UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARJORY IRINEU BENÁ

**Avaliação quantitativa da função mitocondrial no músculo esquelético em
pacientes com distrofia muscular de cinturas**

**Ribeirão Preto
2018**

MARJORY IRINEU BENÁ

**Avaliação quantitativa da função mitocondrial no músculo esquelético em
pacientes com distrofia muscular de cinturas**

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

Área de concentração: Neurologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Ferreira da
Rosa Sobreira.

Ribeirão Preto
2018

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).

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 à fonte.

Bená, Marjory Irineu

Avaliação quantitativa da função mitocondrial no músculo esquelético em pacientes com distrofia muscular de cinturas. Ribeirão Preto, 2018.

83 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Sobreira, Cláudia Ferreira da Rosa.

1. Distrofia muscular de cinturas. 2. Mitocôndria. 3. Coenzima Q10. 4. Cadeira respiratória.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bená, M. I. Avaliação quantitativa da função mitocondrial no músculo esquelético em pacientes com distrofia muscular de cinturas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre 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 este trabalho ao meu avô Pedro, meu maior incentivador de sonhos, grande responsável pela minha formação profissional e exemplo de amor pela família. Muito obrigada por sempre acreditar em mim e estimular meu aperfeiçoamento nos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial meu pai e minha mãe, pela maior herança e presente que poderiam me dar: o investimento nos meus estudos. A educação abriu as melhores portas na minha vida e me proporcionou a vivência com profissionais competentes e inspiradores, os quais me motivam sempre a melhorar como pessoa e como estudante.

Às minhas companheiras de ambulatório de fisioterapia e as amigas Lívia e Larissa, pelo apoio, aprendizado, colaboração e companheirismo. Sempre foram muito dispostas em ajudar e são profissionais exemplares pela dedicação, cuidado e amor com os pacientes.

À Dra. Claudia Ferreira da Rosa Sobreira, excelente profissional e professora dedicada. Durante muitos anos vem enriquecendo meus aprendizados com muita paciência e prontidão, além de me apoiar durante os grandes desafios da jornada acadêmica.

A todos da equipe do Laboratório de Neurologia que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos pacientes que fizeram parte desse estudo, pois apesar dos desafios impostos pela doença, sempre foram disponíveis e colaborativos. Espero que esse estudo possa contribuir com a melhora da qualidade de vida destes.

A Deus por permitir que tudo isso seja possível de acontecer, me capacitar, me proteger e estar no comando da minha vida.

Obrigada!

“A morte do homem começa no instante em que ele desiste de aprender”
Albino Teixeira

RESUMO

BENÁ, M. I. **Avaliação quantitativa da função mitocondrial no músculo esquelético em pacientes com distrofia muscular de cinturas.** 2018. 83 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

As distrofias musculares de cinturas (DMC) representam um grupo heterogêneo de distúrbios hereditários e degenerativos da musculatura esquelética, com evolução progressiva, caracterizadas principalmente pelo acometimento predominante das cinturas escapular e/ou pélvica. São classificadas de acordo com o padrão de herança e o gene envolvido, podendo ser autossômicas dominantes ou autossômicas recessivas. Embora as disfunções mitocondriais tenham sido pouco descritas nas DMC, alguns estudos apresentaram evidências morfológicas e bioquímicas de alterações secundárias na cadeia respiratória mitocondrial. As razões envolvidas em tais disfunções na DMC permanecem pouco compreendidas. Portanto, é imprescindível uma caracterização detalhada da disfunção mitocondrial nos pacientes com DMC para uma melhor compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos na doença. Os objetivos do estudo foram: quantificar a CoQ₁₀ em fragmentos do músculo esquelético de pacientes com DMC; quantificar a atividade enzimática de cada complexo da cadeia respiratória isoladamente; quantificar a atividade dos complexos II+III em conjunto como avaliação indireta da CoQ₁₀; verificar a relação entre a área relativa de fibras musculares no fragmento de biópsia e o grau de disfunção mitocondrial nesses fragmentos; correlacionar a função mitocondrial com parâmetros clínicos de pacientes com DMC. Participaram do estudo 21 pacientes com DMC e 9 controles saudáveis. Os parâmetros clínicos incluídos foram idade no momento da biópsia, idade de início dos sintomas e tempo de evolução da doença. A análise do metabolismo mitocondrial foi realizada por: quantificação da coenzima Q₁₀ nos fragmentos de biópsia muscular e quantificação da atividade dos complexos enzimáticos mitocondriais I, II, III, II+III e IV da cadeia respiratória e da enzima da matriz mitocondrial citrato sintase. Foram correlacionados os parâmetros clínicos, a proporção de fibras na biópsia muscular e os resultados das análises bioquímicas para a caracterização da função mitocondrial. A média dos pacientes com DMC em relação à idade no momento da biópsia, início dos sintomas e tempo de evolução da doença foi de 28,9 anos (DP ±11,7), 16,7 anos (DP ±10,3) e 12,1 anos (DP ±10,9), respectivamente. O grupo controle apresentou média de idade no momento da biópsia de 29,6 anos (DP ±10,3). A dosagem média de CoQ₁₀ nos fragmentos de biópsia de pacientes com DMC foi de 17,9 µg/g de tecido (DP ±9,2) e nos fragmentos dos controles foi de 29,5 µg/g de tecido (DP ±4,4). Não foi observada alteração das atividades isoladas dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória. Houve deficiência da atividade do conjunto de complexos II+III nos pacientes com DMC. A média da área ocupada por fibras musculares nos pacientes com DMC foi de 58,5% (DP ±26,1%) e nos controles foi de 76,35% (DP ±1,9%). Observou-se correlação moderada entre a quantidade de CoQ₁₀ e a área relativa de fibras musculares ($r=0,57$ e $p=0,007$). Não houve correlação da CoQ₁₀ com os parâmetros clínicos. No presente estudo, concluímos que existe uma deficiência secundária de CoQ₁₀ em pacientes com DMC, sendo um achado importante para melhor entendimento do acometimento mitocondrial nessa doença e uma abordagem terapêutica mais eficaz.

Palavras chave: Distrofia muscular de cinturas. Disfunção mitocondrial. Cadeia respiratória. Coenzima Q₁₀.

ABSTRACT

BENÁ, M. I. **Quantitative assessment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with limb-girdle muscular dystrophy.** 2018. 83 pages. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) is a group of inherited and degenerative disorders of the skeletal muscle, with a progressive clinical course and predominant involvement of the scapular and/or pelvic girdles. They are classified according to the pattern of inheritance (autosomal dominant or autosomal recessive) and the gene involved. Mitochondrial dysfunction has been reported in the LGMD, some studies have described morphological and biochemical evidences of secondary mitochondrial respiratory chain alterations in patients with LGMD. The reasons involved in such dysfunctions in the LGMD remain poorly understood. Therefore, a detailed characterization of the mitochondrial dysfunction in patients with LGMD allows a better understanding of the pathophysiological processes involved in the disease. Therefore, a detailed characterization of mitochondrial dysfunction in patients with LGMD is essential for a better understanding of the pathophysiological processes involved in the disease. The purposes of the study were: to quantify CoQ₁₀ in fragments of muscle biopsy of patients with LGMD; quantify the enzymatic activity of each respiratory chain complex isolated; quantify the activity of the II + III complexes together as an indirect measure of CoQ₁₀; to verify the relation between the relative area of muscular fibers in the fragment of biopsy and the degree of mitochondrial dysfunction in these fragments; correlate mitochondrial function with clinical parameters of patients with LGMD. Twenty-one patients with LGMD and nine healthy controls participated in the study. The clinical parameters included were age at the time of biopsy, age of onset of symptoms and time of disease progression. The analysis of mitochondrial metabolism was performed by: quantification of CoQ₁₀ in the muscle biopsy fragments and quantification of the activity of the mitochondrial enzyme complexes I, II, III, II + III and IV of the respiratory chain and the enzyme of the mitochondrial matrix citrate synthase. We analyzed the correlation of the clinical parameters, the proportion of fibers in the muscle biopsy and the results of the biochemical analyzes for the characterization of the mitochondrial function. For the LGMD groups, the mean age at the time of biopsy, onset of symptoms and disease duration was 28.9 years (SD ± 11.7), 16.7 years (SD ± 10.3) and 12.1 years (SD ± 10.9), respectively. The control group presented a mean age at the time of biopsy of 29.6 years (SD ± 10.3). The mean CoQ₁₀ dosage in the biopsy specimens of patients with LGMD was 17.9 µg / g tissue (SD ± 9.2) and in the fragments of the controls was 29.5 µg / g tissue (SD ± 4, 4). No alterations were observed in the isolated activities of the enzymatic complexes of the respiratory chain. There was a deficiency of the activity of complexes II + III in patients with LGMD. The mean area occupied by muscle fibers in patients with LGMD was 58.5% (SD ± 26.1%) and in controls it was 76.35% (SD ± 1.9%). A moderate correlation was observed between the amount of CoQ₁₀ and the relative area of muscle fibers ($r = 0.57$ and $p = 0.007$). There was no correlation of CoQ₁₀ with clinical parameters. In the present study, we conclude that there is a secondary deficiency of CoQ₁₀ in patients with LGMD, which has important implications in the understanding of mitochondrial involvement in this group of diseases and the development of a more effective therapeutic approach.

Keywords: Limb-Girdle Muscular Dystrophy. Mitochondrial dysfunction. Respiratory chain. Coenzyme CoQ₁₀.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Subtipos de DMC autossômicas dominantes.....	20
Tabela 2. Subtipos de DMC autossômicas recessivas.....	21
Tabela 3. Caracterização do diagnóstico dos pacientes com DMC.....	49
Tabela 4. Caracterização do diagnóstico molecular dos pacientes com DMC.....	50
Tabela 5. Caracterização dos grupos de pacientes e controles.....	51
Tabela 6. Quantificação de CoQ ₁₀ nas biópsias musculares.....	51
Tabela 7. Correlação da dosagem de CoQ ₁₀ com parâmetros clínicos dos pacientes.....	52
Tabela 8. Área relativa de fibras musculares e quantificação da CoQ ₁₀ em pacientes com DMC.....	56
Tabela 9. A atividade dos complexos II+III da cadeia respiratória em pacientes com DMC.....	57
Tabela 10. Correlação da dosagem de CoQ ₁₀ e atividade dos complexos II+III.....	57
Tabela 11. Ensaios enzimáticos da cadeia respiratória e da citrato sintase.....	58
Tabela 12. Correlação da dosagem de CoQ ₁₀ , citrato sintase e atividade dos complexos enzimáticos.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das principais proteínas integrantes da fibra muscular associadas às DMC.....	19
Figura 2. Fragmento de biópsia do músculo bíceps de um paciente com DMC aos 28 anos de idade.....	53
Figura 3. Fragmento de biópsia do músculo bíceps de um paciente com DMC aos 39 anos de idade.....	54
Figura 4. Fragmento de biópsia do músculo bíceps braquial de um paciente controle aos 18 anos de idade.....	54

