido conjuntivo. Portanto, pesos semelhantes dos fragmentos de músculo dos pacientes e controles não significam quantidades semelhantes da organela. O mesmo se aplica à quantificação de proteínas.

Ao contrário de Jongpiputvanich et al. (2005), não identificamos deficiência dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, quando analisados isoladamente. No referido estudo, foram analisados seis pacientes com DMD, identificando alterações nos complexos III e IV. Entretanto, não foi identificada alteração da atividade da citrato sintase e os valores apresentados não foram corrigidos em relação a esta enzima.

A diferença significativa nos valores das atividades dos complexos II e III, quando mensurados isoladamente, entre pacientes e controles, com resultados mais elevados nos pacientes, pode ser justificada pelo fato de não se tratarem de reações lineares. Dentre as atividades mensuradas, justamente as dos complexos II e III são as menos lineares, evoluindo como uma curva parabólica, atingindo platô ainda durante o tempo de mensuração da reação. Nessa condição, a presença de maior quantidade de mitocôndrias resulta em consumo mais rápido dos substratos logo no início da reação, antes que efetivamente seja iniciada a mensuração pelo espectrofotômetro. O que se pode concluir com a análise dessas reações é que não há deficiência da atividade desses complexos nos pacientes com DMD.

Já a atividade dos complexos II+III, medidos em conjunto, apresenta reação próxima à linearidade, portanto os valores corrigidos em relação à massa mitocondrial são mais fidedignos. Para a atividade enzimática do conjunto complexo II+III, a presença de CoQ é essencial. Portanto, na situação de normalidade da atividade dos

complexos II e III isoladamente e deficiência da atividade dos complexos II+III, infere-se deficiência da coenzima. Montero et al., (2008) em seu estudo, relatam a diminuição da atividade dos complexos II + III como biomarcador mais sensível da deficiência de CoQ.

Os resultados obtidos com a adição de CoQ₁₀ à reação referente ao ensaio enzimático II+III, demonstrou um aumento proporcionalmente maior dos valores de pacientes quando comparados com controles, confirmando a hipótese de deficiência nos pacientes. Convém ressaltar que os experimentos iniciais que definiram a quantidade de CoQ₁₀ a ser adicionada nos ensaios enzimáticos, foram realizadas em pacientes e controles de forma que a reação ocorresse em condições de saturação de CoQ₁₀ para ambos (dados não publicados).

Avaliação da correlação entre capacidade funcional e dosagem de CoQ₁₀ nos pacientes com DMD trouxe ainda maior evidência quanto à deficiência real da coenzima na musculatura desses pacientes, já que foi observada correlação de moderada a muito alta com todos os instrumentos aplicados. Os instrumentos utilizados para análise da capacidade funcional variaram desde instrumentos abrangentes como a MFM, até mais restritos, como o TGowers, que considera unicamente a capacidade de se levantar do chão. Observa-se nitidamente que os instrumentos relacionados de forma mais restrita à força muscular proximal dos membros inferiores apresentaram maior correlação com a dosagem de CoQ₁₀. Como observamos correlação entre a dosagem da coenzima e a representatividade de fibras no fragmento da biópsia muscular e, reconhecidamente, a perda de fibras compromete a capacidade funcional nos pacientes com DMD, tais achados poderiam refletir unicamente a perda de fibras musculares. Entretanto, quando analisada a correlação entre a área proporcional de fibras musculares e os resultados das avaliações da capacidade funcional, observamos menores magnitudes de correlação com os escores de todos os instrumentos utilizados. Tais resultados indicam que os níveis de CoQ₁₀ propriamente ditos interferem, de algum modo, na performance da avaliação da capacidade funcional. A correlação mais alta foi observada com o TGowers, o que é justificável pelo fato de que, para a realização do teste, que consiste em levantar do chão, os músculos extensores proximais, como o quadríceps (músculo biopsiado) são mais exigidos. Portanto, tempo maior para realização do teste retrata uma maior dificuldade e conseqüentemente um maior comprometimento dessa musculatura.

Embora não tenha sido realizada avaliação ampla da função mitocondrial em decorrência tanto da disponibilidade de tecido muscular armazenado, quanto do fato de se tratarem de amostras congeladas, os nossos resultados demonstram que a CoQ₁₀ está deficiente nos pacientes com DMD.

A deficiência secundária CoQ₁₀ nos pacientes com DMD poderia ser, a princípio, resultante do processo degenerativo em si. Um processo degenerativo com ciclos frequentes de degeneração e regeneração poderia resultar em senescência das células envolvidas na formação de novas fibras musculares e comprometer a qualidade dessas fibras. Isso ocorreria independentemente do processo degenerativo ser decorrente da ausência de distrofina, como no caso da DMD, ou de algum outro defeito que culmine em degeneração muscular, como ocorre nas demais formas de distrofia.

Os resultados obtidos por Miles et al. (2005) sugerem essa hipótese, entretanto, ampliação das análises em maior número de biópsias musculares de pacientes com distrofia muscular deverá contribuir para a elucidação dessa questão.

No que se refere às limitações do estudo, o tamanho da amostra, especialmente na etapa prospectiva, pode ter interferência nos resultados, principalmente nas análises de correlação. Como exemplo, a falta de correlação com os parâmetros clínicos de faixa etária pode ser decorrente do reduzido número da amostra. A faixa de variabilidade das idades da etapa prospectiva foi pequena, o que pode ter resultado na ausência de correlação tanto da quantidade de CoQ₁₀ quanto da porcentagem relativa de fibras musculares com as idades no momento da biópsia e o tempo de evolução da doença.

Portanto, estudos futuros, mais abrangentes, são necessários para prosseguir na investigação da importância da deficiência da CoQ₁₀ no músculo esquelético de pacientes com DMD.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo, concluímos que:

- Existe uma deficiência secundária de CoQ₁₀ em pacientes com DMD;
- O comprometimento cadeia respiratória ocorreu apenas devido à deficiência da coenzima, pois a atividade dos complexos enzimáticos, isoladamente, não apresentou deficiência;
- Embora a perda de fibras musculares tenha influenciado o resultado da dosagem de CoQ₁₀, os resultados indicam haver deficiência real da coenzima na DMD;
- A deficiência de CoQ₁₀ não foi influenciada pela idade na biópsia, idade de início e tempo de evolução da doença dentro das faixas etárias representadas no presente estudo;
- A dosagem de CoQ₁₀ se correlacionou com a capacidade funcional relacionada à função proximal dos membros inferiores mais fortemente que a perda de fibras musculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTSMA-RUS, A. et al. Development of exon skipping therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: a critical review and a perspective on the outstanding issues. **Nucleic Acid Therapeutics**, New York, v. 27, n. 5, p. 251 - 259, 2017.

ACOSTA, M. J. et al. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, New York, v. 1857, n. 8, p. 1079 - 1085, 2016.

AJZEN, I. **Understanding attitudes and predicting social behavior**. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1998. p. 97 - 99.

ALLEN, D. G.; WHITEHEAD, N. P.; FROEHNER, S. C. Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: roles of Ca^{2+} , reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 96, p. 253 - 305, 2016.

ARAÚJO, A. P. Q. et al. Brazilian consensus on Duchenne muscular dystrophy. Part 1: diagnosis, steroid therapy and perspectives. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 75, n. 8, p. 104 - 113, 2017.

BACH, J. R.; MARTINEZ, D. Duchenne muscular dystrophy: continuous noninvasive ventilatory support prolongs survival. **Respiratory Care**, Irving, v. 56, n. 6, p. 744 - 750, 2011.

BEENAKKER, E. A. C. et al. Functional ability and muscle force in healthy children and ambulant Duchenne muscular dystrophy patients. **European Journal of Paediatric Neurology**, New York, v. 9, p. 387 - 393, 2005.

BENÁ, M. I. et al. Reprodutibilidade e validade do Teste Cronometrado de Percorrer 10 metros para quantificação da função motora na DMD. In: XX Fórum do departamento científico de moléstias neuromusculares da Academia Brasileira de Neurologia, 2016, Belo Horizonte-MG.

BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, New York, v. 7, Suppl, p. S41 - S50, 2007.

BÉRARD, C. et al. A motor function measure for neuromuscular diseases: Construction and validation study. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 15, p. 463 - 470, 2005.

BIRCH-MACHIN, et al. An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, New York, v. 51, p. 35 - 42, 1994.

BIRNKRANT, D. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. **Lancet Neurology**, London, v. 17, n. 3, p. 251 - 267, 2018a.

BIRNKRANT, D. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. **Lancet Neurology**, London, v. 17, n. 4, p. 347 - 361, 2018b.

BIRNKRANT, D. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. **Lancet Neurology**, London, Available online 2 February, 2018c.

BLADEN, C. L. et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. **Human Mutation**, New Jersey, v.36, n. 4, p. 395 - 402, 2015.

BLAKE, D. J. et al. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, p. 291 - 329, 2002.

BROOKE, M. H. et al. Clinical Trials in Duchenne dystrophy. I. The design of the protocol. **Muscle & Nerve**, New York, v. 4, p. 186 - 197, 1981.

BROOKE, M. H. et al. Clinical Investigation in Duchenne dystrophy: 2. Determination of the “power” of therapeutic trials based on the natural history. **Muscle & Nerve**, New York, v. 6, p. 91 - 103, 1983.

BROWN, R. H. Free radicals, programmed cell death and muscular dystrophy. **Current Opinion in Neurology**, London, v. 8, n. 5, p. 373 - 378, 1995.

BONILLA, E. et al. Duchenne Muscular Dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. **Cell**, Cambridge, v. 54, p. 447 - 452, 1988.

BUETLER, T. M. et al. Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx and protects against reactive oxygen species. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 749 - 753, 2002.

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

BUTLAND, R. J. Two-, six-, and 12- minute walking tests in respiratory disease. **British Medical Journal**, London, v. 284, p. 1607 - 1608, 1982.

BUYSE, G. M. et al. Treatment effect of idebenone on inspiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Pediatric Pulmonology**, New Jersey, v. 52, n. 4, p. 508 – 515, 2017.

BUYSE, G. M. et al. Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. **Lancet**, London, v. 385, p. 1748 - 1757, 2015.

BUYSE, G. M. et al. Effects of Glucocorticoids and Idebenone on Respiratory Function in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. **Pediatric Pulmonology**, New Jersey, v. 48, n. 9, p. 912 - 920, 2013.

BUYSE, G. M. et al. Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: results from 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 21, p. 396 – 405, 2011.

CHANG, W. J. et al. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, p. 9142 - 9147, 1996.

DAVIES, K. E. et al. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus in the short arm of the human X chromosome. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 11, n. 8, p. 2303 - 2312, 1983.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatric Neurology**, New York, v. 36, n. 1, p. 1 - 7, 2007.

DIMAURO, S.; SERVIDEI, S.; ZEVIANI, S.; et al. Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome. **Annals of Neurology**, New Jersey, v. 22, p. 498 – 506, 1987.

DIMAURO, S. et al. Mitochondria in neuromuscular disorders. **Biochimica et Biophysica Acta**, New York, p. 199 - 210, 1998.

DUDLEY R. W. R. et al. Sarcolemmal damage in dystrophin deficiency is modulated by synergistic interactions between mechanical and oxidative/nitrosative stresses. **American Journal of Pathology**, New York, v. 168, n. 4, p. 1276 - 1287, 2006.

EAGLE, M. et al. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. **Neuromuscular Disorders**, New York, v.12, p. 926 - 929, 2002.

EAGLE, M. Distrofia muscular de Duchenne. In: POUNTNEY, T. **Fisioterapia Pediátrica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap 15, p. 249 - 269.

EMERY, A. E. H. **Duchenne Muscular Dystrophy**. New York: Oxford University Press, 1987.

EMERY, A. E. H. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-a world survey. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 1, n. 1, p. 19 - 29, 1991.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **British Medical Journal**, London, v. 317, p. 991 - 995, 1998.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **Lancet**, London, v. 359, p. 687 - 695, 2002.

ENGEL, A. G.; OSAWA, E. Dystrophinopathies. In: ENGEL, A. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology**. 3a Edição. New York: McGraw-Hill, 2004. cap 34, p. 961 - 1025.

ENRIGHT, P. L. The six-minute walk test. **Respiratory Care**, Irving, v. 48, n. 8, p. 783 - 785, 2003.

EVEN, P. C.; DECROUY, A.; CHINET, A. Defective regulation of energy metabolism in mdx-mouse skeletal muscles. **The Biochemical Journal**, London, v. 304, p. 649 - 654, 1994.

FAIRCLOUGH, R. J.; WOOD, M. J.; DAVIES, K. E. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 14, p. 373 - 378, 2013.

FLORENCE, J. M. Clinical trials in Duchenne dystrophy: standardization and reliability of evaluation procedures. **Physical Therapy**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 41 - 45, 1984.

FLORENCE, J. M. Doenças neuromusculares na infância e intervenção fisioterapêutica. In: TECKLIN, J. S. **Fisioterapia Pediátrica**. 3a Edição. Porto Alegre: Artmed, 2002. cap 6, p. 188 - 206.

FOLKERS, K.; SIMONSEN, R. Two successful double-blind trials with coenzyme Q10 (vitamin Q10) on muscular dystrophies and neurogenic atrophies. **Biochimica et Biophysica Acta**, New York, v. 24, p. 281 - 286, 1995.

FOLKERS, K. et al. Biochemical rationale an the cardiac response of patients with muscle disease to therapy with coenzyme Q10. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v. 82, p. 4513 - 4516, 1985.

FRANCO, A.; LANSMAN, J. B. Calcium entry through strech-inactivated íon channels in mdx myotubes. **Nature**, London, v. 344, p. 670 - 673, 1990.

GALPERN, W. R.; CUDKOWICZ, M. E. Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. **Mitochondrion**, New York, v. 7, Suppl, p. S146 – S153, 2007.

GEE, S. H. et al. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 18, p. 128 - 137, 1998.

GEIGER, R. et al. Six-minute walk test in children and adolescents. **The Journal of Pediatrics**, v. 150, p. 395 – 399, 2007.

HOFFMAN, E. P.; BROWN, R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, Cambridge, v. 51, p. 919 - 928, 1987.

ISHIKAWA Y. et al. Duchenne muscular dystrophy: survival by cardio-respiratory interventions. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 21, p. 47 - 51, 2011.

IWABE, C.; MIRANDA-PFEILSTICKER, B. H.; NUCCI, A. Medida da função motora: versão da escala para o português e estudo da confiabilidade. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 12, n. 5, p. 417 - 424, 2008.

JONES, H. R. et al. **The Netter Collection of Medical Illustrations**: Nervous System, Volume 7, Part II – Spinal Cord and Peripheral Motor and Sensory Systems. 2 Edition. Saunders, 2013. Section 12, p. 264.

JONGPIPUTVANICH, S.; SUEBLINVONG, T.; NORAPUCSUNTON, T. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in various neuromuscular disease. **Journal of Clinical Neuroscience**, New York, v. 12, n. 4, p. 426 - 428, 2005.

KAWAMUKAI, M. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Great Britain, v. 53, p. 217 - 226, 2009.

KOENING, M. et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and individuals. **Cell**, Cambridge, v. 50, p. 509 - 517, 1987.

KOENING, M.; MONACO, A. P.; KUNKEL, C. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. **Cell**, Cambridge, v. 53, n. 2, p. 219 - 228, 1988.

KONG, J.; ANDERSON, J. E. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. **Brain Research**, New York, v. 839, p. 298 - 304, 1999.

KUZNETSOV, A. V. et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 183, p. 87 - 96, 1998.

LAGIER-TOURENNE, C. et al. ADCK3, an Ancestral Kinase, Is Mutated in a Form of Recessive Ataxia Associated with Coenzyme Q10 Deficiency. **The American Journal of Human Genetics**, Birmingham, v. 82, p. 661 - 672, 2008.

LAMPERTI, C. et al. Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. **Neurology**, Minneapolis, v. 60, n. 7, p. 1206 - 1208, 2003.

LENAZ, G. et al. The function of coenzyme Q in mitochondria. **Clinical Investigation**, London, v. 71, p. S66 - S70, 1993.

LENAZ, G. et al. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. **Mitochondrion**, New York, v. 7 Suppl, p. S8 - S33, 2007.

LÓPEZ, L. C. Leigh syndrome with nephropathy and CoQ₁₀ deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. **American Journal of Human Genetics**, Bethesda, v. 79, n. 6, p. 1125 - 1129, 2006.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 193, p. 265 - 275, 1951.

MAH, J. K. et al. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 24, n. 6, p. 482 - 491, 2014.

MATTAR, F. L.; SOBREIRA, C. Hand weakness in Duchenne muscular dystrophy and its relation to physical disability. **Neuromuscular Disorders**, New York, v.18, p. 1993 - 198, 2008.

MAZZONE, E. S. et al. Reliability of the North Star Ambulatory Assessment in a multicentric setting. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 19, p. 458 - 461, 2009.

MAZZONE, E. S. et al. Functional changes in Duchenne muscular dystrophy: a 12-month longitudinal cohort study. **Neurology**, Minneapolis, v. 77, p. 250 - 256, 2011.

MAZZONE, E. S. et al. 24 months longitudinal data in ambulatory boys with Duchenne Muscular Dystrophy. **PLoS One**, California, v. 8, n.1, e52512, 2013.

MCDONALD, C. M. et al, Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. **The Lancet**, London, v. 391, n. 10119, p. 451 - 461, 2018.

MCDONALD, C. M. et al. Idebenone reduces respiratory complications in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 26, p. 473 - 480, 2016.

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**, New York, v. 48, n. 3, p. 343 - 356, 2013.

MCDONALD, C. M. et al. The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne Muscular Dystrophy. **Muscle & Nerve**, New York, v. 41, p. 500 - 510, 2010.

MEIER, T. et al. Characterization of pulmonary function in 10-18 year old patients with Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 27, p. 307 - 314, 2017.

MERCURI, E. et al. Categorizing natural history trajectories of ambulatory functional measured by the 6-minute walk distance in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 26, p. 576 - 583, 2016.

MILES, L. et al. Muscle Coenzyme Q: a Potencial Test for Mitochondrial Activity and Redox Status. **Pediatric Neurology**, New York, v. 32, n. 5, p. 318 - 324, 2005.

MONTERO, R. et al. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. **Clinical Biochemistry**, New York, v. 41, p. 697- 700, 2008.

MOXLEY, R. T. Functional testing. **Muscle & Nerve**, New York, v. 13 Suppl, p. S26 - S29, 1990.

MOXLEY, R. T. Clinical overview of Duchenne muscular dystrophy. In: CHAMBERLAIN, J. S.; RANDO, T. A. **Duchenne Muscular Dystrophy: advances in therapeutics**. New York: Taylor & Francis, 2006. cap 1, p. 1 - 20.