LISTA DE SIGLAS

<i>ANO5</i>	Anoctamina-5
<i>ATP</i>	Adenosina Trifosfato
<i>BVES</i>	Substância epicárdica dos vasos sanguíneos
<i>CAPN3</i>	Calpaína 3
<i>CAV3</i>	Caveolina-3
<i>CK</i>	Creatina quinase
<i>CoQ</i>	Coenzima Q, ubiquinona
<i>COX</i>	Citocromo c oxidase
<i>DAG1</i>	Distroglicana
<i>DES</i>	Desmina
<i>DMB</i>	Distrofia muscular de Becker
<i>DMC</i>	Distrofia muscular de cinturas
<i>DMC1</i>	Distrofia muscular de cinturas autossômica dominante
<i>DMC1A-G</i>	Subtipos de DMC autossômicas dominantes
<i>DMC2</i>	Distrofia muscular de cinturas autossômica recessiva
<i>DMC2A-Z</i>	Subtipos de DMC autossômicas recessivas
<i>DMD</i>	Distrofia muscular de Duchenne
<i>DNA</i>	Ácido dioxirribonucleico
<i>DNAJB6</i>	Homólogo HSP-40, subfamília b, número 6 (chaperona)
<i>DP</i>	Desvio padrão
<i>DYSF</i>	Disferlina
<i>ERO</i>	Espécies reativas de oxigênio
<i>FADH₂</i>	Dinucleotídio de flavina e adenina reduzido
<i>FKRP</i>	Proteína relacionada à fukutina
<i>FKTN</i>	Fukutina
<i>FMRP-USP</i>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<i>GAA</i>	α -glicosidase ácida
<i>GMPPB</i>	GDP-manose pirofosforilase B
<i>HC-FMRP-USP</i>	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<i>HCl</i>	Ácido clorídrico
<i>HNRPDL</i>	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea do tipo D
<i>HPLC</i>	Cromatografia líquida de alta performance
<i>ISPD</i>	Isoprenoide sintase contendo domínio
<i>KCl</i>	Cloreto de potássio
<i>KCN</i>	Cianeto de potássio
<i>LIMS2</i>	LIM e proteína 2 contendo domínio do tipo do antígeno de células senescentes
<i>LMNA</i>	Lamina A/C
<i>MYOT</i>	Miotilina
<i>NADH</i>	Dinucleotídio de nicotinamida e adenina reduzido
<i>NIH</i>	National Institute of Health
<i>p</i>	Nível de significância
<i>pH</i>	Potencial hidrogeniônico

<i>PLEC1</i>	Plectina
<i>POGLUT1</i>	Proteína-O-glicosiltransferase-1
<i>POMGNT1</i>	Proteína O-manose beta-1,2-N-glucosaminiltransferase1
<i>POMT1</i>	Proteína O-manosiltransferase 1
<i>POMT2</i>	Proteína O-manosiltransferase 2
<i>r</i>	Coefficiente de correlação de Spearman
RNA	Ácido ribonucleico
SDH	Succinato desidrogenase
<i>SGCA</i>	α -sarcoglicana
<i>SGCB</i>	β -sarcoglicana
<i>SGCD</i>	δ -sarcoglicana
<i>SGCG</i>	γ -sarcoglicana
<i>SPSS</i>	Statistical Package for the Social Sciences
<i>TCAP</i>	Teletonina
<i>TNPO3</i>	Transportina 3
<i>TOR1AIP1</i>	Poli-peptídio 1B associado à lamina
<i>TRAPPC11</i>	Complexo de partículas de proteína de tráfego 11
<i>TRIM32</i>	E3 ubiquitina-proteína ligase
<i>TTN</i>	Titina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: graus Celsius

µl: microlitro

µg: micrograma

ml: mililitro

mM: milimolar

nm: nanômetro

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Definição	18
1.2 Formas autossômicas dominantes e recessivas de DMC.....	20
1.3 Papel da disfunção mitocondrial na fisiopatologia das distrofias musculares.....	34
2. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivos gerais	42
2.2 Objetivos específicos	42
3. HIPÓTESES DO ESTUDO	43
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
4.1 CASUÍSTICA.....	44
4.1.1. Grupo de pacientes	44
4.1.2 Grupo controle	45
4.2 MÉTODOS	45
4.2.1 Dados demográficos	45
4.2.2 Biópsia muscular	46
4.2.3 Análise morfométrica	46
4.2.4 Quantificação da CoQ ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular	47
4.2.5 Análise da atividade das enzimas da cadeia respiratória	47
4.3 Análise estatística	48
5. RESULTADOS	49
5.1.1 Casuística.....	49
5.1.2 Quantificação de CoQ ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular	51
5.1.3 Correlação da CoQ ₁₀ com parâmetros clínicos.....	52
5.1.4 Relação entre a dosagem de CoQ ₁₀ e a área relativa de fibras musculares....	52
5.1.5 Ensaio enzimáticos da cadeia respiratória	56
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO.....	75
APÊNDICES	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição

As distrofias musculares de cinturas (DMC) representam um grupo heterogêneo de desordens hereditárias e degenerativas da musculatura esquelética, com evolução progressiva e fenótipo caracterizado principalmente pelo acometimento predominante da cintura escapular e pélvica (NORWOOD et al., 2007; MATHEWS, MOORE, 2003). As DMC são classificadas de acordo com o padrão de herança e o gene envolvido: as autossômicas dominantes são denominadas DMC1 e as autossômicas recessivas DMC2; segue-se uma letra em ordem alfabética conforme a sequência de descoberta do locus cromossômico ou do gene envolvido em cada subtipo de DMC (BUSHBY, 1995; BUSHBY, BECKMANN, 1995; KHADILKAR, PATEL, LALKAKA, 2018). Até o momento, foram descritos 32 subtipos de DMC, divididos em 8 autossômicas dominantes e 24 autossômicas recessivas (KHADILKAR, PATEL, LALKAKA, 2018). Portanto, conhecer a história familiar é importante para a investigação do tipo de herança e, com isso, direcionar o diagnóstico.

Homens e mulheres de todas as idades podem ser afetados (NARAYANASWAMI et al., 2014). Apesar da prevalência variável das DMC, em função de sua heterogeneidade, a frequência dessas doenças, como um grupo, considerando-se todas as faixas etárias, foi de 1,63 para 100.000 indivíduos e, ao incluir apenas crianças, de 0,48 para 100.000 indivíduos menores de 16 anos (MAH et al., 2016). As DMC autossômicas dominantes são consideradas formas raras, representando cerca de 10% de todas as DMC (ZATZ et al., 2003). As DMC autossômicas recessivas são consideradas formas mais comuns, com prevalência variável de acordo com a localização geográfica, representando cerca de 90% de todas as DMC. No Brasil, as DMC recessivas também são mais comuns do que as formas dominantes. Em uma análise de 120 famílias brasileiras, os subtipos recessivos mais comuns foram: DMC2A, DMC2B, grupo das sarcoglicanopatias (DMC2C, DMC2D, DMC2E, DMC2F), DMC2G e DMC2I. Destes, o subtipo DMC2A foi o mais prevalente (ZATZ et al., 2003).

Portanto, conforme a origem étnica da população envolvida, observam-se variações na prevalência dos subgrupos de DMC: enquanto que, no Brasil, Zatz et al.

(2003) observaram que a DMC2A era a forma mais frequente em sua casuística, na população finlandesa a forma mais prevalente é a DMC2J e na dinamarquesa a DMC2T (PENISSON-BESNIER et al. 2010; OESTERGAARD et al. 2016).

As DMC são causadas por mutações em genes que codificam proteínas integrantes da fibra muscular, essenciais para a estabilidade e o funcionamento celular adequado. Em razão dos defeitos genéticos, a ausência ou anormalidades de proteínas pode afetar a função do sarcolema, do sarcoplasma, da matriz extracelular, do sarcômero ou do núcleo (WICKLUND, KISSEL, 2014). Consequentemente, podem surgir alterações da estabilidade estrutural da fibra, atividade de vias fisiológicas celulares, de estruturas subcelulares e desequilíbrios entre os processos de lesão e reparação muscular, ocasionando a degeneração progressiva desse tecido (MATHEWS, MOORE, 2003).

A figura abaixo ilustra parte de uma fibra muscular, com algumas das proteínas envolvidas na gênese das DMC, enquanto que as Tabelas 1 e 2 descrevem de forma mais completa os subtipos das DMC autossômicas dominantes e recessivas, com os respectivos genes mutantes, o locus cromossômico associado e as proteínas por eles codificadas (KHADILKAR, PATEL, LALKAKA, 2018).

Figura 1. Representação esquemática das principais proteínas integrantes da fibra muscular associadas às DMC.

DMC, distrofia muscular de cinturas; DMED, distrofia muscular de Emery Dreifuss; DG, distroglicana; FKRP, proteína relacionada à fukutina; POMGNT1, proteína O-manose beta-1,2-N-glucosaminiltransferase1; POMT1, proteína O-manosiltransferase 1; POMT2, proteína O-manosiltransferase 2; Sspn, sarcospan; SG, sarcoglicana; TRIM32, proteína de motivo tripartido 32.

1.2 Formas autossômicas dominantes e recessivas de DMC

As DMC autossômicas dominantes correspondem a um grupo de 8 subtipos. Destes, os genes causadores dos subtipos DMC1A a 1G foram identificados e o gene causador da DMC1H permanece desconhecido (Tabela 1). A maioria das DMC autossômicas dominantes é causada por genes que também são responsáveis por outros fenótipos, não sendo exclusivos deste grupo de doenças.

Tabela 1. Subtipos de DMC autossômicas dominantes.

Subtipo	Gene	Lócus	Proteína alterada
DMC1A	<i>MYOT</i>	5q31.2	Miotilina
DMC1B	<i>LMNA</i>	1q22	Lamina A/C
DMC1C	<i>CAV3</i>	3p25.3	Caveolina-3
DMC1D	<i>DNAJB6</i>	7q36	Homólogo HSP-40, subfamília b, número 6 (chaperona)
DMC1E	<i>DES</i>	2q35	Desmina
DMC1F	<i>TNPO3</i>	7q32	Transportina 3
DMC1G	<i>HNRPDL</i>	4q21	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea do tipo D
DMC1H	Desconhecido	3p23-p25	-

As DMC autossômicas recessivas correspondem a um grupo de 24 subtipos com todos os genes envolvidos já identificados (Tabela 2). Assim como observado nas DMC autossômicas dominantes, os genes causadores de várias das DMC autossômicas recessivas são também responsáveis por outros fenótipos clínicos, não sendo exclusivos deste grupo de doenças.

Tabela 2. Subtipos de DMC autossômicas recessivas.

Subtipo	Gene	Lócus	Proteína alterada
DMC2A	<i>CAPN3</i>	15q15	Calpaína 3
DMC2B	<i>DYSF</i>	2p13.2	Disferlina
DMC2C	<i>SGCG</i>	13q12	γ -sarcoglicana
DMC2D	<i>SGCA</i>	17q21.33	α -sarcoglicana
DMC2E	<i>SGCB</i>	4q12	β -sarcoglicana
DMC2F	<i>SGCD</i>	5q33	δ -sarcoglicana
DMC2G	<i>TCAP</i>	17q12	Teletonina
DMC2H	<i>TRIM32</i>	9q33.1	E3 ubiquitina-proteína ligase
DMC2I	<i>FKRP</i>	19q13.3	Proteína relacionada à fukutina
DMC2J	<i>TTN</i>	2q24.3	Titina
DMC2K	<i>POMT1</i>	9q34.1	Proteína O-manosiltransferase 1
DMC2L	<i>ANO5</i>	11p13-p12	Anoctamina-5
DMC2M	<i>FKTN</i>	9q31	Fukutina
DMC2N	<i>POMT2</i>	14q24	Proteína O-manosiltransferase 2
DMC2O	<i>POMGNT1</i>	1p34.1	Proteína O-manose beta-1,2-N-glucosaminiltransferase1
DMC2P	<i>DAG1</i>	3p21	Distroglicana
DMC2Q	<i>PLEC1</i>	8q24	Plectina
DMC2R	<i>DES</i>	2q35	Desmina
DMC2S	<i>TRAPPC11</i>	4q35	Complexo de partículas de proteína de tráfego 11
DMC2T	<i>GMPPB</i>	3p21	GDP-manose pirofosforilase B
DMC2U	<i>ISPD</i>	7p21	Isoprenoide sintase contendo domínio
DMC2V	<i>GAA</i>	17q25.3	α -glicosidase ácida

DMC2W	<i>LIMS2</i>	2q14	LIM e proteína 2 contendo domínio do tipo do antígeno de células senescentes
DMC2X	<i>BVES</i>	6q21	Substância epicárdica dos vasos sanguíneos
DMC2Y	<i>TOR1AIP1</i>	1q25	Polipeptídio 1B associado à lamina
DMC2Z	<i>POGLUT1</i>	3q13	Proteína-O-glicosiltransferase-1

Os vários subtipos de DMC, decorrentes de diferentes anormalidades proteicas, apresentam características clínicas variáveis com relação à idade de início dos sintomas, ao padrão de envolvimento muscular, à progressão da doença, a anormalidades cardíacas e respiratórias, entre outras (THOMPSON, STRAUB, 2016). Embora algumas DMC apresentem características clínicas bastante sugestivas, heterogeneidade clínica é observada em várias doenças do grupo; tal heterogeneidade pode ocorrer também em relação a uma determinada mutação genética, resultando em um fenótipo variável mesmo entre diferentes membros de uma mesma família (BECKMANN et al., 1999; LAVAL, BUSHBY, 2004).

De forma geral, as DMC autossômicas dominantes apresentam maior heterogeneidade clínica, com início mais tardio e progressão mais lenta e dos sintomas quando comparadas às formas recessivas de DMC, exceto a DMC1B, que pode apresentar morbidade e mortalidade precoces (ZATZ et al., 2003; PALMIO et al., 2015; WICKLUND, 2016).

A DMC1A ocorre devido a mutações no gene *MYOT*, que produz a proteína miotilina, componente do disco Z, que se associa a várias outras proteínas sarcoméricas. Essa proteína desempenha um importante papel na estabilização do disco Z durante a contração muscular (REILICH et al., 2011; CARLSSON et al., 2007). As manifestações clínicas geralmente ocorrem na fase adulta, inicialmente com fraqueza proximal e posteriormente fraqueza distal com progressão lenta. Os músculos faciais podem ser afetados e algumas famílias apresentam disartria. Não é comum haver envolvimento cardíaco, sendo mais relatado o acometimento respiratório por insuficiência respiratória restritiva (OLIVÉ et al., 2005). Os níveis séricos de CK podem estar entre 1,6 a 9 vezes o limite superior do normal (HAUSER et al., 2002).

A DMC1B ocorre devido a mutações no gene *LMNA*, que codifica a proteína lamina A/C, componente da face interna do envelope nuclear com importante papel na manutenção da membrana nuclear (DECOSTRE, BEN YAOU, BONNE, 2005). As manifestações clínicas podem surgir tanto na infância quanto na fase adulta, sendo caracterizadas predominantemente por fraqueza muscular na cintura pélvica com progressão lenta. Contraturas articulares são comuns e precoces, podendo surgir inclusive na infância. Contratura da musculatura paravertebral, com rigidez espinal é frequente nesse subtipo (NORWOOD et al., 2007). Complicações cardíacas como arritmias e distúrbios de condução são comuns (RANKIN, ELLARD, 2006). O nível de CK pode se elevar até 10 vezes o limite superior do normal (WICKLUND, KISSEL, 2014).

A DMC1C ocorre devido a mutações no gene *CAV3*, que codifica a proteína caveolina 3, presente no sarcolema. A caveolina 3 é a principal proteína que compõe as cavéolas presentes na membrana da fibra muscular, apresentando papel importante na estabilidade e manutenção da integridade do sarcolema. É importante também para o tráfego de vesículas e a transdução de sinais (GAZZERRO et al., 2010). O fenótipo DMC1C é um dos fenótipos decorrentes de mutação nesse gene, fazendo parte de um grupo de doenças neuromusculares denominadas caveolinopatias. As manifestações clínicas geralmente ocorrem na primeira década de vida, sendo caracterizadas por fraqueza muscular proximal da cintura pélvica e distal, com progressão usualmente lenta. Os pacientes podem apresentar hipertrofia das panturrilhas (BRUNO et al., 2007). Envolvimento cardíaco é frequente (NIGRO, SAVARESE, 2014). Os níveis de CK variam de 4 a 25 vezes acima do limite superior do normal (BRUNO et al., 2007).

A DMC1D ocorre devido a mutações no gene *DNAJB6*, que codifica proteína pertencente a uma classe de co-chaperonas, que também é expressa no disco Z, com importante função na manutenção da integridade do disco (SARPARANTA et al., 2012). As manifestações clínicas geralmente ocorrem na fase adulta, entre 30 e 60 anos de idade. São caracterizadas por fraqueza proximal da cintura pélvica, com evolução posterior para cintura escapular, de progressão lenta. A marcha pode ser preservada até a idade tardia quando a doença apresenta-se de forma menos grave. Dentre as poucas famílias que manifestaram a doença, sintomas cardíacos e respiratórios não foram observados (HACKMAN et al., 2011; SANDELL et al., 2016). Os níveis de CK apresentam elevações variáveis, de 1 a 10 vezes o limite superior do normal (HACKMAN et al., 2011; NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC1E ocorre devido a mutações no gene *DES*, que codifica a proteína desmina. Tal proteína é um filamento intermediário específico do músculo e está situada nas adjacências do disco Z dos sarcômero, como um esqueleto externo, que promove a conexão dos discos Z entre si e também do sarcômero com o sarcolema, com as organelas citoplasmáticas e a membrana nuclear. Apresenta importante papel na integridade estrutural da fibra muscular, resistência ao estresse mecânico e na sinalização celular (CLEMEN et al., 2013). As manifestações clínicas ocorrem na segunda ou terceira década de vida, geralmente com fraqueza proximal de progressão lenta. Manifestações cardíacas como cardiomiopatia dilatada e defeitos de condução são frequentes. Os níveis de CK são elevados, em geral de 5 a 10 vezes o limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC1F ocorre devido a mutações no gene *TNPO3*, que codifica a proteína transportina 3, componente do envelope nuclear. A transportina 3 está envolvida no transporte de proteínas para o núcleo. As manifestações clínicas se iniciam em idades variáveis, porém menos frequentemente na fase adulta. As principais características clínicas observadas foram: fraqueza proximal simétrica com início predominante nos membros inferiores e gravidade variável. A progressão em geral é lenta nos quadros mais benignos, embora possa evoluir, em pacientes que apresentam início mais precoce, de forma a resultar em incapacidade importante, incluindo perda da deambulação. Manifestações cardíacas não foram observadas, mas alguns pacientes podem apresentar comprometimento muscular respiratório (MELIÀ et al., 2013). Os níveis de CK são levemente elevados, podendo chegar até 3 vezes o limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC1G ocorre devido a mutações no gene *HRNPDL*, que codifica a ribonucleoproteína nuclear heterogênea do tipo D, a qual desempenha função na biogênese e no metabolismo do RNA mensageiro. Essa mutação foi descrita a partir da análise genética de duas famílias, uma brasileira caucasiana e outra uruguaia. As manifestações clínicas se iniciam em idades variáveis, porém é mais frequente o início na fase adulta. As principais características clínicas são: acometimento proximal dos membros inferiores e posteriormente dos membros superiores, com progressão lenta. Geralmente os indivíduos desenvolvem limitação progressiva da flexão dos dedos das mãos e dos pés (VIEIRA et al., 2014). Envolvimento cardíaco não foi observado. Os níveis de CK podem estar 1 a 9 vezes acima do limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

O gene causador da DMC1H permanece desconhecido. Bisceglia et al. (2010), observaram uma forma desconhecida de DMC dominante em uma família italiana com quatro gerações afetadas por fraqueza muscular de cinturas, identificando o locus cromossômico 3p23-25p como a região mais provável desse subtipo. As manifestações clínicas apresentaram idade de início e gravidade variáveis, caracterizadas por fraqueza proximal dos membros inferiores e superiores, com progressão lenta. Envolvimento cardíaco não foi observado. Os níveis de CK podem ser elevados, variando de 1 a 10 vezes o limite superior do normal (BISCEGLIA et al., 2010; NIGRO, SAVARESE, 2014).

As DMC autossômicas recessivas, de uma forma geral, apresentam quadro clínico mais grave, com idade de início mais precoce das manifestações clínicas e progressão mais evidente da doença quando comparadas às DMC autossômicas dominantes (ZATZ et al., 2003; WICKLUND, 2016).

A DMC2A ocorre devido a mutações no gene *CAPN3*, que codifica a proteína calpaína 3, parte de uma família de calpaínas, as quais consistem em proteases de cisteína dependentes de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ou seja, são enzimas proteolíticas ativadas pelo cálcio, com sensibilidades distintas a esse íon. Na fibra muscular, a calpaína 3 está localizada nas bandas sarcoméricas I e M, ancorada na proteína titina; interage principalmente com esta e a proteína α -actinina. Exerce papéis múltiplos na função e manutenção da fibra muscular, não se restringindo à atividade proteolítica, através da qual regula a renovação proteica e o remodelamento do sarcômero, mas apresentando também função estrutural e no efluxo de cálcio do retículo sarcoplasmático (HAUERSLEV et al., 2012; NILSSON et al., 2014). A DMC2A representa cerca de 30% das formas recessivas de DMC, sendo considerado o subtipo mais frequente desse grupo, inclusive em casuística brasileira (RICHARD et al., 2016; ZATZ et al., 2003). As manifestações clínicas relacionadas à deficiência da calpaína 3 geralmente surgem na primeira ou segunda década de vida, sendo os homens mais afetados. As características clínicas incluem envolvimento muscular com predomínio simétrico, com acometimento predominante dos músculos axiais do tronco, podendo-se observar escápula alada, e dos músculos proximais do membro inferior, com progressão lenta. São comuns a ocorrência de hipertrofia das panturrilhas e contratura do tendão de Aquiles (RICHARD et al., 2016; WICKLUND, KISSEL, 2014). O envolvimento cardíaco é pouco observado. Manifestações respiratórias são pouco frequentes e têm maior probabilidade de ocorrer nas fases tardias da doença, podendo haver insuficiência

respiratória grave (MORI YOSHIMURA et al., 2017). Os níveis de CK são elevados entre 5 e 80 vezes o limite superior do normal (NILSSON et al., 2014).

A DMC2B ocorre devido a mutações no gene *DYSF*, que codifica a proteína disferlina, uma proteína transmembrana presente no sarcolema. A disferlina desempenha papel importante no reparo de membranas, assim como na fusão e no tráfego de vesículas (LEK et al., 2012). Esse subtipo é considerado o segundo mais prevalente ao redor do mundo e na população brasileira (GUGLIERI et al., 2008; ZATZ et al., 2003). As mutações no gene da disferlina fazem parte de um grupo de distúrbios recessivos denominados disferlinopatias, caracterizados por variados fenótipos e heterogeneidade clínica (FANIN, ANGELENI, 2016). As manifestações clínicas surgem por volta da segunda ou terceira década de vida. O acometimento inicia-se pelos membros inferiores, sendo frequente que os pacientes apresentem grau leve de fraqueza distal, com dificuldade de ficar na ponta dos pés já no início do quadro. A evolução é lenta na maioria dos pacientes, observando-se acometimento dos membros superiores após dificuldade mais evidente para a marcha. É comum a evolução para perda da deambulação ao longo do tempo, após algumas décadas do início do quadro. O envolvimento cardíaco é incomum. Complicação respiratória também é pouco frequente, mas pode surgir na fase tardia da doença. Os níveis de CK são elevados entre 5 e 160 vezes acima do limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014; WICKLUND, KISSEL, 2014).