MUNTONI, F.; TORELLI, S.; FERLINI, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. **Lancet Neurology**, London, v.3, p. 731 - 740, 2003.

NAINI, A. et al. Primary coenzyme Q10 deficiency and the brain. **BioFactors**, New Jersey, v.18, p. 145 - 152, 2003.

NIEBRÓJ-DOBOSZ, I.; HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ, I. The involvement of oxidative stress in determining the severity and progress of pathological processes in dystrophin-deficient muscles. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 52, n. 5, p. 449 - 452, 2005.

OKAMA, L. O. et al. Reliability and validity analyses of the North Star Ambulatory Assessment in Brazilian Portuguese. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 27, p. 723 - 729, 2017.

OKAMA, L. O. et al. Functional changes in a longitudinal study in Duchenne muscular dystrophy: assessment with motor functional measure. In: Congresso Brasileiro de Neurologia, 27, 2016, Belo Horizonte. **Arquivos de Neuro-psiquiatria** (Anais). São Paulo: Academia Brasileira de Neurologia, 2016. p.198.

PANE, et al. Long Term Natural History Data in Ambulant Boys with Duchenne Muscular Dystrophy: 36-Month Changes. **PloS One**, California, v. 9, n. 10, e108205, 2014.

PASTORE, A. Et al. Simultaneous determination of ubiquinol and ubiquinone in skeletal muscle of pediatric patients. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 342, p. 352 - 355, 2005.

PASTORE, A. et al. Pediatric reference intervals for muscle coenzyme Q10. **Biomarkers**, v. 17, n. 8, p. 764 - 766, 2012.

PEPE, S. et al. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. **Mitochondrion**, New York, v. 7, Suppl, p. S154 – S167, 2007.

PETRILLO, S. et al. Oxidative stress in Duchenne muscular dystrophy: focus on the NRF2 redox pathway. **Human Molecular Genetics**, London, v. 26, n. 14, p. 2781 - 2790, 2017.

PETROF, B. J. et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, p. 3710 - 3714, 1993.

PRIOR, T. W. Mutation detection. In: CHAMBERLAIN, J. S.; RANDO, T. A. **Duchenne Muscular Dystrophy: advances in therapeutics**. New York: Taylor & Francis, 2006. cap. 5, p. 91 - 104.

QUINZII, C. M.; HIRANO, M. Primary and secundar CoQ₁₀ deficiencies in humans. **BioFactors**, New Jersey, v. 37, n. 5, p. 361 - 365, 2011.

RANDO, T. A. Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, Philadelphia, v. 81 (Suppl), p. S175 - S186, 2002.

REINING, A. M.; MIRZAEI, S.; BERLAU, D. J. Advances in the treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: New and Emerging Pharmacotherapies. **Pharmacotherapy**, New Jersey, v. 37, n. 4, p. 492 - 499, 2017.

ROBERTS, R. G. et al. Exon structure of the human dystrophin gene. **Genomics**, New York, v. 16, p. 536 - 538, 1993.

SALEHI, F. et al. Effectiveness of Coenzyme Q10 on echocardiographic parameters of patients with Duchenne muscular dystrophy. **Electronic Physician**, Kuala Lumpur, v. 9, n. 3, p. 3896 - 3904, 2017.

SCHOLTE, H. R. et al. Muscle mitochondria from patients with Duchenne muscular dystrophy have a normal beta oxidation, but an impaired oxidative phosphorylation. **Neurology**, Minneapolis, v. 35, n. 9, p. 1396 - 1397, 1985.

SCOTT, O. M. et al. Quantitation of muscle function in children: a prospective study in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, New York, v. 5, p. 291 - 301, 1982.

SCOTT, E.; MAWSON, S. J. Measurement in Duchenne muscular dystrophy: considerations in the development of a neuromuscular assessment tool. **Developmental Medicine & Child Neurology**, London, v. 48, p. 540 - 544, 2006.

SHARMA, U. et al. Skeletal muscle metabolism in Duchenne muscular dystrophy (DMD): an in-vitro proton NMR spectroscopy study. **Magnetic Resonance Imaging**, New York, v. 21, n. 2, p. 145 - 153, 2003.

SHIN, J. et al. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, New York, v. 45, p. 2266 - 2279, 2013.

SHULTS, C. W. et al. Coenzyme Q10 Levels Correlate with the Activities of Complexes I and II/III in Mitochondria from Parkinsonian and Nonparkinsonian Subjects. **Annals of Neurology**, New Jersey, v. 42, p. 261 - 264, 1997.

SPERL, W. et al. High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 174, p. 71 - 78, 1997.

SPURNEY, C. F. Cardiomyopathy of Duchenne Muscular Dystrophy: current understanding and future directions. **Muscle & Nerve**, New York, v. 44, p. 8 - 19, 2011.

SPURNEY, C. et al. CINRG Duchenne Natural History Study demonstrates insufficient diagnosis and treatment of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, New York, v. 50, n. 3, p. 250 - 256, 2014.

STARK, A. E. Determinants of the incidence of Duchenne muscular dystrophy. **Annals Translational Medicine**, Hong Kong, v. 3, n. 19, p. 287, 2015.

STEFELY, J. A.; PAGLIARINI, D. J. Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, New York, v. 42, n. 10, p. 824 - 843, 2017.

STEFFENSEN, B. et al. Validity of the EK scale: a functional assessment of non-ambulatory individuals with Duchenne muscular dystrophy or spinal muscular atrophy. **Physiotherapy Research International**, New Jersey, v. 6, p. 119 - 134, 2001.

SWAIMAN, K. F.; SMITH, S. A. Progressive muscular dystrophies. In: **Pediatric neurology**: principles and practice. St Louis: Mosby, 1989. cap. 71, p. 1139 - 1162.

TERRILL, J. R. et al. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. **The FEBS Journal**, London, v. 280, p. 4149 – 4164, 2013.

VALLEJO-ILLARRAMENDI A. et al. Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 16, p. 1 – 23, 2014.

VIGNOS Jr, P. J.; ARCHIBALD, K. C. Maintenance of ambulation in childhood muscular dystrophy. **Journal of Chronic Disease**, St. Louis, v. 12, p. 273 - 290, 1960.

VIGNOS Jr, P. J.; SPENCER Jr, G. E.; ARCHIBALD, K.C. Management of Progressive Muscular Dystrophy of Childhood. **JAMA**, Chicago, v. 184, p. 89 - 96, 1963.

VILLANOVA, M.; KAZIBWE, S. New survival target for Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, Philadelphia, v. 96, n. 2, p. e28 - e30, 2017.

WAGNER, M. B. et al. Assessment of hand function in Duchenne Muscular Dystrophy. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Reston, v. 74, n. 8, p. 801 - 804, 1993.

ZEVIANI, M.; DI DONATO, S. Mitochondrial disorders. **Brain**, Oxford, v. 127, p. 2153 - 2172, 2004.

YAMAMOTO, M. et al. Focal cytochrome c oxidase deficiency in various neuromuscular diseases. **Journal of Neurological Science**, New York, v. 91, n. 1-2, p. 207 - 213, 1989.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 18 de julho de 2012

Ofício nº 2581/2012
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 14604/2011

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA CAPACIDADE FUNCIONAL E DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL MUSCULAR NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 349ª Reunião Ordinária realizada em 16/07/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 3.0 modificado em 01/06/2012.**

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

PROF^a DR^a CLÁUDIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA
FLÁVIA OLIVEIRA TOLEDO/ LARISSA DE OLIVEIRA OKAMA
Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

ANEXO B – Escala de Avaliação para Deambulantes *North Star*, versão traduzida para o português e adaptada por Okama et al. (2018)

Escala de Avaliação para Deambulantes *North Star*

Nós tentamos dar explicações claras sobre os métodos empregados para alcançar os objetivos motores, mas isto não é possível sem ser exaustivo nas descrições, principalmente nas modificações das atividades. As crianças com DMD podem geralmente apresentar adaptações às atividades devido à fraqueza muscular progressiva, elas podem modificar suas atividades para atingir os objetivos funcionais de maneiras ligeiramente diferentes. Geralmente as atividades são graduadas da seguinte maneira:

2 – “Normal” – sem modificação óbvia na atividade

1 – Método modificado, mas alcança o objetivo independentemente de assistência física ou de outros

0 – Incapaz de alcançar independentemente

Manobra de Gowers:

Figura: Manobra de Gowers (W.R. Gowers, Paralisa muscular pseudohipertrófica, 1879)

Definição de manobra de Gowers:

A criança vira-se para o chão (geralmente ajoelhado de quatro apoios) para colocar as mãos no chão para ajudar a se levantar, traz as mãos em direção a si e depois usa os braços para “escalar” as pernas e ficar em pé. Uma ampla base de suporte é frequentemente assumida durante as fases de levantar do chão.

Subir o degrau

Como não é possível garantir a padronização ou a disponibilidade de degraus de uma escada, nós sugerimos que o *box step* (aproximadamente 15 cm de altura) seja utilizado para avaliar a atividade isolada de subir e descer o *box step*. Um apoio de altura ajustável ou outro objeto imóvel pode ser disponibilizado para fornecer suporte.

A seguir há duas páginas com o teste detalhado e instruções para os pacientes e a descrição da forma de pontuar. Eles devem ser usados em conjunto. Por favor, primeiro familiarize-se com a escala para depois avaliar o seu paciente.