As formas DMC2C-F, conhecidas como sarcoglicanopatias, ocorrem devido a mutações em qualquer um dos genes que codificam as proteínas transmembranares α , β , γ , δ sarcoglicanas, causando respectivamente as DMC 2D, 2E, 2C e 2F. Essas quatro proteínas formam o complexo de sarcoglicanas, o qual se associa com as proteínas sarcospan, distroglicanas e distrofina, estabelecendo uma conexão entre o citoesqueleto e a matriz extracelular (WICKLUND, KISSEL, 2014). Esse complexo de glicoproteínas associadas à distrofina apresenta também importante papel na sinalização celular e no tráfego transmembrana. As sarcoglicanopatias representam cerca de 10% de todas as DMC. Os subtipos mais comuns desse grupo são a DMC2C e a DMC2D. As manifestações clínicas apresentam idade de início variável, geralmente na primeira década de vida e, eventualmente, na segunda década. De forma geral, o grupo é caracterizado por fraqueza muscular proximal, com início predominante nos membros inferiores e evolução posterior para cintura escapular, com a ocorrência de escápula alada. Os pacientes também podem desenvolver fraqueza muscular respiratória. Outras

características comuns são hipertrofia das panturrilhas, acentuação da lordose lombar e contraturas articulares, sem comprometimento da função cognitiva (MARSOLIER et al., 2017; WICKLUND, KISSEL, 2014). A forma DMC2D pode apresentar progressão mais amena; já as formas DMC2E e DMC2F podem ser tão graves quanto a distrofia muscular de Duchenne (DMD) (EYMARD et al., 1997). Envolvimento cardíaco é comum, geralmente na forma de cardiomiopatia dilatada (MARSOLIER et al., 2017). Os níveis de CK são elevados, podendo estar entre 5 e 120 vezes acima do limite superior do normal (WICKLUND, KISSEL, 2014).

A DMC2G ocorre devido a mutações no gene *TCAP*, que codifica a proteína telotonina. Localizada no disco Z, a telotonina estabelece conexões com a titina e outras proteínas sarcoméricas, apresentando função na regulação e no desenvolvimento da estrutura normal do sarcômero (ZHANG et al., 2011). A maior parte das famílias afetadas por esse subtipo de DMC são brasileiras (PAIM et al., 2013). As manifestações clínicas surgem por volta da primeira ou segunda década de vida, sendo caracterizadas por fraqueza das cinturas escapular e pélvica e da porção distal dos membros inferiores, sendo observadas tanto atrofia quanto hipertrofia das panturrilhas em diferentes pacientes. A progressão é lenta (PAIM et al., 2013; ZATZ et al., 2003). Envolvimento cardíaco pode surgir como cardiomiopatia dilatada. Os níveis de CK são elevados, entre 3 e 30 vezes o limite superior do normal (ZATZ et al., 2003).

A DMC2H ocorre devido a mutações no gene *TRIM32*, que codifica a proteína de motivo tripartido 32, uma E3 ubiquitina ligase, envolvida no processo de ubiquitinação de proteínas. Tal processo regula degradação, localização celular, interações e consequentemente a atividade das proteínas ubiquitinadas. As manifestações clínicas da DMC2H surgem entre a primeira e a quarta décadas de vida, sendo caracterizadas por fraqueza proximal e atrofia muscular. A progressão da doença é lenta, podendo haver manutenção da marcha até a sexta década de vida. Não há evidências de manifestações cardíacas (SHOKEIR, KOBRINSKY, 1976; WEILER et al., 1997). Os níveis de CK são moderadamente elevados, podendo chegar a 10 vezes o limite superior do normal (SHIEH, KUDRYASHOVA, SPENCER, 2011; NIGRO, SAVARESE, 2014).

As DMC2I, 2K, 2M, 2N, 2O e 2P, com recente inclusão das formas 2T, 2U e 2Z, formam o grupo das distroglicanopatias, que resultam da deficiência na glicosilação da α -distroglicana. A α -distroglicana faz parte do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina e, adequadamente glicosilada, apresenta importante papel na estabilização do

sarcolema e na ancoragem da fibra muscular na matriz extracelular. É, portanto, essencial para a transdução de sinais de estímulos advindos da matriz extracelular e para manter a integridade da fibra muscular, evitando os danos inerentes ao processo mecânico de contração (ADAMS, BRANCACCIO, 2015). Trata-se de um grupo heterogêneo, decorrente de mutações em genes distintos que codificam proteínas participantes do processo de glicosilação proteica, cujas anormalidades resultam em formas de DMC com fenótipo variável (PUCKETT et al., 2009; RIISAGER et al., 2013).

A DMC2I ocorre devido a mutações no gene *FKRP*, que codifica a proteína relacionada à fukutina. A DMC2I é de ocorrência rara, entretanto é um dos subtipos de maior prevalência no norte da Europa (RICHARD et al., 2016). As manifestações clínicas geralmente ocorrem entre a segunda e a terceira décadas de vida, inicialmente com fraqueza da cintura pélvica, seguindo-se fraqueza distal dos membros inferiores e da cintura escapular, podendo ocorrer escápula alada. A fraqueza muscular respiratória é frequente, podendo ocorrer enquanto o paciente ainda é capaz de deambular (NORWOOD et al., 2007). A progressão é moderada. Hipertrofia das panturrilhas e acentuação da lordose lombar podem estar presentes (WICKLUND, KISSEL, 2014; RICHARD et al., 2016). O envolvimento cardíaco é comum na forma de cardiomiopatia dilatada (RICHARD et al., 2016). Os níveis de CK estão elevados entre 3 e 50 vezes o limite superior do normal (WICKLUND, KISSEL, 2014).

A DMC2K ocorre devido a mutações no gene *POMT1*, que codifica a proteína O-manosiltransferase 1. As manifestações clínicas são de início tardio, caracterizadas por fraqueza proximal nos membros inferiores, com progressão lenta. Alguns pacientes podem desenvolver hipertrofia muscular das coxas e panturrilhas (BALCI et al., 2005). É frequente a ocorrência de microcefalia e retardo mental leve (YANG et al., 2016). O acometimento cardíaco é pouco comum, mas alguns indivíduos apresentaram cardiomiopatia (BELLO et al., 2012). Os níveis de CK podem se elevar a mais de 20 vezes o limite superior do normal (BALCI et al., 2005).

A DMC2M ocorre devido a mutações no gene *FKTN*, que codifica a proteína fukutina. As manifestações clínicas surgem entre a primeira e a terceira décadas de vida, sendo mais comum que ocorram na infância. São caracterizadas por fraqueza muscular proximal, inicialmente nos membros inferiores e posteriormente nos membros superiores, com progressão lenta a moderada (DE PAULA et al., 2003). Envolvimento cardíaco com cardiomiopatia, podendo evoluir para insuficiência cardíaca, tem sido

observado (MATSUI et al., 2015; RIISAGER et al., 2013). Os níveis de CK variam entre 5 e 30 vezes acima do limite superior do normal (WICKLUND, KISSEL, 2014).

A DMC2N ocorre devido a mutações no gene *POMT2*, que codifica a proteína O-manosiltransferase 2. As manifestações clínicas geralmente surgem na infância, sendo comum o atraso da aquisição da marcha. São caracterizadas por fraqueza muscular nos membros inferiores, predominantemente simétrica, afetando principalmente os flexores e extensores do quadril e do joelho, com progressão lenta. Comprometimento da função cognitiva é comum. Há presença de manifestações cardíacas como cardiomiopatia dilatada (ØSTERGAARD et al., 2017). Os níveis de CK são elevados entre 5 e 15 vezes o limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC2O ocorre devido a mutações no gene *POMGnT1*, que codifica a proteína O-manose beta-1,2-N-glucosaminiltransferase 1. As manifestações clínicas geralmente surgem na adolescência, caracterizadas por fraqueza muscular proximal, com progressão moderada. Hipertrofia de músculos dos membros inferiores pode estar presente (CLEMENT et al., 2018). Envolvimento cardíaco não é observado. Os níveis de CK podem estar elevados entre 2 e 10 vezes o limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC2P ocorre devido a mutação no gene *DAG1*, que codifica a pré-proteína distroglicana, a qual passará por processos de glicosilação e proteolítico para gerar o α - e o β - distroglicanas. A mutação descrita compromete sítio de glicosilação para formação da α -distoglicana, interferindo em sua ligação com a laminina (HARA et al., 2011). As manifestações clínicas do paciente descrito surgiram na infância, sendo caracterizadas por fraqueza proximal acometendo a cintura pélvica, com progressão moderada e comprometimento cognitivo. Outros sinais clínicos que podem estar presentes são hipertrofia das panturrilhas, contratura nos tornozelos e acentuação da lordose lombar (DINCER et al., 2003; HARA et al., 2011). Envolvimento cardíaco não foi observado. Os níveis de CK estavam elevados em até 20 vezes o limite superior da normalidade (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC2T ocorre devido a mutações no gene *GMPPB*, que codifica a proteína GDP-manose pirofosforilase B. O fenótipo clínico da DMC2T foi observado em indivíduos dinamarqueses. As manifestações clínicas se iniciam entre 5 e 30 anos de idade e são caracterizadas inicialmente por fraqueza da cintura pélvica observada pelo

comprometimento da capacidade de correr e subir escadas. Os músculos paraespinais e os isquiotibiais são os mais afetados. Alguns indivíduos podem desenvolver hipertrofia das panturrilhas. Comprometimento cardíaco pode estar presente. Os níveis de CK são elevados nesse subtipo, com valores que variam aproximadamente de 3 a 12 vezes o limite superior do normal nos casos descritos por Ostergaard et al. (2016).

A DMC2U ocorre devido a mutações no gene *ISPD*, que codifica a proteína isoprenoide sintase contendo domínio. Em um estudo envolvendo 9 casos desse subtipo, as manifestações clínicas surgiram na infância, caracterizadas por fraqueza na cintura pélvica, com progressão moderada a rápida. Na maioria dos pacientes acometidos houve perda da marcha no início da adolescência. Foi relatada fraqueza da musculatura respiratória, com insuficiência ventilatória. Hipertrofia muscular é frequente, inclusive da língua. O envolvimento cardíaco é comum (CIRAK et al., 2013). Os níveis de CK podem estar elevados entre 6 e 50 vezes o limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC2Z ocorre devido a mutações no gene *POGLUT1*, que codifica a proteína O-glicosiltransferase 1. Quanto alterada, compromete a sinalização de Notch, provoca importante redução das células satélites e resulta em hipoglicosilação da α -distroglicana. As manifestações clínicas ocorrem na fase adulta, sendo caracterizadas por fraqueza muscular proximal, predominantemente nos membros inferiores, com acometimento posterior eventual dos membros superiores e progressão lenta. Pode ocorrer distúrbio respiratório restritivo, com declínio da função pulmonar. Envolvimento cardíaco não foi observado. Os níveis de CK podem ser normais ou discretamente elevados (SERVIAN-MORILLA et al., 2016).

A DMC2J ocorre devido a mutações no gene *TTN*, que codifica a proteína titina, uma proteína sarcomérica de grandes proporções, importante para a elasticidade e integridade da miofibrila. Existem poucas populações em que foram identificados indivíduos com esse subtipo de DMC, sendo os finlandeses os mais afetados. As manifestações clínicas geralmente surgem na primeira ou segunda décadas de vida, caracterizadas por fraqueza proximal com progressão rápida. A perda da deambulação pode ocorrer entre a segunda e a quarta décadas de vida (PENISSON-BESNIER et al., 2010). Envolvimento cardíaco não é comum. Os níveis de CK apresentam variações entre 10 e 40 vezes o limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC2L ocorre devido a mutações no gene *ANO5*, que codifica a proteína anoctamina 5. A função dessa proteína não é completamente compreendida, mas está

provavelmente relacionada ao fluxo de cloro através do sarcolema, ativado pelo cálcio, com consequente papel no processo de contração e relaxamento muscular, assim como na manutenção e reparo do sarcolema, com atuação na movimentação de lipídios entre as bicamadas lipídicas da membrana (VIHOLA et al., 2017). Essa distrofia muscular de cinturas é o terceiro subtipo mais comum no Norte da Europa (HICKS et al., 2011). As manifestações clínicas comumente se iniciam na fase adulta, em geral por volta da terceira década de vida, sendo mais frequente e mais grave em homens. Caracterizam-se por fraqueza proximal, inicialmente na cintura pélvica e nos membros inferiores, com progressão lenta. Manifestações cardíacas e respiratórias não têm sido observadas (SARKOZY et al., 2013). Os níveis de CK podem variar até 15 vezes o limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC2Q ocorre devido a mutações no gene *PLEC*, que codifica a proteína plectina. É uma proteína que se liga a diferentes moléculas componentes do citoesqueleto. Anormalidade da plectina leva a defeitos na ancoragem de estruturas intracelulares como os sarcômeros, gerando espaçamentos entre o sarcolema e os elementos contráteis, desalinhamento das linhas Z e desorganização da arquitetura interna das fibras. O fenótipo clínico da DMC2Q foi observado em uma família turca. As manifestações clínicas surgem na infância, caracterizadas por fraqueza generalizada de predomínio proximal, com progressão lenta até o final da adolescência, podendo evoluir de forma mais rápida quando o indivíduo atinge a idade adulta (GUNDESLI et al., 2010). Pode ser observada atrofia dos músculos axiais; envolvimento da musculatura respiratória e hipertrofia muscular foram relatados em parte dos pacientes (DEEV et al., 2017). Não se observa comprometimento cardíaco (DEEV et al., 2017; GUNDESLI et al., 2010). Os níveis de CK são elevados entre 10 e 50 vezes o limite superior do normal (NIGRO, SAVARESE, 2014).

A DMC2R ocorre devido a mutações no gene *DES*, que codifica a proteína desmina, maior filamento intermediário que circunda o disco Z, como já descrito acima, no texto referente à DMC1E. A associação de mutações no gene *DES* a essa forma recessiva de DMC é pouco descrita na literatura, com apenas alguns indivíduos afetados por esse subtipo. As manifestações clínicas são de início tardio, caracterizadas por fraqueza proximal nos membros superiores e inferiores, com progressão lenta. Atrofia distal e contraturas articulares podem surgir eventualmente (CETIN et al., 2013). Acometimento cardíaco não é comum, mas pode ocorrer tardiamente (NIGRO,

SAVARESE, 2014). Os níveis de CK são pouco elevados, podendo chegar a 2 vezes o limite superior do normal (WICKLUND, KISSEL, 2014).

A DMC2S ocorre devido a mutações no gene *TRAPPC11*, que codifica uma proteína componente do complexo TRAPP (*transport protein particle* ou proteína transportadora de partícula), envolvido no tráfego de vesículas intracelulares. A proteína em questão atua mais especificamente no transporte de vesículas do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi. Existem poucos relatos de indivíduos acometidos por essa mutação. As manifestações clínicas iniciam-se precocemente e são caracterizadas por fraqueza muscular das cinturas pélvica e escapular, com progressão lenta. Ocasionalmente há presença de distúrbio respiratório restritivo. Alguns indivíduos podem desenvolver displasia do quadril e escoliose. Comprometimento cardíaco não é observado. Os níveis de CK podem estar elevados entre 9 e 16 vezes o limite superior do normal (BÖGERSHAUSEN et al., 2013).

A DMC2V, conforme proposto por Nigro e Savarese (2014), é causada por mutação no gene *GAA*, que codifica a proteína α -glicosidase ácida, cuja deficiência está relacionada à doença de Pompe. Seria incluída no grupo de DMC uma forma mais leve da doença que cursa com o fenótipo de fraqueza muscular proximal (NIGRO et al., 2014; PREISLER, 2013).

A DMC2W ocorre devido a mutações no gene *LIMS2/PINCH2*, que codifica um membro de uma pequena família de proteínas de adesão focal, que interage com a ILK (quinase ligada à integrina). A proteína codificada tem cinco domínios LIM, cada domínio formando dois dedos de zinco, que permitem interações proteicas que regulam a forma e a migração das células. Participa de um complexo proteico com importante participação como mediador na transmissão de sinais mecânicos. O primeiro relato clínico dessa mutação associada ao fenótipo DMC2W descreveu dois irmãos que apresentaram manifestações clínicas de início na infância, com fraqueza proximal. Com o passar dos anos desenvolveram quadriparesia, sendo necessário o uso de cadeira de rodas a partir da adolescência. Outros sinais clínicos como hipertrofia das panturrilhas e macroglossia também foram observados. Ambos desenvolveram cardiomiopatia dilatada. Os valores de CK variaram entre 5000 IU na infância e 500 IU na fase adulta (CHARDON et al., 2015).

A DMC2X ocorre devido a mutações no gene *BVES*, o qual codifica a proteína substância epicárdica dos vasos sanguíneos, expressa predominantemente na membrana plasmática e nos túbulos T dos músculos cardíaco e esquelético. Apresenta interação

com proteínas como a CAV3 e a TREK-1, componente de canal de potássio, e potencializa correntes de potássio por aumentar o tráfego na membrana. Possui um sítio com alta afinidade de ligação ao AMPc. As mutações desse gene afetam a ligação ao AMPc, comprometem a regeneração muscular e causam disfunção no tráfego de membrana. Esse subtipo, considerado uma forma rara de DMC, foi observado em uma família localizada na Calábria (Itália). As manifestações clínicas geralmente são de início tardio, surgindo na idade adulta, e caracterizam-se por fraqueza proximal nos membros inferiores, com progressão lenta. Envolvimento cardíaco é muito frequente, com bloqueio atrioventricular e arritmia cardíaca. Os níveis de CK são elevados, variando de 750 a 1300 UI/l (SCHINDLER et al., 2016).

A DMC2Y ocorre devido a mutações no gene *TOR1AIP1*, que codifica a proteína polipeptídeo 1B associado à lamina (LAP1B), presente na membrana interna do envelope nuclear. Essa proteína desempenha função ainda não completamente elucidada, relacionada à ligação às lamínas dos tipos A e B e à regulação da ATPase da torsina A. As manifestações clínicas surgem na primeira ou segunda décadas de vida e são caracterizadas inicialmente por fraqueza na cintura pélvica e, posteriormente, fraqueza na cintura escapular e atrofia distal, com progressão lenta. É relatado comprometimento respiratório com declínio da função pulmonar. São comuns o desenvolvimento de contraturas articulares e espinha rígida, decorrente de contratura da musculatura paraespinal. Pode haver acometimento cardíaco leve. Os níveis de CK podem estar elevados (KAYMAN-KUREKCI et al, 2014).

Em razão da heterogeneidade genética de seus variados subtipos, as DMC apresentam distintos mecanismos patológicos, conforme descrito nos parágrafos anteriores. A partir de uma alteração específica, deflagra-se uma cascata de eventos que pode apresentar pontos em comum em várias doenças do grupo. Em decorrência desses processos, surgem alterações distróficas observadas nas biópsias musculares, caracterizadas por: variação do tamanho da fibra muscular com atrofia ou hipertrofia, internalização nuclear, presença de fibras em degeneração ou regeneração e aumento do tecido conjuntivo, entre outras (THOMPSON, STRAUB, 2016). Os eventos que induzem os danos musculares nas DMC ainda não estão completamente elucidados, incluindo mecanismos primários e fenômenos secundários que se somam para gerar as alterações observadas nas fibras musculares. Defeitos na cadeia respiratória mitocondrial têm sido observados em uma variedade de desordens neuromusculares,

incluindo as DMC, afetando a produção de energia celular e o funcionamento adequado do tecido muscular estriado esquelético (KATSETOS et al., 2013).

1.3 Papel da disfunção mitocondrial na fisiopatologia das distrofias musculares

Para compreendermos as alterações mitocondriais nas distrofias musculares, é importante rever alguns conceitos básicos sobre o assunto. A mitocôndria é a organela responsável pela produção de energia celular através da síntese de Adenosina Trifosfato (ATP). É composta por duas membranas, uma externa e outra interna onde se localiza a cadeia respiratória responsável pela geração de ATP (FREY, MANNELLA, 2000). Na membrana mitocondrial interna se localizam os complexos enzimáticos da cadeia respiratória e a ATP sintase, que realizam o processo de fosforilação oxidativa, via final de geração de ATP na organela. Os complexos enzimáticos I ao IV atuam como cadeia transportadora de elétrons e o complexo V produz ATP (KATSETOS et al., 2013). O complexo I (NADH-ubiquinona óxido-redutase) promove a oxidação da coenzima NADH, adquirindo 2 e^- e bombeando 4H $^+$ para o espaço intermembranas; o complexo II (succinato-ubiquinona óxido-redutase) promove a oxidação da coenzima FADH $_2$ e adquire 2 e^- , porém não atua como uma bomba de prótons. Nessa etapa, ocorre a transferência dos elétrons dos complexos I e II para o complexo III (citocromo bc $_1$ ou ubiquinona-citocromo *c* óxido-redutase) pela coenzima Q (CoQ $_{10}$ ou ubiquinona). Deste ponto em diante, o complexo III realiza o bombeamento de 4H $^+$ e transfere os elétrons recebidos da CoQ para o complexo IV (citocromo *c* oxidase, COX), o qual realiza o bombeamento de 2H $^+$ e catalisa a redução do oxigênio em duas moléculas de água. A energia liberada pela passagem dos elétrons dos complexos I, III e IV promove a transferência de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico, o qual será utilizado para produção de ATP através do complexo V ou ATP sintase (LENAZ et al., 2007).

A coenzima Q é uma molécula lipofílica móvel presente nas membranas celulares, em abundância na membrana interna mitocondrial, cuja principal função é o transporte de elétrons dos complexos I e II para o complexo III da cadeia respiratória. Outras funções desempenhadas pela CoQ são: ação antioxidante contra os excessos de radicais oxidativos; regulação da atividade dos poros de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial e cofator das proteínas desacopladoras (MILES et al., 2005; QUINZII et al., 2006; SPURNEY et al. 2011). A CoQ é sintetizada na mitocôndria, sendo constituída por um anel de benzoquinona ligado a uma cadeia de poliprenil com

unidades de repetição variáveis no comprimento, dependendo dos diferentes organismos vivos. Em humanos, a cadeia de poliprenil apresenta 10 unidades de repetição (CoQ₁₀); em camundongos, nove unidades de repetição (CoQ₉); em leveduras, seis unidades de repetição (CoQ₆) (ACOSTA et al., 2016). Os mecanismos envolvidos na biossíntese de CoQ não foram completamente descritos (KAWAMUKAI, 2009). Na cadeia respiratória, pode ser encontrada em sua forma oxidada (ubiquinona), parcialmente reduzida (ubisemiquinona) e totalmente reduzida (ubiquinol) (LENAZ et al., 2007; KAWAMUKAI, 2009). No plasma sanguíneo humano é encontrada principalmente em sua forma reduzida ubiquinol, atuando como um antioxidante eficaz (KAWAMUKAI, 2009).

As mutações nos genes humanos envolvidos na biossíntese de CoQ₁₀ levam à deficiência primária da coenzima, podendo ocasionar distúrbios mitocondriais clinicamente heterogêneos. A deficiência secundária pode estar associada a genes que não participam da via biossintética dessa coenzima ou devido a causas não genéticas, gerando uma diminuição dos níveis de CoQ nos tecidos. A ocorrência de desordens por deficiência secundária de CoQ₁₀ é mais frequente, o que pode sugerir uma facilidade no comprometimento de sua biossíntese (ACOSTA et al., 2016). Encefalomiopatia, ataxia cerebelar e síndrome de Leigh são algumas das desordens que podem ser associadas a baixos níveis de CoQ₁₀ (QUINZII, DIMAURO, HIRANO, 2007).

Os efeitos da carência de CoQ₁₀ em humanos não são totalmente elucidados. No entanto, é de conhecimento que os níveis reduzidos de CoQ₁₀ na cadeia respiratória interrompem o fluxo de equivalentes redutores do complexo III, gerando diminuição da síntese de ATP e aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O excesso de ERO pode causar danos em constituintes celulares como lipídios, proteínas e DNA, e tem sido associado a uma variedade de doenças degenerativas (KOWALTOWSKI et al., 2009). Além disso, em consequência dos elevados níveis de ERO, tecidos com alta demanda energética, tais como os tecidos muscular, cardíaco e nervoso, são afetados e se tornam mais suscetíveis aos danos oxidativos (QUINZII et al., 2006).