A Escala de Avaliação para Deambulantes *North Star* foi desenvolvida pelo Grupo de Avaliação da Rede Clínica *North Star* e fisioterapeutas.

O Projeto *North Star* é apoiado pela Campanha de Distrofia Muscular.

Para mais informações entre em contato com Elaine Scott, coordenadora do Projeto *North Star*
elaines@muscular-dystrophy.org

Escala de Avaliação para Deambulantes North Star

Teste detalhado e instruções ao paciente

Atividades	Instruções ao paciente	Posição de início/ teste detalhado	Comentários
1. Ficar em pé	Você pode ficar em pé o mais ereto (alinhado) possível pelo maior tempo que você conseguir?	Os pés devem estar juntos e os calcanhares apoiados no chão, se possível. Braço ao lado do corpo. Não usar sapatos.	Melhor realizar o teste no chão, do que sobre um tapete ou similar. Manter a coerência nas demais sessões. Para pontuar 2, permanecer no mínimo 3 segundos.
2. Caminhar	Você consegue caminhar de A até B? (especificar os pontos de partida e chegada)	Caminhar sem sapatos ou meias. A distância deve ser suficiente para observar a "marcha normal" do indivíduo.	A atribuição da pontuação necessita considerar - se o paciente geralmente caminha na ponta dos pés, mas ocasionalmente toca os calcanhares no chão, ou consegue quando solicitado, mas não o faz naturalmente, pontuar 1.
3. Levantar da cadeira	Você consegue levantar da cadeira mantendo seus braços cruzados?	Posição inicial de 90° de quadril e joelhos, pés no chão ou sobre um suporte.	Deve ser utilizada uma cadeira com tamanho apropriado ou suporte de altura ajustável. Os braços devem permanecer cruzados ao longo da atividade para pontuar 2.
4. Ficar em pé sobre uma perna - direita	Você pode ficar em pé sobre a sua perna direita o maior tempo que conseguir?	Para pontuar 2, permanecer no mínimo 3 segundos. Não usar sapatos.	Melhor realizar o teste no chão, do que sobre um tapete ou similar. Manter a coerência nas demais sessões.
5. Ficar em pé sobre uma perna - esquerda	Você pode ficar em pé sobre a sua perna esquerda o maior tempo que conseguir?	Para pontuar 2, permanecer no mínimo 3 segundos. Não usar sapatos.	Melhor realizar o teste no chão, do que sobre um tapete ou similar. Manter a coerência nas demais sessões.
6. Subir o box step - direita	Você consegue subir esse box step usando primeiro sua perna direita?	Em pé, em frente ao box step. Box step com aproximadamente 15 cm de altura.	Pode ser fornecido um suporte de altura ajustável, ou caso não esteja disponível, um apoio neutro na mão do terapeuta.
7. Subir o box step - esquerda	Você consegue subir esse box step usando primeiro sua perna esquerda?	Em pé, em frente ao box step. Box step com aproximadamente 15 cm de altura.	Pode ser fornecido um suporte de altura ajustável, ou caso não esteja disponível, um apoio neutro na mão do terapeuta.
8. Descer do box step - direita	Você consegue descer esse box step usando primeiro sua perna direita?	Em pé, no topo do box step. Box step com aproximadamente 15 cm de altura.	Pode ser fornecido um suporte de altura ajustável, ou caso não esteja disponível, um apoio neutro na mão do terapeuta.
9. Descer do box step - esquerda	Você consegue descer esse box step usando primeiro sua perna esquerda?	Em pé, no topo do box step. Box step com aproximadamente 15 cm de altura.	Pode ser fornecido um suporte de altura ajustável, ou caso não esteja disponível, um apoio neutro na mão do terapeuta.
10. Passar para sentado	Você consegue passar da posição deitada para sentada?	Iniciar na posição supina sobre um tapete ou similar. Não usar travesseiro sob a cabeça.	Se o paciente virar para prono ou em direção ao chão para sentar-se, pontuar 1.
11. Levantar-se do chão	Levante-se do chão usando o menor apoio possível e o mais rápido que conseguir. (a partir de supino)	Iniciar na posição supina com os braços ao lado do corpo e as pernas estendidas. Não usar travesseiro sob a cabeça.	Primeiramente tenta-se realizar a atividade sem o uso de apoio de móveis. Não anotar o tempo se for utilizado uma cadeira.
12. Levantar a cabeça	Levante a sua cabeça para olhar os dedos dos seus pés mantendo os braços cruzados.	Iniciar na posição supina sobre um tapete ou similar. Não usar travesseiro sob a cabeça.	Peça ao paciente que mantenha os braços cruzados sobre o tórax para evitar auto-assistência. Também peça para olhar os dedos do pé para garantir a flexão cervical - deve ser uma manobra de colocar o queixo no tórax.
13. Ficar em pé sobre os calcanhares	Você consegue ficar em pé sobre os seus calcanhares?	Em pé no chão. Não usar sapatos.	Atente para inversão. Se a inversão for evidente, mas o antepé ainda levanta do chão - pontuar 1. Se for apenas inversão com a borda lateral e o pé permanecer sobre o chão, pontuar 0.
14. Pular	Quão alto você pode pular?	Em pé no chão, pés relativamente próximos.	Considere a altura e não o movimento para frente. Um pequeno movimento para frente é aceitável.
15. Pular com a perna direita	Você consegue pular com a sua perna direita?	Posição inicial em pé, no chão sobre a perna direita. Não usar sapatos.	Precisa sair completamente do chão para pontuar 2.
16. Pular com a perna esquerda	Você consegue pular com a sua perna esquerda?	Posição inicial em pé, no chão sobre a perna esquerda. Não usar sapatos.	Precisa sair completamente do chão para pontuar 2.
17. Correr (10m)	Corra o mais rápido que puder.... (indicar o local)	Uma pista de 10 metros em linha reta deve ser claramente marcada em uma área tranquila. Um cronômetro deve ser utilizado para marcar o tempo. Seja coerente quanto ao fato de utilizarem sapatos ou não. Garanta a segurança do paciente. Eles devem escolher sua velocidade depois de serem orientados a ir "o mais rápido que puder".	"Trote típico do Duchenne" - não uma corrida verdadeira (provavelmente há uma fase de duplo apoio), mas é mais do que uma caminhada. Tipicamente caracterizada pelo uso excessivo dos braços, rotação de tronco, "gingado" substancial. Não há uma "impulsão verdadeira".

Pontuação

Atividades	2	1	0	Comentários
1. Ficar em pé	Fica em pé, ereto, imóvel e simétrico, sem compensação (com calcanhar no chão e pernas em posição neutra) durante o mínimo de 3 segundos.	Fica em pé, imóvel, mas com algum grau de compensação (exemplo: sobre os artelhos ou com as pernas abduzidas ou acentuada lordose lombar) durante o mínimo de 3 segundos.	Não consegue ficar em pé imóvel ou de forma independente, necessita de apoio (mesmo que mínimo).	
2. Caminhar	Caminha com o padrão de marcha calcanhar-artelhos ou com o pé aplainado.	Persistente ou habitual caminhar sobre os artelhos. Incapaz de realizar o padrão calcanhar-artelhos consistentemente.	Perda da deambulação independente - pode usar KAFOs ou caminha por curtas distâncias com assistência.	
3. Levantar da cadeira	Mantém os braços cruzados. Posição inicial de 90° de quadril e joelhos, pés no chão/apoiados sobre um <i>box step</i> .	Levanta com apoio na coxa ou na cadeira ou vira para prono.	Incapaz	
4. Ficar em pé sobre uma perna - direita	Capaz de ficar em pé de forma relaxada (sem fixação) durante o mínimo de 3 segundos.	Fica em pé momentaneamente ou necessita de muita fixação, exemplo: joelhos aduzidos firmemente ou outras artimanhas.	Incapaz	
5. Ficar em pé sobre uma perna - esquerda	Capaz de permanecer em pé de forma relaxada (sem fixação) durante o mínimo de 3 segundos.	Fica em pé momentaneamente ou necessita de muita fixação, exemplo: joelhos firmemente aduzidos ou outras artimanhas.	Incapaz	
6. Subir o <i>box step</i> - direita	De frente para <i>box step</i> - não necessita de apoio.	Sobe de lado ou necessita de apoio.	Incapaz	
7. Subir o <i>box step</i> - esquerda	De frente para <i>box step</i> - não necessita de apoio.	Sobe de lado ou necessita de apoio.	Incapaz	
8. Descer do <i>box step</i> - direita	Desce de frente, controlando a descarga de peso na perna de apoio. Não necessita de apoio.	Desce de lado, salta para baixo ou necessita de apoio.	Incapaz	
9. Descer do <i>box step</i> - esquerda	Desce de frente, controlando a descarga de peso na perna de apoio. Não necessita de apoio.	Desce de lado, salta para baixo ou necessita de apoio.	Incapaz	
10. Passar para sentado	Iniciar em supino - pode usar uma mão para ajudar.	Auto-assistência, exemplo: puxa-se pelas pernas ou usa as mãos na cabeça ou cabeça fletida em direção ao chão.	Incapaz	
11. Levantar-se do chão	Iniciar em supino. Sem evidência da manobra de Gowers*.	Manobra de Gowers evidente.	(a) Necessita de um objeto de apoio externo, exemplo: cadeira ou (b) incapaz	Tempo (00.0s).....
12. Levantar a cabeça	Em supino, a cabeça deve ser levantada na linha média. O queixo se move em direção ao tórax.	Cabeça é levantada com uma flexão lateral ou sem flexão do pescoço.	Incapaz	
13. Ficar em pé sobre os calcanhares	Fica em pé somente sobre os calcanhares com ambos os pés ao mesmo tempo (aceitável dar alguns passos para manter o equilíbrio) durante o mínimo de 3 segundos.	Flexiona o quadril e somente levanta o antepé.	Incapaz	
14. Pular	Ambos os pés saem do chão simultaneamente.	Um pé após o outro (salta).	Incapaz	
15. Pular com a perna direita	Retira o antepé e o calcanhar do chão.	Capaz de dobrar o joelho e levantar o calcanhar, sem sair do chão.	Incapaz	
16. Pular com a perna esquerda	Retira o antepé e o calcanhar do chão.	Capaz de dobrar o joelho e levantar o calcanhar, sem sair do chão.	Incapaz	
17. Correr (10m)	Ambos os pés saem do chão (sem fase de duplo apoio durante a corrida)	"Trote típico do Duchenne".	Caminha	Tempo (00.0s).....
				TOTAL= /34