Poucos estudos evidenciam deficiência da CoQ₁₀ em pacientes com DMC. MILES et al. (2005) estudaram os níveis de CoQ muscular e as mudanças do estado redox celular associados a alterações patológicas em 47 biópsias musculares de uma população pediátrica. As biópsias foram estratificadas em cinco grupos: grupo I (controle) sem evidências de achados patológicos; grupo II com predominância de

fibras do tipo 1; grupo III com predominância de fibras do tipo 2; grupo IV com doenças do neurônio motor inferior; grupo V com distrofia muscular, dos quais dois pacientes apresentavam DMC, dois distrofia muscular congênita e um distrofia muscular de Becker. Todos os participantes apresentavam idade até 16 anos. Foram analisadas as concentrações de ubiquinol-10, ubiquinona-10, CoQ₁₀ total, CoQ₉ e concentração total de CoQ por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados indicaram níveis de ubiquinona-10, CoQ₁₀ total e concentração total de CoQ significativamente reduzidos no grupo 5 em comparação aos demais. Além disso, esse grupo também apresentou aumento na relação redox celular, possivelmente como resultado de uma resposta compensatória antioxidante. Com isso, os resultados sugeriram que os níveis de CoQ estão associados a alterações patológicas em biópsias de pacientes com distrofia muscular.

Em um estudo realizado em nosso laboratório, foi avaliada a atividade da CoQ₁₀ e dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em fragmentos de biópsia muscular de 32 pacientes com DMD. Para estimar a concentração da CoQ₁₀, foi realizada a técnica de cromatografia líquida de alta performance de fase reversa; para estimar a atividade das enzimas da cadeia respiratória, foram realizadas técnicas espectrofotométricas. Os resultados indicaram deficiência significativa da CoQ₁₀ nos fragmentos de biópsia muscular. As atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, quando analisados isoladamente, não apresentaram deficiência. Contudo, foi observada redução significativa da atividade dos complexos II + III consequente à deficiência da CoQ₁₀. Logo, foi concluído haver uma deficiência secundária significativa de CoQ₁₀ em pacientes com DMD (em fase de elaboração) ¹.

Além de marcador bioquímico, a CoQ₁₀ vem sendo utilizada como suplemento nutricional e como medicamento no tratamento das doenças mitocondriais e de outros distúrbios tais como distrofias musculares, cardiomiopatia, diabetes, doença de Parkinson e Alzheimer (LITTARRU, LANGSJOEN, 2007; WINKLER-STUCK et al., 2004). Um ensaio duplo cego de suplementação oral de CoQ₁₀, controlado com placebo, foi realizado em um grupo de 12 pacientes com idade entre 7 e 69 anos, que incluiu as distrofias musculares de Duchenne, Becker e cinturas, distrofia miotônica, doença de Charcot-Marie-Tooth e doença de Kugelberg-Welander. Após o período de tratamento de três meses, quatro dos oito pacientes (50%) que receberam CoQ₁₀ registraram melhor

¹ OKAMA, L. O.; ESCARSO, S. H. A.; MARANHO, D. A. C.; HIRANO, M.; SOBREIRA, C. F. R. Mitochondrial function in skeletal muscle from patients with Duchenne muscular dystrophy. Em preparação.

desempenho físico e metabólico; três dentre os quatro pacientes tratados inicialmente com placebo melhoraram após receberem tratamento com CoQ₁₀. Os resultados benéficos da terapia apontaram que a suplementação de CoQ₁₀ pode ser importante na redução dos sintomas das doenças musculares (FOLKERS, SIMONSEN, 1995). Um estudo piloto prospectivo observou o efeito terapêutico da reposição oral de CoQ₁₀ em uma amostra de 12 meninos afetados pela DMD, com idades entre 5 e 10 anos. Todos os pacientes realizavam tratamento com esteroides há pelo menos seis meses. As doses de CoQ₁₀ foram ajustadas até atingirem o nível sérico de 2,5µg/ml e, posteriormente, os pacientes foram seguidos por um período de avaliação de 6 meses. Apesar da pequena amostra de indivíduos e do curto tempo de acompanhamento, os autores observaram melhora da força muscular, reforçando o potencial terapêutico dessa coenzima (SPURNEY et al., 2011). Outros estudos corroboram os efeitos positivos da CoQ₁₀ em doenças neuromusculares e no tratamento das manifestações clínicas associadas à DMD (QUINZII et al., 2006; SALEHI et al., 2017). No entanto, ainda são necessários maiores esclarecimentos quanto à resposta clínica à suplementação de CoQ₁₀.

As disfunções mitocondriais referidas nas DMC, geralmente como dano secundário, são descritas por poucos estudos até o momento, pois as razões que envolvem tais disfunções permanecem pouco compreendidas. Embora as mutações dos genes envolvidos nas DMC não apresentem uma relação direta com o metabolismo mitocondrial, as disfunções mitocondriais têm sido caracterizadas como achados patológicos, principalmente nas DMC2B e DMC2A (LIU et al., 2015; VINCENT et al., 2016).

Yamamoto et al. (1989) foram os primeiros a descrever fibras com atividade da COX ausente em uma variedade de doenças neuromusculares, além das miopatias mitocondriais. Ao analisar 22 biópsias de pacientes com DMC, três apresentaram deficiência focal da COX e uma apresentou fibras vermelhas rasgadas, que indicam proliferação mitocondrial anormal. Processo degenerativo e repetidos ciclos de regeneração, que ocorrem nas doenças musculares crônicas degenerativas, podem estar envolvidos na indução de anormalidades mitocondriais nas células satélites, já que o número de células satélites com deficiência da COX aumenta com a progressão da doença. Os autores concluíram que a deficiência da COX nas fibras não é uma característica patológica específica de miopatias mitocondriais, podendo ser resultado de um evento secundário em uma variedade de doenças neuromusculares.

Bisceglia et al. (2010), ao estudarem uma família com 11 membros afetados por DMC autossômica dominante, encontraram em duas biópsias musculares sinais sugestivos de defeitos na fosforilação oxidativa e deleções no DNA mitocondrial. Os autores consideraram as deleções no DNA mitocondrial decorrentes da disfunção mitocondrial de significância desconhecida. As análises histoquímicas indicaram acúmulo subsarcolemal de mitocôndrias na reação para succinato desidrogenase (SDH) e presença de fibras COX negativas.

Evidências bioquímicas de defeitos na cadeia respiratória mitocondrial têm sido demonstrados em pacientes com mutação no gene da disferlina (*DYSF*). Liu et al. (2015) foram os primeiros a descrever anormalidades bioquímicas mitocondriais em pacientes com disferlinopatia através da quantificação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória. Em uma análise retrospectiva de nove casos com mutação no gene *DYSF*, sendo seis com fenótipo de DMC e três com fenótipo de miopatia distal de Miyoshi, as atividades enzimáticas dos complexos I, III e IV apresentaram redução de 21%, 18% e 40%, respectivamente. Foram observadas entre 1 e 5% de fibras vermelhas rasgadas e entre 1 e 10% de fibras com deficiência da COX nos indivíduos com disferlinopatia. Esses resultados foram comparados com um grupo controle, composto por quatro indivíduos com DMD e quatro indivíduos com distrofia muscular de Becker. Não foram observadas fibras vermelhas rasgadas ou com deficiência da COX no grupo controle. Os autores concluíram que as anormalidades mitocondriais foram fenômenos comuns em pacientes com disferlinopatia, as quais possivelmente podem causar efeitos na progressão da doença.

Vincent et al. (2016) investigaram a expressão dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória nas fibras musculares pacientes com mutação no gene da disferlina, assim como a associação dessas mutações com alterações da homeostase do cálcio. Mutação no gene *DYSF* altera a ação da disferlina no reparo da membrana, o que pode gerar aumento do influxo de cálcio mitocondrial. Quando os níveis de cálcio se tornam muito altos, pode ocorrer fissão mitocondrial, levando à sua fragmentação (HAN et al., 2008). Portanto, alteração dos níveis de cálcio também pode afetar a função mitocondrial. As mitocôndrias desempenham papel relevante na regulação do cálcio citosólico, podendo armazenar cálcio de forma transitória para posteriormente liberá-lo, segundo os estímulos celulares. O trabalho de Vincent et al. (2016) utilizou o método de imunofluorescência quádrupla para avaliar os níveis dos complexos I e IV relativo à massa mitocondrial em oito biópsias musculares, das quais seis eram de pacientes com

disferlinopatia e dois de pacientes com miopatia distal de Miyoshi. Os resultados indicaram maior deficiência dos complexos I e IV em alguns pacientes com disferlinopatia em comparação com o grupo controle pareado por idade. A deficiência do complexo I foi maior que a do complexo IV na maioria dos pacientes. Os autores sugerem que a maior porcentagem de deficiência da expressão dos complexos I e IV em pacientes, comparados aos controles, pode ser secundária à elevada concentração de cálcio citosólico, a qual surge devido aos defeitos no reparo da membrana. Portanto, nos pacientes com disferlinopatia, a ausência da disferlina funcional pode gerar anomalias mitocondriais.

Excesso de ERO produzidas pelo estresse oxidativo também pode estar envolvido na manifestação da disferlinopatia. Os danos causados pelo estresse oxidativo podem afetar tanto macromoléculas celulares, como também cadeias laterais de proteínas tiol presentes na miofibrila. As cadeias laterais de tiol são sensíveis à oxidação e estão envolvidas no mecanismo de contração muscular. Logo, o excesso de estresse oxidativo pode alterar o ciclo de pontes cruzadas e gerar fraqueza muscular (BISWAS, CHIDA, RAHMAN, 2006; PAULSEN, CARROLL, 2010). As ERO estão envolvidas na patogênese de inúmeras distrofias, incluindo a DMD (RANDO, 2002). Na DMD, o estresse oxidativo parece exacerbar a doença, já que testes pilotos apresentaram melhora clínica após o uso de drogas antioxidantes como a CoQ₁₀ (SPURNEY et al., 2011). Terril et al. (2013) analisaram medidas de estresse oxidativo em músculos de camundongos A/J com ausência de disferlina, de camundongos mdx com ausência de distrofina e de camundongos do tipo selvagem (grupo controle). Os autores observaram resultados significativos por meio das medidas de oxidação de grupos tióis de proteínas e dos níveis de lipofuscina. A oxidação de proteínas tiol foi maior nos músculos psoas e quadríceps de camundongos A/J de 8 e 12 meses e de camundongos mdx de 3 meses, quando comparados ao grupo controle. Animais A/J de 19 meses apresentaram aumento mais significativo da oxidação de tiol. O acúmulo de lipofuscina foi elevado em camundongos A/J de 3 meses de idade, sendo maior nos camundongos com idade mais avançada. Os níveis elevados da oxidação de proteína tiol nos músculos proximais de espécies com ausência de disferlina correlacionaram-se com a manifestação da disferlinopatia; as medidas de estresse oxidativo aumentaram com a progressão da idade. Os níveis elevados de lipofuscina nos camundongos com 3 meses de idade são indicativos de estresse oxidativo precoce na manifestação da disferlinopatia.

Anormalidades mitocondriais na calpainopatia foram referidas em um estudo de modelo experimental animal e em humanos (KRAMEROVA et al., 2009; NILSSON et al., 2014). Para investigar a DMC2A devido à mutação no gene da calpaína (*CAPN3*), foram utilizados modelos de camundongos com deficiência de calpaína (C3KO) para o estudo de disfunções mitocondriais associadas à calpainopatia. Análises morfológicas e bioquímicas foram realizadas e comparadas com um grupo controle de camundongos do tipo selvagem. Os resultados observados nas espécies C3KO foram: alteração da estrutura e da distribuição das mitocôndrias, aumento da atividade da citrato sintase, redução da produção de ATP mitocondrial *in vivo* e aumento do estresse oxidativo. Os achados foram caracterizados como eventos secundários à ausência de calpaína nos músculos desses animais. As disfunções mitocondriais encontradas no estudo foram consideradas características patogênicas da calpainopatia (KRAMEROVA et al., 2009). Alterações na estrutura, na distribuição mitocondrial e danos oxidativos também foram encontrados em pacientes com DMC2A (KAWAI et al., 1998; CHAE et al., 2001).