*Ver definição página 1

Página 3 de 3

ANEXO C – Medida da Função Motora (MFM), versão traduzida para o português e adaptada por Iwabe, Miranda-Pfeilsticker e Nucci (2008)

Item	Dimensao	Posição inicial	Exercicios
1	D2	Supino	Mantenha a cabeça no eixo e faça a rotação completa para cada um dos lados
2	D2		Levante a cabeça e a mantenha elevada
3	D2		Flexione o quadril e o joelho além de 90°, deslocando o pé do tapete
4	D3		Perna sustentada pelo examinador: realize a flexão dorsal do pé em 90° em relação à perna
5	D2		Eleve uma das mãos do tapete e toque o ombro oposto
6	D1		Membros inferiores semi-fletidos, patelas para cima, pés apoiados sobre o tapete. Eleve a pelve, coluna lombar, bacia e coxas, mantendo-as alinhadas e com os pés próximos
7	D2		Passe para decúbito ventral e libere os membros superiores debaixo do corpo
8	D1		Sente-se sobre o tapete, sem apoio dos membros superiores
9	D2	Sentado na maca	Sem apoio dos membros superiores, mantenha a posição sentada e coloque as mãos em contato entre si
10	D2		Bola de tênis em frente ao sujeito, sem apoio dos membros superiores. Incline-se para frente, toque a bola e depois volte à posição ereta
11	D1		Fique em pé, sem apoio dos membros superiores
12	D1	Em pé	Sem apoio dos membros superiores, sente-se na cadeira, mantendo os pés ligeiramente afastados
13	D2	Sentado na cadeira	Sem apoio dos membros superiores e sem apoio do encosto da cadeira, mantenha a posição sentada, com a cabeça e o tronco alinhados
14	D2	Sentado na cadeira	Com a cabeça posicionada em flexão: levante a cabeça e a mantenha elevada. O movimento e a manutenção devem ser feitos com a cabeça no eixo
15	D2		Antebraços apoiados sobre a mesa e cotovelos para fora: coloque ao mesmo tempo as duas mãos sobre a cabeça, com a cabeça e o tronco alinhados
16	D2		Lápis sobre a mesa: toque o lápis com uma das mãos, com o cotovelo em extensão completa no final do movimento
17	D3		Dez moedas sobre a mesa: pegue sucessivamente e armazene dez moedas de dez centavos em uma das mãos, no tempo de 20 segundos
18	D3		Dedo colocado no centro de um CD-Rom fixo: realize a volta completa do CD-Rom com o dedo, sem apoio da mão
19	D3		Lápis sobre a mesa: pegue o lápis com uma das mãos; desenhe uma série contínua de voltas de 1cm de altura, dentro de um retângulo de 4cm de comprimento
20	D3		Folha de papel entre as mãos: rasgue a folha dobrada em quatro começando pela dobra
21	D3		Bola de tênis sobre a mesa: pegue a bola e depois vire a mão completamente para cima segurando a bola
22	D3		Dedo no centro de um quadrado fixo: levante o dedo e depois o coloque sucessivamente no centro das oito casas do quadrado, sem tocar as linhas
23	D2		Membros superiores ao lado do corpo: ao mesmo tempo coloque os dois antebraços e/ou as mãos sobre a mesa
24	D1	Sentado na cadeira	Levante-se, sem apoio dos membros superiores, com os pés próximos
25	D1	Em pé; apoio dos membros superiores	Solte-se e mantenha-se em pé, com os pés próximos; cabeça, tronco e membros alinhados
26	D1		Sem apoio dos membros superiores, levante um pé, por dez segundos
27	D1	Em pé	Sem apoio, incline-se, toque o solo com uma das mãos e depois se levante
28	D1	Em pé sem apoio	Ande dez passos à frente, sobre ambos os calcanhares
29	D1		Ande dez passos à frente, sobre uma linha reta
30	D1		Corra dez metros
31	D1		Salte no mesmo lugar, com um pé, dez vezes seguidas
32	D1		Sem apoio dos membros superiores, agache-se e levante-se duas vezes em seguida

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (pacientes)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Depto de Neurociências e Ciências do Comportamento FMRP-USP.
Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto-SP. CEP-14048-900
Tel. (16)-3602 2548

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA CAPACIDADE FUNCIONAL E DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL MUSCULAR NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Pesquisadoras responsáveis: Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, Flávia Oliveira Toledo, Larissa de Oliveira Okama.

Estamos realizando um projeto de pesquisa sobre a distrofia muscular de Duchenne, que é uma doença que causa fraqueza muscular e dificuldade para atividade física, ou seja, incapacidade física. Medir a incapacidade física ao longo do tempo é importante para acompanhar a evolução da doença e compreender os efeitos dos tratamentos realizados. Como existem várias formas de medir a incapacidade física causada por essa doença, achamos importante verificar qual a melhor forma de fazer essa medida.

Na distrofia muscular de Duchenne, a fraqueza e a incapacidade física acontecem porque falta no músculo a proteína distrofina, o que provoca muitas alterações. Conhecer melhor essas alterações pode trazer benefícios que no futuro poderão ajudar no tratamento da doença.

Assim, os objetivos desta pesquisa são:

- padronizar e estabelecer qual é o melhor teste cronometrado e a melhor escala para medir a incapacidade física nessa doença;
- medir a incapacidade física causada pela doença de tempos em tempos ao longo de 4 anos;

- conhecer melhor as alterações que ocorrem no músculo estudando, na biópsia muscular, uma pequena estrutura, chamada mitocôndria, que é muito importante para a produção de energia e o funcionamento do músculo.

Convidamos você a fazer parte desta pesquisa, sua contribuição será no sentido de permitir que seja utilizada parte de sua biópsia muscular colhida durante a investigação da sua doença para estudar os efeitos da doença no seu músculo. Não será necessária coleta de nova biópsia.

Não há risco nesta pesquisa. A sua participação neste estudo é voluntária. Não haverá qualquer tipo de remuneração e nem custo financeiro para você e sua família em nenhuma etapa desta pesquisa. Manteremos seu nome em sigilo, assim como outras informações que possam identificá-lo.

A qualquer momento você poderá desistir de participar do estudo. Você também poderá entrar em contato com um dos pesquisadores para obter informações sobre esta pesquisa.

Você poderá ser seguido no nosso serviço, ou, caso deseje ser acompanhado por outros profissionais, nós nos responsabilizamos por passar quaisquer informações desejadas para seus médicos.

Caso concorde em participar, solicitamos que assine o termo abaixo:

Declaro que concordo com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar deste estudo.

Termo de Consentimento

Eu, _____, RG _____,
 _____(grau de parentesco com o paciente), aceito espontaneamente que meu familiar
 _____participe deste trabalho, podendo desistir a
 qualquer momento, se assim achar conveniente.

 Assinatura do(a) responsável

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

 Flávia Oliveira Toledo, Larissa de Oliveira Okama, Prof. Dra. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira
 Pesquisadoras responsáveis

Telefone para contato: 016-82010193 – Flávia/ 016-96014550 – Larissa

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido (controles)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Depto de Neurociências e Ciências do Comportamento FMRP-USP.
Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto-SP. CEP-14048-900
Tel. (16)-3602 2548

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA CAPACIDADE FUNCIONAL E DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL MUSCULAR NOS PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Pesquisadoras responsáveis: Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, Flávia Oliveira Toledo, Larissa de Oliveira Okama.

Estamos realizando um projeto de pesquisa sobre a distrofia muscular de Duchenne, que é uma doença que causa fraqueza muscular e dificuldade para atividade física, ou seja, incapacidade física. Medir a incapacidade física ao longo do tempo é importante para acompanhar a evolução da doença e compreender os efeitos dos tratamentos realizados. Como existem várias formas de medir a incapacidade física causada por essa doença, achamos importante verificar qual a melhor forma de fazer essa medida.

Na distrofia muscular de Duchenne, a fraqueza e a incapacidade física acontecem porque falta no músculo a proteína distrofina, o que provoca muitas alterações. Conhecer melhor essas alterações pode trazer benefícios que no futuro poderão ajudar no tratamento da doença.

Assim, os objetivos desta pesquisa são:

- padronizar e estabelecer qual é o melhor teste cronometrado e a melhor escala para medir a incapacidade física nessa doença;
- medir a incapacidade física causada pela doença de tempos em tempos ao longo de 4 anos;
- conhecer melhor as alterações que ocorrem no músculo estudando, na biópsia muscular, uma pequena estrutura, chamada mitocôndria, que é muito importante para a produção de energia e o funcionamento do músculo.

Convidamos você a fazer parte desta pesquisa, sua contribuição será no sentido de permitir que seja utilizada parte de sua biópsia muscular, sendo integrante de um grupo controle para a determinação dos valores normais. Necessitaremos utilizar parte da biópsia de músculo colhida durante a investigação da sua doença para comparação com o grupo com distrofia muscular de Duchenne. Não será necessária coleta de nova biópsia.

Não há risco nesta pesquisa. A sua participação neste estudo é voluntária. Não haverá qualquer tipo de remuneração e nem custo financeiro para você e sua família em nenhuma etapa desta pesquisa. Manteremos seu nome em sigilo, assim como outras informações que possam identificá-lo.

A qualquer momento você poderá desistir de participar do estudo. Você também poderá entrar em contato com um dos pesquisadores para obter informações sobre esta pesquisa.

Você poderá ser seguido no nosso serviço, ou, caso desejem ser acompanhado por outros profissionais, nós nos responsabilizamos por passar quaisquer informações desejadas para seus médicos.

Caso concorde em participar, solicitamos que assine o termo abaixo:

Declaro que concordo com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar deste estudo.

Termo de Consentimento

Eu, _____, RG _____,
_____(grau de parentesco com o paciente), aceito espontaneamente que meu familiar
_____participe deste trabalho, podendo desistir a
qualquer momento, se assim achar conveniente.

Assinatura do(a) responsável

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Flávia Oliveira Toledo, Larissa de Oliveira Okama, Prof. Dra. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira
Pesquisadoras responsáveis

Telefone para contato: 016-82010193 – Flávia/ 016-96014550 – Larissa

APÊNDICE - C Manuscrito a ser submetido à publicação na revista Human Molecular Genetics – etapa retrospectiva.

Title: Coenzyme Q₁₀ deficiency in skeletal muscle from patients with Duchenne muscular dystrophy.

Authors: Larissa de Oliveira Okama^a; Silvia Helena Andrião Escarso^a; Daniel Augusto Carvalho Maranhão^b; José Batista Volpon^b; Michio Hirano^c; Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira^a

^a Department of Neurosciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

^b Department of Biomechanics, Medicine and Rehabilitation of the Locomotor Apparatus, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

^c Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, USA.

Correspondence to: Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, MD, PhD, Department of Neurosciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 14049-900. Tel.: 5516 3602 2436. E-mail: csobreira@fmrp.usp.br.

Title: Coenzyme Q10 deficiency in skeletal muscle from patients with Duchenne muscular dystrophy.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X linked disorder characterized by progressive degeneration of skeletal muscles. The main cause is the lack of the structural protein dystrophin. However, intracellular calcium dysregulation, proteolysis and metabolic alterations, specially of the mitochondria, may be present. Susceptibility to oxidative stress/response to CoQ10 and idebenone improve mitochondrial oxidative metabolism. Therefore justifying further analyses of mitochondrial energy metabolism in muscle biopsies from patients with DMD. The objective of this study was to evaluate the CoQ10 content and respiratory chain activity in fragments of muscle biopsy of patients with DMD. 22 muscular biopsies from patients with DMD were analyzed, and ten control patients. The concentration of CoQ10 was performed using the reverse phase high performance liquid chromatography technique. The activities of the respiratory chain enzymes were measured by spectrophotometric techniques. The mean age of patients with DMD was 6.9 years ($SD \pm 2.4$) and controls were 8 years ($SD \pm 2.69$). The mean CoQ10 dosage in DMD patient fragments was $8.6 \mu\text{g} / \text{g tissue}$ ($DP \pm 3.9$) and $31.6 \mu\text{g} / \text{g tissue}$ ($DP \pm 6.9$) in the controls. The mean area occupied by muscle fibers in patients with DMD was 27.3% ($SD \pm 14.2\%$) and in controls it was 89.2% ($SD \pm 3.3\%$). There was a high correlation between the amount of CoQ10 and the relative area occupied by muscle fibers ($r= 0.767$ and $p= 0.016$). The activities of the enzymatic complexes of the respiratory chain of patients with DMD have not demonstrated a deficiency. On the other hand, the results of the joint II + III complex tests are significantly reduced in patients with DMD.. In the present study, we conclude that there is a secondary deficiency of CoQ10 in patients with DMD.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, mitochondria, coenzyme Q10, respiratory chain, functional capacity.

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a hereditary, X-linked recessive, degenerative and progressive muscular disorder, characterized by lack of the structural protein dystrophin due to mutations in the *DMD* gene (HOFFMAN, 1987; BONILLA, 1988).

Despite the great advances achieved towards the genetic therapy of DMD, the current available therapies are still far from resolving the complex process of muscle fiber degeneration. Understanding the different aspects of the pathogenesis of the disease is essential to delineate adequate treatments, which will possibly include therapies directed to different points in the cascade of events that leads to or results from muscle degeneration, such as calcium influx, inflammation, fibrosis, defective autophagy, and apoptosis (SHIN et al., 2013). Metabolic abnormalities have also been demonstrated. Oxidative phosphorylation (OXPHOS) dysfunction was identified in DMD animal models (KUZNETSOV, 1998; EVEN, 1994) as well as in muscle from patients (YAMAMOTO, 1989; JONGPIPUTVANICH, 2005; SPERL, 1997). Furthermore, it was demonstrated that the oxidative stress plays an important role on muscle wasting in the disease (PETRILLO et al., 2017; TERRIL et al., 2013). For many decades antioxidant therapies have been investigated on clinical trials. Trials with coenzyme Q10 (CoQ₁₀) were performed in groups of patients with various neuromuscular diseases and in patients with DMD (FOLKERS et al., 1985; FOLKERS & SIMONSEN, 1995; SPURNEY et al., 2011; SAALEHI et al., 2017). An open label pilot study using CoQ₁₀ in steroid treated DMD suggests that the association of this drugs increased muscle strength (SPURNEY et al., 2011). Regarding the cardiac effects of this therapy, a randomized, double-blinded, placebo controlled study failed to demonstrate effectiveness of CoQ₁₀ on echocardiographic parameters in patients with DMD (SAALEHI et al., 2017). The CoQ₁₀ analog idebenone was also investigated in clinical trials in DMD (BUYSE et al, 2015; BUYSE et al., 2017; MCDONALD et al., 2016; BUYSE et al., 2011; BUYSE et al., 2013). In the phase 3 randomized controlled DELOS trial in patients with DMD, idebenone preserved inspiratory muscle function reducing the loss of peak expiratory flow and forced vital capacity compared to placebo (BUYSE et al, 2015).

Despite these promising results of CoQ₁₀ and idebenone, the effects of this coenzymes on the DMD were not clinically relevant, which may be due to several factors, including the stage of the disease, the presence of irreversible changes and, eventually, absence relation between CoQ₁₀ and the pathophysiology of DMD. Therefore, it is essential to characterize the involvement of CoQ₁₀ in the pathophysiological process that develops in the skeletal muscle of patients with DMD, so that new therapeutics studies with CoQ₁₀ or idebenone can be better delineated.

In the present study, we measured CoQ₁₀ in skeletal muscle from patients with DMD in relation to the proportion of muscle fiber loss in the biopsies and the activities of the respiratory chain enzymes.

2. Subjects and methods

2.1 Subjects

Twenty two boys with DMD, following at the Neuromuscular Disease Outpatient Clinic of our university hospital, were enrolled in the study. Because molecular studies of the *DMD* gene were restricted to the analysis of a few exons at the time of their first evaluation, the diagnosis was established based on the absence of dystrophin expression in muscle biopsy. In the subsequent years, a comprehensive genetic analysis was performed and determined the molecular defect in 16 patients (Table 1; Figure 1).

Table 1. Genetic mutations patients with DMD.

Genetic mutations	N (%)
Deletion of one or more exons	10 (45.4%)
Deletion of one nucleotide	1 (4.5%)
Duplication	1 (4.5%)
Deletion + duplication	1 (4.5%)
Point mutation	2 (9.1%)
Intronic mutation	1 (4.5%)
Not available	5 (22.7%)
Mutation absence*	1 (4.5%)

*no mutation was detect after exon analysis

Figure 1. Diagram to illustrate the distribution and extent of deletions and duplication in DMD gene in our patients.

Ten boys of our outpatient clinic, who were investigated for a neuromuscular disease and presented a normal or minimally abnormal muscle biopsy, composed the control group.

The study was approved by the Ethics Committee of our institution. All participants and/or their parents gave written informed consent.

2.2 Methods

Muscle biopsy

All biopsies were collected from the quadriceps muscle during the routine diagnostic investigation, frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored in liquid nitrogen. For the present study, a longitudinal muscle biopsy fragment from each patient was sectioned transversely into two consecutive parts, so that they contained roughly the same representation of muscle fibers, for morphometry and dosing of CoQ₁₀. Other third fragment was used for enzymatic assays of the respiratory chain.

Morphometric analysis

Morphometric analyses were performed in cryostat transversal sections of muscle biopsy fragments stained with hematoxylin and eosin. Using the Image-J software (a public domain Java image processing program created by NIH Image), we traced each individual muscle fibers to obtain the area of the fragment correspondent to muscle fibers. We subsequently surrounded the boundaries of the fragment to obtain the total cross-sectional area. We calculated the representation of muscle fibers in the biopsy by dividing the area occupied by muscle fibers/total area of the fragment.