Resultados diferentes foram observados nos estudos de Nilsson et al. (2014), pois não foram observadas alterações da cadeia respiratória mitocondrial em pacientes com DMC2A. Em uma amostra de 14 pacientes, todos com fenótipo considerado DMC2A, foram realizadas análises sobre os danos oxidativos e as atividades do complexo I+III, da COX e da citrato sintase. Os achados foram comparados com um grupo controle de idade pareada. Os resultados demonstraram redução dos mecanismos de defesa antioxidante, com alteração do equilíbrio redox principalmente em compartimentos não mitocondriais. A presença de danos oxidativos devido à mutação da *CAPN3* está em conformidade com estudos prévios. Com relação à função mitocondrial, as atividades do complexo I+III, da COX e da citrato sintase não foram diferentes do grupo controle. No entanto, os pacientes apresentaram redução da produção de ATP devido a alterações do complexo V (ATP sintase). Os autores concluíram que, embora o tamanho amostral do estudo fosse pequeno, os resultados indicaram que a disfunção mitocondrial parece não ser uma característica comum a todos os pacientes com DMC2A.

Em razão dos sinais de disfunção mitocondrial serem pouco investigados em tamanhos amostrais maiores, são necessários mais estudos para um maior esclarecimento do acometimento mitocondrial nas DMC.

Embora a terapia gênica esteja sendo desenvolvida, uma vez desencadeado o processo degenerativo, uma abordagem terapêutica voltada para a correção do defeito

primário deverá ser acompanhada da correção dos eventos secundários, para maior êxito da terapia. Portanto, a caracterização da disfunção metabólica deve contribuir para melhor compreensão dos processos fisiopatológicos relacionados à DMC e para uma abordagem terapêutica mais eficaz.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Análise da CoQ₁₀ e da cadeia respiratória mitocondrial em fragmentos de músculo esquelético de pacientes com DMC.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificação da CoQ₁₀ em fragmentos do músculo esquelético de pacientes com DMC;
- Quantificação da atividade enzimática de cada complexo da cadeia respiratória isoladamente;
- Quantificação da atividade dos complexos II+III em conjunto como avaliação indireta da CoQ₁₀;
- Análise da relação entre o grau de disfunção mitocondrial e a área relativa de fibras musculares presentes no mesmo fragmento muscular;
- Correlação da função mitocondrial com a faixa etária do paciente no momento que foi realizada a biópsia muscular e com a idade de início dos sintomas e o tempo de evolução da doença.

3. HIPÓTESES DO ESTUDO

A partir dos achados encontrados no estudo realizado em pacientes com distrofia muscular de Duchenne, este estudo foi elaborado para testar as seguintes hipóteses:

- há disfunção mitocondrial nos pacientes com DMC, com acometimento predominante da CoQ₁₀;
- tal disfunção, embora decorra do processo degenerativo crônico das distrofias musculares de uma forma geral, não resulta da perda de fibras musculares em si;
- a disfunção mitocondrial é maior quanto maior o tempo de evolução da doença, não havendo uma relação estreita com a idade do paciente propriamente dita.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico, elaborado para avaliar a CoQ₁₀ e a cadeia respiratória em pacientes com DMC atendidos no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP).

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP-USP.

O projeto de pesquisa intitulado “Avaliação quantitativa da função mitocondrial no músculo esquelético de pacientes com distrofia muscular de cinturas” 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 449^a Reunião Ordinária, de acordo com o processo n° 2167/2017 (ANEXO A).

4.1 CASUÍSTICA

Participaram do estudo 21 pacientes com DMC atendidos no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-FMRP-USP, submetidos à biópsia muscular durante o processo de rotina de investigação diagnóstica entre os anos de 2000 e 2017. O grupo controle foi formado por 9 indivíduos que também foram atendidos no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-FMRP-USP, os quais apresentaram biópsias musculares consideradas normais ou sem alterações significativas. Os pacientes e/ou responsáveis que participaram do estudo, ao receberem informações sobre a pesquisa e seus objetivos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente aprovado pelo Comitê de Ética do HC-FMRP, autorizando a análise do prontuário e o uso da biópsia muscular para o estudo (APÊNDICE A – pacientes, APÊNDICE B- controles).

4.1.1. Grupo de pacientes

Os critérios de inclusão e de exclusão para este grupo estão apresentados a seguir.

Critérios de inclusão:

- pacientes com fraqueza muscular progressiva de início após os primeiros meses de vida, níveis séricos elevados da enzima CK e biópsia muscular evidenciando padrão distrófico com perda de fibras musculares e/ou teste molecular com mutação em gene relacionado a uma das distrofias musculares de cinturas;
- apresentar fragmento de biópsia de músculo esquelético armazenado em nitrogênio líquido;
- aceitação voluntária em participar do estudo.

Critérios de exclusão:

- quantidade insuficiente de biópsia de músculo armazenada;
- identificação de distrofinopatia.

4.1.2 Grupo controle

Os critérios de inclusão e de exclusão para este grupo estão apresentados a seguir.

Critérios de inclusão:

- pacientes submetidos à biópsia muscular durante o procedimento de rotina de investigação diagnóstica neste hospital, cujas biópsias musculares tenham sido normais ou sem alterações significativas;
- apresentar fragmento de biópsia de músculo esquelético armazenado em nitrogênio líquido;
- aceitação em participar do estudo.

Critérios de exclusão:

- quantidade insuficiente de biópsia de músculo armazenada;
- diagnóstico de doença neuromuscular degenerativa ou metabólica.

4.2 MÉTODOS**4.2.1 Dados demográficos**

Os dados clínicos relacionados à idade na ocasião da realização da biópsia muscular, idade de início dos sintomas e tempo de evolução da doença foram obtidos por meio do prontuário médico.

4.2.2 Biópsia muscular

Amostras dos músculos bíceps braquial, deltoide ou quadríceps foram coletadas durante o processo de rotina de investigação diagnóstica. Em seguida, os fragmentos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenados em nitrogênio líquido, que mantém as amostras em temperatura inferior a -196°C . Neste estudo, foi utilizado um fragmento longitudinal da biópsia de cada paciente, o qual foi seccionado transversalmente em dois fragmentos consecutivos para a realização de morfometria e dosagem da CoQ_{10} . Um terceiro fragmento, consecutivo aos anteriores, foi utilizado para os ensaios enzimáticos da cadeia respiratória em 15 dos pacientes. Nos seis pacientes restantes, os ensaios enzimáticos da cadeia respiratória foram realizados em um terceiro fragmento não consecutivo, em decorrência do tamanho dos fragmentos disponíveis.

4.2.3 Análise morfométrica

Para determinar a área relativa de fibras musculares nos fragmentos de biópsia utilizados no estudo, foi realizada análise morfométrica com a determinação da área ocupada por fibras musculares em relação à área transversal total do fragmento muscular. Foram realizados cortes histológicos transversais do músculo esquelético congelado, os quais foram corados com hematoxilina e eosina para identificação das fibras musculares e dos tecidos conjuntivo e adiposo. Imagens digitalizadas desses cortes de tecido muscular foram obtidas utilizando o sistema de análise de imagens Axiovision Release 4.8. A morfometria das imagens foi realizada através do programa de processamento de imagens de domínio público, criado pelo *National Institute of Health* (NIH), denominado Image-J.

As fibras musculares foram circundadas uma a uma para obtenção da área transversal das fibras. A área total do fragmento muscular foi obtida circundando-se todo o contorno do fragmento. O cálculo da área relativa ocupada pelas fibras

musculares foi realizado por meio da somatória da área transversal de cada fibra, dividida pela área transversal total do fragmento.

4.2.4 Quantificação da CoQ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular

A quantificação da CoQ₁₀ no músculo esquelético foi realizada em homogeneizados de tecido muscular congelado, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de fase reversa. Foi realizada a pesagem e a homogeneização do fragmento muscular em quantidade suficiente de água destilada para um volume de 750µl na presença de 0,25µg/ml de CoQ9 e 50 mM de dodecilsulfato de sódio (250 µl de SDS 200mM). Para a extração da CoQ₁₀ utilizou-se 90% de 1-propanol, homogeneizando vigorosamente a solução por 1 minuto. Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 14000xg a 4°C durante cinco minutos. A análise do sobrenadante foi realizada no equipamento Dionex Ultimate 3000 acoplado ao sistema de detecção eletroquímica Coulochem III, ambos da marca Thermo Scientific (NAINI et al., 2003). As análises foram realizadas utilizando o software Chromeleon 7, que permite controlar instrumentos, avaliar os resultados e realizar backup dos dados.

4.2.5 Análise da atividade das enzimas da cadeia respiratória

Para quantificação objetiva da atividade de cada um dos complexos da cadeia respiratória de forma isolada, assim como dos complexos II+III em conjunto, foram realizados ensaios enzimáticos utilizando técnicas espectrofotométricas.

O fragmento de músculo esquelético congelado foi pesado para obtenção de um homogeneizado na concentração de 10% (peso/volume) e colocado em um volume apropriado de meio contendo 50 mM de Tris-HCl e 150 mM de cloreto de potássio (KCl) no pH 7,5. Em seguida, o fragmento, mantido constantemente em banho de gelo, foi submetido à homogeneização em equipamento homogeneizador do tipo Turrax (PowerGen 125 Tissue Homogenizer, marca Fisher Scientific). Foi utilizado um espectrofotômetro à temperatura de 30°C para quantificação das atividades da enzima da cadeia respiratória: nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) - ubiquinona redutase (complexo I), succinato desidrogenase (SDH) (complexo II), ubiquinol-

citocromo *c* redutase (complexo III), succinato-citocromo *c* redutase (complexos II+III) e citocromo *c* oxidase (COX) (complexo IV), além da enzima da matriz mitocondrial citrato sintase (DIMAURO et al., 1987; BIRCH-MACHIN et al., 1994; SRERE, 1969).

A atividade dos complexos II+III em conjunto foi obtida por meio da monitorização da redução do citocromo *c* a 550 nm em tampão de reação contendo 50 mM de fosfato de potássio, 3 mM de succinato, 0,5 mM de cianeto de potássio (KCN) e 0,1 mM de citocromo *c*.

As atividades obtidas foram corrigidas de acordo com o peso do fragmento, expressas em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tecido, e em relação à atividade da citrato sintase, uma medida estimada da massa mitocondrial.

4.3 Análise estatística

Os dados obtidos no estudo foram representados através da média, como medida de tendência central, e do desvio padrão, como medida de variabilidade. Foram também apresentados os valores mínimo e máximo para indicar a faixa de variação dos valores.

A comparação dos resultados obtidos para os pacientes e controles, incluindo a idade na realização da biópsia, os dados morfométricos, a dosagem de CoQ₁₀ e as atividades enzimáticas da cadeia respiratória e da citrato sintase, foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes, pois a maioria dos dados não apresentou distribuição normal. Foi realizada também análise comparativa considerando o grupo de pacientes com deficiência de disferlina, os demais pacientes com DMC e os controles, através do teste de Kruskal-Wallis.

A correlação entre a dosagem de COQ₁₀ e os parâmetros demográficos, a área relativa de fibras musculares e os ensaios enzimáticos foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman.

A magnitude da correlação foi estabelecida de acordo com a classificação proposta por Ajzen (1998): $\leq 0,20$ muito baixa; 0,21 - 0,40 baixa; 0,41 - 0,60 moderada; 0,61 - 0,80 alta e 0,81 - 1,0 muito alta.

O nível de significância considerado no estudo foi de $p < 0,05$.

O programa estatístico utilizado para realização das análises foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0.

5. RESULTADOS

5.1.1 Casuística

Participaram deste estudo 30 indivíduos, sendo 21 pacientes com DMC e 9 controles. O grupo de pacientes com DMC foi constituído por 9 pacientes com diagnóstico de um dos subtipos de DMC e de 12 pacientes para os quais não foi possível determinar o tipo específico de DMC, sendo estes agrupados como indefinidos (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização do diagnóstico dos pacientes com DMC.