CoQ₁₀ measurement in muscle biopsies

CoQ₁₀ from muscle tissue was extracted in an organic solvent, separated on a reversed-phase column, and measured with electrochemical detection technique. Approximately 45 mg of frozen fragments of muscle biopsy specimens were homogenized with 0.25 µg/ml de CoQ₉ and 50 mM sodium dodecyl sulfate. The CoQ₁₀ extraction with 90% of 1-propanol were centrifuged for five minutes at 14000xg (4°C). The supernatant was analyzed for HPLC equipment with electrochemical detection (Thermo Scientific) (Naini et al, 2003).

Respiratory chain enzyme assays

The mitochondrial respiratory chain enzymes and citrate synthase activities were measured spectrophotometrically in whole muscle homogenates at 30 °C. For the homogenate at 10% concentration, the frozen muscle fragment was weighted, transferred to the homogenizing tube and added 50 nM of Tris-HCl and 150 mM of KCl pH 7,5 (Equipament: PowerGen 125 Tissue Homogenizer, Fisher Scientific) (Dimauro 1987; Srere 1969).

Complex II+III was measured by monitoring the oxidation of cytochrome c at 550 nm with 50 mM potassium phosphate, succinate and 0.5 mM KCN. A subsequent measurement was performed after the addition of CoQ₁₀ in enzymatic assay in saturated quantities.

The results were corrected according to the weight of the fragment and expressed in µmoles/min/g tissue. The results were also corrected according to the activity of citrate synthase, an estimated measure of mitochondrial mass.

Statistical analysis

The analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences program, version 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Descriptive statistics for data included frequency distributions, mean, standard deviation and ranges.

The ages, as well as the results of the CoQ₁₀ measurement and the activities of the mitochondrial enzymes obtained in muscle tissue samples from patients with DMD, were compared to the results obtained from control individuals using the non-parametric Mann-Whitney test for two independent samples.

The correlation of the CoQ₁₀ measurement with relative area occupied by muscle fibers was performed by Spearman's correlation coefficient. The correlation criteria adopted were ≤ 0.20, very low; 0.21–0.40, low; 0.41–0.60, moderate; 0.61–0.80, high; 0.81–1.0, very high (AJZEN, 1998).

The significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

The sample population consisted of twenty-two boys in the DMD group and ten boys in the control group. The mean age at muscle biopsy of boys with DMD was 6.9 years (SD 2.4; range 1.9 to 11.8 years) and of control boys was 8 years (SD 2.7; range 4 to 12 years). Statistical analysis indicated that the age at muscle biopsy was similar for patients and controls ($p = 0.294$).

CoQ₁₀ measurement in muscle biopsies

CoQ₁₀ concentrations were analyzed in 22 patients with DMD and ten controls. The mean of results obtained was present in table 2.

Table 2. Muscle CoQ₁₀ measurements in patients with DMD and controls.

CoQ ₁₀ ($\mu\text{g/g}$ tissue)	DMD (n=22)	Controls (n=10)
Mean $\pm$ SD	8.65 $\pm$ 3.95	31.61 $\pm$ 6.9
Range	1.2 – 16.7	20.6 – 39.4

The results showed a significantly decreased of CoQ₁₀ in muscle biopsy of patients with DMD compared to controls ($p < 0.001$). Due to the possibility the deficiency of CoQ₁₀ in the muscular biopsies in patients with DMD resulted from the loss of muscle fibers by the degenerative process, we studied the relation of this deficiency with the degree of muscle fiber loss in these patients. For this proposed, we did the morphometric analysis.

CoQ₁₀ content and its relation to the loss of muscle fibers

Nine quadriceps muscle biopsies were obtained for diagnostic purposes and analyzed morphometrically. The mean of the percentage of fiber area was 27.3% (SD 14.3) range from 5.9 to 51.2 % indicating different levels of disease involvement.

Correlation analysis of the percentage fiber area and the CoQ₁₀ content was high, ($r = 0.767$, $p = 0.016$). This results suggesting that the low concentration of CoQ₁₀ of muscle biopsies the patients with DMD is consequence to the loss of muscle fibers. However, the individualized analysis, presented in table 3, raised the possibility of real deficiency of CoQ₁₀ muscle fibers of patients with DMD, as exemplified in patient 1 presenting a relative muscle fibers area of 51.2% and CoQ₁₀ content of 7.5 μ tissue (Table 3).

Table 3. Values of percentage fiber area and CoQ₁₀ levels of nine patients with DMD.

Patients No	Muscle fiber area (%)	CoQ ₁₀ levels ($\mu\text{g/g}$ tissue)
1	51.2	7.5
2	40.5	16.7
3	35.2	8.8
4	28.1	7.2
5	27.7	10.2
6	24.7	6.8
7	23	1.2
8	9.3	1.6
9	5.9	5.0

In order to determine if the reduction of the CoQ₁₀ content represented coenzyme deficiency in the muscle fibers, or simply reflected the lack of fibers, we proceed with the enzymatic assays of the respiratory chain. In these assays, which can be normalized with respect to the amount of mitochondria in the sample, the presence of CoQ₁₀ is essential for the functioning of complexes II + III, whose activity may therefore reflect coenzyme deficiency.

Respiratory chain enzyme activities

Twenty-two boys with DMD and ten controls were studied. There were significant differences in respiratory chain activities for all patients and controls (Table 4).

Table 4. Values of the respiratory chain complex activities.

Respiratory chain activity	Absolut value		Relation with citrate synthase		
	Patients (n=22)	Controls (n=10)	Patients (n=22)	Controls (n=10)	<i>p</i> *
CI	2.89 ± 1.23	6.28 ± 1.96	0.31 ± 0.08	0.36 ± 0.06	0.166
CII	7.36 ± 3.62	5.19 ± 1.42	0.95 ± 0.61	0.30 ± 0.04	<0.001
CII+III	0.96 ± 0.45	3.49 ± 1.20	0.11 ± 0.03	0.20 ± 0.04	<0.001
CIII	7.10 ± 3.38	7.52 ± 1.88	0.79 ± 0.33	0.44 ± 0.11	0.003
CIV	9.04 ± 3.66	16.95 ± 5.39	1.01 ± 0.33	0.96 ± 0.19	0.730
CS	9.09 ± 3.20	17.36 ± 3.95			

Results showed means ± standard error; *absolute value express in $\mu\text{moles/min/g}$ tissue; **comparison of normalized values for citrate synthase activity; C = complex of mitochondrial respiratory chain; CS = citrate synthase.

The results showed that there is no deficiency of the enzymatic complexes of the respiratory chain. On the other hand, the activities of complex II and complex III are significantly elevated in relation to the controls. For activity of complexes II + III, for which the presence of CoQ₁₀ is essential, is significantly reduced in patients with DMD. This finding confirms the occurrence of CoQ₁₀ deficiency in muscle fibers of patients with DMD. The response of the activity of complexes II + III to the addition of CoQ₁₀ to the enzymatic assay presented in table 5 reinforces the existence of coenzyme deficiency in the skeletal muscle of patients with DMD. In these assay, the addition of CoQ₁₀ resulted in a significant increase in the activity of complexes II + III (recovery percentage), when compared to the increase exhibited by the controls.

Table 5. Values of the respiratory chain complex II+III activities with and without addition of CoQ₁₀.

	Patients (n=22)	Controls (n= 10)	<i>p</i>
CII+III*			
Mean ± SD	0.8 ± 0.5	3.3 ± 1.4	<0.001
Range	0.06 – 2.01	1.71 – 4.8	
CII+III* with CoQ₁₀			
Mean ± SD	5.4 ± 2.0	11.1 ± 2.5	<0.001
Range	1.64 – 9.2	7.24 – 12.93	
% Recuperation			
Mean ± SD	842 ± 506	395 ± 192	0.001
Range	356 - 2733	128 - 845	

C = complex of mitochondrial respiratory chain; *Relation with citrate synthase; SD= standard error mean; % Recuperation= percentagem.

4. Discussion

Previous investigations have suggested mitochondrial dysfunction in DMD (PETRILLO et al., 2017; TERRIL et al., 2013). However, CoQ₁₀ measurement have not been performed in DMD.

The evaluation of respirometry and O₂ consumption in previous studies demonstrated decreased oxidation rates and poor coupling of oxidative phosphorylation in the mitochondria of patients with DMD (SPERL et al., 1997). However, the literature is scarce in what refers to studies that evaluated the activity of the mitochondrial respiratory chain in the skeletal muscle

of patients with DMD and we did not find studies that performed the quantification of CoQ10 in these patients. The identification of a possible deficiency of CoQ10 has important implications for understanding the pathophysiology of DMD, as well as therapeutic responses to this coenzyme, or its synthetic analog idebenone. Understanding the role of CoQ10 in DMD should result in new therapeutic proposals for the disease.

Although a broad assessment of mitochondrial function has not been performed because of the availability of stored muscle tissue, our results demonstrate that CoQ10 in patients with DMD, when compared with controls, suggesting a real deficiency of this coenzyme.

We do not know of any studies that quantified CoQ10 in patients with DMD. On the other hand, Miles et al. (2005), in a group of five patients with muscular dystrophy (2 patients with congenital muscular dystrophy, 2 with muscular dystrophies and 1 with Becker muscular dystrophy), detected CoQ10 deficiency and increased redox ratio, suggesting that this increase would be a compensatory process of antioxidant defense of the organism.

Pastore et al. (2012) evaluated 148 children to determine levels of CoQ10 deficiency in this population: values between 0.82 and 4.88 $\mu\text{mol} / \text{g}$ tissue represent severe deficiency; values between 5.43 and 9.76 $\mu\text{mol} / \text{g}$ tissue indicate intermediate deficiency; values between 10.21 to 19.1 $\mu\text{mol} / \text{g}$ tissue represent mild deficiency. Normal values are between 21.7 to 88.75 $\mu\text{mol} / \text{g}$ tissue.

In order to elucidate if the decrease of CoQ10 resulted from the loss of muscle fibers due to the degenerative process, we saw the need to study the relation of this deficiency with the degree of loss of muscle fibers in these patients.

In the morphometric analysis, several pathological alterations were identified in the muscle biopsy fragments of patients with DMD, but in the present study, the emphasis was given to the relative area occupied by muscle fibers. The correlation of the quantification of CoQ10 in the muscle and the proportion of the area occupied by muscular fibers was high, suggesting that the decrease in the concentration of CoQ10 in the muscular biopsies of patients with DMD is due to the loss of muscular fibers. As the observed deficiency was exuberant and not associated with a proportional reduction in the number of fibers in all patients, it was necessary to proceed with the investigation of CoQ10 impairment in the skeletal muscle of patients with DMD. The study of the activity of the respiratory chain could confirm the alteration, evidencing normal activity of the complexes II and III when measured alone, and reduced the activity of these complexes when measured in sets, because they require the presence of CoQ10 in this situation.

Important aspect of mitochondrial function is the functioning of the respiratory chain, which can be evaluated considering the activity of the enzymatic complexes alone, or through global analysis that results in oxygen consumption. In order to analyze the enzymatic complexes alone, the substrates, cofactors and coenzymes necessary for the activity of that complex are added to the reaction, therefore it evaluates the functioning of the enzymatic complex itself.

In this analysis, the results are corrected according to the protein concentration, the weight of the fragment and the activity of a non-respiratory chain enzyme (usually citrate synthase) to represent the mitochondrial mass. The correction of the activity in relation to the mitochondrial mass is essential to obtain more reliable results, because obviously the situation of lower concentration of mitochondria will result in less enzymatic activity.

It can be observed in our results that mitochondrial mass was lower in patients with DMD than in controls, because the degenerative process results in loss of muscle fibers and therefore the fragment used contains less representativeness of muscle fibers and greater tissue content support. Due to the high energy demand of the muscle fiber, the content of mitochondria in the fiber is higher than that of the connective tissue, so similar weights of the

patients' muscle fragments and controls do not mean similar amounts of the organelle. The same applies to the quantification of proteins.

Unlike Jongpipitvanich et al. (2005), we did not identify deficiency of enzymatic complexes of the respiratory chain when analyzed alone. In the mentioned study, six patients with DMD were analyzed, identifying alterations in complexes III and IV. However, no change in citrate synthase activity was identified and the values presented were not corrected by this enzyme.

The significant difference in the values of the activities of the complexes II and III, when measured alone, between patients and controls, with higher results in the patients, can be justified by the fact that they are not linear reactions. Among the measured activities, precisely those of the complexes II and III are the least linear, evolving as a parabolic curve, reaching plateau even during the measurement time of the reaction. In this condition, the presence of a greater amount of mitochondria results in faster consumption of the substrates at the beginning of the reaction, before the measurement by the spectrophotometer is effectively started.

However, the activity of the II + III complexes, measured together, presents a reaction close to linearity, so the corrected values in relation to the mitochondrial mass are more reliable. For the enzymatic activity of complex II + III complex, the presence of CoQ is essential. Therefore, the situation of normality of the activity of complexes II and III alone and deficiency of the activity of complexes II + III, is inferred coenzyme deficiency. Montero et al., (2008) in their study, reports the decrease in the activity of II + III complexes as the most sensitive biomarker of CoQ deficiency.

The results obtained with the addition of CoQ10 to the enzyme II + III assay showed a proportionally higher increase in patient values when compared to controls, confirming the hypothesis of deficiency in patients. It should be noted that the initial experiments that defined the amount of CoQ10 to be added in the enzymatic assays were performed in patients and controls so that the reaction occurred under CoQ10 saturation conditions for both (unpublished data).

Secondary deficiency could in principle be a factor related to the degenerative process of the cells themselves, and studies with other dystrophies could help elucidate this issue. A degenerative process with frequent cycles of degeneration and regeneration could result in senescence of the cells involved in this process.

Regarding the limitations of the study, the amount of biopsies evaluated could interfere mainly in the correlation analyzes, such as clinical parameters. The range of variability of the ages of the prospective stage was small, this could suggest that the non-correlation of the amount of CoQ10 and percentage of area of muscular fibers, with the ages at the moment of the biopsy and beginning of the symptoms and time of evolution of the disease was interfered by the restricted sample.

It would be important that future studies on the quantification of CoQ10 in skeletal muscle seek to cover individuals with other dystrophies in order to elucidate whether CoQ10 deficiency occurs due to processes more strictly related to dystrophin specifically, or derives from the process of muscular degeneration independent of its cause.

Acknowledgments

Larissa O. Okama, MS, received financial support from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors thank Renato Silva and Thaisa Tognati for their contribution.

References

- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 1987; 51: 919 – 928.
- Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, et al. Duchenne Muscular Dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988; 54: 447 - 52.
- Shin J, et al. Wasting mechanisms in Muscular Dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013; 45(10): 2266 – 2279.
- Kuznetsov AV, Winkler K, Wiedemann FR, et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Mol Cell Biochem*, 1998; 183: 87 - 96
- Yamamoto M, Koga Y, Ohtaki E, Nonaka I. Focal cytochrome c oxidase deficiency in various neuromuscular diseases. *J Neurol Sci* 1989; 91(1-2): 207 – 213.
- Jongpiputvanich S, Sueblinvong T, Norapucsunton T. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in various neuromuscular disease. *J Clin Neurosci* 2005; 12(4): 426 – 428.
- Petrillo S, Pelosi L, Piemonte F, Travaglini L, Forcina L, Catteruccia M, Petrini S, Verardo M, D'Amico A, Musaro A, Bertini E. Oxidative stress in Duchenne muscular dystrophy: focus on the NRF2 redox pathway. *Hum Mol Genet* 2017; 26(14): 2781 – 2790.
- Terrill, J.R., Radley-Crabb, H.G., Iwasaki, T., Lemckert, F.A., Arthur, P.G. and Grounds, M.D. (2013) Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dyferlinopathies. *FEBSJ* 2013; 280: 4149 - 4164.
- Folkers K, Wolaniuk J, Simonsen R, et al. Biochemical rationale an the cardiac response of patients with muscle disease to therapy with coenzyme Q10. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 4513 - 16.
- Folkers K, Simonsen R. Two successful double-blind trials with coenzyme Q10 (vitamin Q10) on muscular dystrophies and neurogenic atrophies. *Biochim Biophys Acta*, 1995; 24:281 - 6.
- Spurney CF, Rocha CT, Henricson E, et al. CINRG pilot trial of coenzyme Q10 in stereroid-treated Duchenne muscukar dystrophy. *Muscle Nerve*, 2011; 44: 174 - 8.
- Salehi F, Zeinaloo A, Riasi HR, et al. Effectiveness of Coenzyme Q10 on echocardiographic parameters of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Electron Physician*, 2017; 9(3): 3896 - 3904.
- Buyse GM, Voit T, Schara U, et al., DELOS Study Group. Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2015 385, 1748 - 1757.
- Buyse GM, Voit T, Schara U, et al., DELOS Study Group. Treatment effect of idebenone on inspiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Pulmonol* 2017; 52(4): 508 - 515.
- McDonald CM, Meier T, Voit T, et al. DELOS Study Group. Idebenone reduces respiratory complications in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 2016; 26: 473 - 480.

- Buyse GM, Goemans N, van den Hauwe M, et al. Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: results from 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Neuromuscul Disord*, 2011; 21: 396 - 405.
- Buyse GM, Goemans N, van den Hauwe M, et al. Effects of Glucocorticoids and Idebenone on Respiratory Function in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatr Pulmonol*, 2013; 48(9): 912 - 920.
- Quinzii CM, López LC, Gilkerson RW, et al. Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ₁₀ deficiency. *FASEB J*, 2010; 24: 3733 - 3743.
- Dimauro S, Servidei S, Zeviani S, et al. Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome. *Annals of Neurology*, 1987; 22: 498 - 506.
- Srere PA. Citrate synthase. *Methods in enzymology*, 1969; 13: 3 - 11.
- Naini A, Lewis VJ, Hirano M, et al. Primary coenzyme Q10 deficiency and the brain. *BioFactors*, 2003; 18: 145 - 152.
- Ajzen I. Understanding attitudes and predicting social behavior. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1998.
- Sperl W, Skladal D, Gnaiger E et al. High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. *Mol Cell Biochem* 1997; 174:71 - 78.
- Miles L, Miles MV, Tang PH, Horn PS, Wong BL, DeGrauw TJ, Morehart PJ, Bove KE. Muscle coenzyme Q: a potencial test for mitochondrial activity and redox status. *Pediatr Neurol* 2005; 32(5): 318 - 324.
- Pastore A, Giovamberardino G, Petrillo S et al. Pediatric reference intervals for muscle coenzyme Q10. *Biomarkers* 2012; 17(8): 764 - 766.
- Montero R, Sánchez-Alcázar JA, Briones P et al. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin Biochem* 2008; 41: 697 - 700.