DMC	N (%)
DMC2A	1 (5%)
DMC2B	6 (28%)
DMC2G	1 (5%)
DMC2L	1 (5%)
DMC indefinidos	12 (57%)
DMC total	21
Controles	9

N= número de indivíduos.

O diagnóstico molecular dos pacientes que apresentaram alterações no sequenciamento genético está descrito na Tabela 4. Observamos predominância de pacientes com deficiência de disferlina entre os subgrupos identificados de DMC, o que permitiu análise adicional com a comparação de três grupos: pacientes com DMC2B, pacientes com demais DMC e grupo controle.

Tabela 4. Caracterização do diagnóstico molecular dos pacientes com DMC.

Subtipos	Gene	Zigosidade	Mutação 1	Mutação 2
DMC2A	<i>CAPN3</i>	heterozigoto duplo	exon3: c.412dupC; p.Leu138Pro fs*15; patogênica	exon13: c.1711delC; p.Leu571Ser fs*24; patogênica
DMC2B	<i>DYSF</i>	heterozigoto duplo	exon37: c.4003G>A; p.Glu1335Lys; significado incerto	exon50: c.5594delG; p.Gly1865Ala fs*101; patogênica
DMC2B	<i>DYSF</i>	homozigoto	exon48: c.5429G>A; p.Arg1810Lys; patogênica	
DMC2B	<i>DYSF</i>	homozigoto	exon28: c.2960G>A; p.Trp999*; patogênica	
DMC2B	<i>DYSF</i>	heterozigoto duplo	exon27: c.2875C>T; p. Arg959Trp; significado incerto	exon48: c.5429G>A; p. Arg1810Lys; patogênica
DMC2B	<i>DYSF</i>	homozigoto	exon52: c.5836_5839del; p.Gln1946Trp fs*19 ; patogênica	
DMC2B	<i>DYSF</i>	homozigoto	exon48: c.5429G>A; p.Arg1810Lys; patogênica	
DMC2G	<i>TCAP</i>	homozigoto	exon2: c.157C>T; p.Gln53*; patogênica	
DMC2L	<i>ANO5</i>	homozigoto	exon4: c.172C>T; p. Arg58Trp; patogênica	

CAPN3=gene da capáina; *DYSF*=gene da disferlina; *TCAP*=gene da teletonina; *ANO5*=gene da Anoctamina-5; dup=duplicação; del=deleção; fs= do inglês *frame shift*, indicando alteração na matriz de leitura;*=código de parada prematuro; Arg=arginina; Ala=alanina; Gly=glicina; Gln=glutamina; Glu=glutamato; Leu=leucina; Lys=lisina; Pro=prolina; Ser=serina; Trp=triptofano.

Na Tabela 5 estão apresentados os dados relativos ao gênero, à idade no momento da biópsia muscular, à idade de início dos sintomas e ao tempo de evolução da doença. Quando comparadas, as idades dos pacientes e controles no momento de realização da biópsia muscular apresentaram similaridade. Também não observamos diferença significativa quando comparadas as idades na biópsia dos pacientes com DMC2B (n=6), demais pacientes com DMC (n=15) e controles ($p=0,60$). Não houve diferença significativa na idade de início dos sintomas ($p=0,06$) e tempo de evolução da doença ($p=0,33$) entre os grupos com DMC2B e demais DMC.

Tabela 5. Caracterização dos grupos de pacientes e controles

DMC	Sexo (M/F)	Idade na biópsia (anos) Média ± DP Mín – Máx	Idade de início dos sintomas (anos) Média ± DP Mín – Máx	Tempo de evolução da doença (anos) Média ± DP Mín – Máx
DMC2B (n=6)	3M/3F	34,7 ± 12,3 23-54	27,0 ± 9,3 13-40	7,7 ± 7,1 2-21
DMC (n=15)	7M/8F	28,9 ± 11,7 9-55	16,7 ± 10,3 2-36	12,1 ± 10,9 2-41
DMC total (n=21)	10M/11F	30,5 ± 11,9 9-55	19,7 ± 10,9 2-40	10,9 ± 10,0 2-41
Controles (n=9)	5M/4F	29,6 ± 16,9 8-58	-	-
P*	-	0,67	-	-

* comparação entre grupo total de pacientes e controles; n= número de participantes; M=masculino; F=feminino; DP= desvio padrão; Mín= mínimo valor encontrado; Máx= máximo valor encontrado.

5.1.2 Quantificação de CoQ₁₀ em fragmentos de biópsia muscular

Foram analisados, para quantificação de CoQ₁₀, fragmentos de músculo esquelético de 21 pacientes com DMC e 9 controles, sendo os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Quantificação de CoQ₁₀ nas biópsias musculares.

Quantificação de CoQ₁₀ (µg/g de tecido)	Média ± DP	Mín-Máx
DMC2B (n=6)	21,0 ± 13,1	4,7 – 38,1
DMC (n=15)	16,6 ± 7,4	6,3 – 31,6
DMC total (n=21)	17,9 ± 9,2	4,7 – 38,1
Controles (n=9)	29,5 ± 4,4	23,1 – 37,4
P*	0,002	-

* comparação entre grupo total de pacientes e controles; n= número de participantes; DP= desvio padrão; Mín= mínimo valor encontrado; Máx= máximo valor encontrado.

Os resultados demonstraram valores significativamente menores de CoQ₁₀ na biópsia muscular de pacientes com DMC em comparação com os controles. Ao comparar o grupo de pacientes com DMC2B (n=6), demais pacientes com DMC (n=15) e controles, observamos que a deficiência de CoQ₁₀ foi similar entre os pacientes com DMC2B e demais pacientes com DMC ($p=0,27$), porém ambos os grupos foram diferentes quando comparados ao grupo controle ($p=0,005$) segundo o teste Student-Newman-Keuls.

5.1.3 Correlação da CoQ₁₀ com parâmetros clínicos

A correlação da dosagem da CoQ₁₀ e dos parâmetros clínicos de pacientes com DMC estão apresentados na Tabela 7. Os resultados demonstraram não haver uma correlação da quantificação de CoQ₁₀, idade no momento da biópsia, idade de início dos sintomas e tempo de evolução da doença, segundo o coeficiente de correlação de Spearman.

Tabela 7. Correlação da dosagem de CoQ₁₀ com parâmetros clínicos dos pacientes.

	Idade no momento da biópsia <i>r (p)</i>	Idade de início dos sintomas <i>r (p)</i>	Tempo de evolução da doença <i>r (p)</i>
CoQ ₁₀ (pacientes)	0,32 (0,15)	0,18 (0,42)	0,07 (0,78)
CoQ ₁₀ (controles)	0,13 (0,73)	-	-

* r = coeficiente de correlação de Spearman.

5.1.4 Relação entre a dosagem de CoQ₁₀ e a área relativa de fibras musculares

Como a deficiência de CoQ₁₀ nas biópsias musculares dos pacientes com DMC pode estar associada à perda de fibras musculares decorrente do processo degenerativo da doença, foi analisada a relação da dosagem de CoQ₁₀ com a área relativa das fibras musculares nos fragmentos de biópsia.

Através da morfometria, foi quantificada a perda de fibras musculares por meio do cálculo da área relativa de fibras musculares, isto é, a relação entre a área ocupada por fibras musculares e a área total do fragmento da biópsia muscular. Essa análise foi realizada em 21 pacientes com DMC e 2 controles representativos. A seguir, as figuras

2 a 4 demonstram as diferenças histológicas encontradas nos pacientes com DMC e no grupo controle, sendo observada uma perda significativa de fibras musculares nos pacientes com DMC.

Figura 2. Fragmento de biópsia do músculo bíceps de um paciente com DMC aos 25 anos de idade. A área ocupada por fibras musculares corresponde a 71,8% da área transversal total do fragmento. Neste fragmento é possível observar variação do diâmetro das fibras com presença de fibras atroficas, fibras em segmentação e aumento do tecido conjuntivo.

Figura 3. Fragmento de biópsia do músculo bíceps de um paciente com DMC aos 23 anos de idade. A área ocupada por fibras musculares corresponde a 43,3% da área transversal total do fragmento. Neste fragmento é possível observar variação do diâmetro das fibras com presença de fibras atróficas e aumento do tecido conjuntivo.

Figura 4. Fragmento de biópsia do músculo bíceps braquial de um paciente controle aos 18 anos de idade. A área ocupada por fibras musculares corresponde a 77% da área transversal total do fragmento. Neste fragmento é possível observar uma pequena variação do diâmetro das fibras e a distribuição normal do tecido conjuntivo.

A média da área ocupada por fibras musculares nos pacientes com DMC foi de 58,5% (DP $\pm$ 26,1%), variando de 17,2% a 87%. Para o grupo controle, a média da área ocupada por fibras musculares foi de 76,35% (DP $\pm$ 1,9%), variando de 75% a 77,7%. Análise estatística não demonstrou diferença significativa entre a área relativa de fibras musculares nos grupos com DMC2B e demais DMC ($p=0,94$).

A dosagem de CoQ₁₀ foi realizada em fragmentos consecutivos aos utilizados na análise morfométrica das biópsias dos pacientes com DMC. Análise estatística demonstrou correlação moderada entre a quantidade de CoQ₁₀ e a área relativa ocupada por fibras musculares ($r= 0,57$ e $p= 0,007$), o que poderia indicar que a baixa concentração de CoQ₁₀ nas biópsias musculares de pacientes com DMC fosse uma consequência da perda de fibras musculares. Contudo, ao comparar os resultados individualizados da área relativa das fibras musculares com a quantificação da CoQ₁₀, pudemos observar que alguns pacientes apresentavam discrepância entre a proporção de fibras musculares e a dosagem de CoQ₁₀, tornando provável a existência de deficiência real da coenzima nos fragmentos de biópsia de pacientes com DMC (Tabela 8). Tomando como exemplo o paciente 8, observamos área relativa de fibras musculares relativamente preservada, de 72,3%, e dosagem de CoQ₁₀ reduzida, de 9,25 μ g/g de tecido. Da mesma forma, o paciente 5 apresentou área relativa de fibras de 80%, com dosagem de CoQ₁₀ de 14,61 μ g/g de tecido. Já o paciente 7 apresentou área relativa de fibras de 43,3%, com dosagem de CoQ₁₀ de 34,94 μ g/g de tecido.

Tabela 8. Área relativa de fibras musculares e quantificação da CoQ₁₀ em pacientes com DMC.

Pacientes	Área relativa de fibras musculares (%)	Quantificação de CoQ₁₀ (µg/g de tecido)
1. DMC2A	50	10,91
2. DMC2B	87	38,07
3. DMC2B	72,7	12,72
4. DMC2B	45	21,07
5. DMC2B	80	14,61
6. DMC2B	79,3	22,52
7. DMC2B	43,3	34,94
8. DMC2G	72,3	9,25
9. DMC2L	73,4	17,85
10. DMC	82,5	16,43
11. DMC	19,7	4,66
12. DMC	17,2	7,54
13. DMC	81	31,57
14. DMC	66,6	22,59
15. DMC	52	21,44
16. DMC	71,8	21,32
17. DMC	82,4	24,22
18. DMC	68,4	15,26
19. DMC	17,2	6,35
20. DMC	24,7	7,37
21. DMC	43,4	14,78

Para esclarecer se a redução da CoQ₁₀ era decorrente da perda de fibras musculares ou representava uma deficiência real dessa coenzima, optamos por analisar a atividade dos complexos II+III, para a qual a presença de CoQ₁₀ é essencial. Como a análise da atividade desses complexos pode ser corrigida pela massa mitocondrial, ou seja, pela quantidade de mitocôndrias na amostra, a observação de alteração da atividade indicaria deficiência real da coenzima. A quantidade de mitocôndrias na amostra foi calculada pela atividade da enzima da matriz mitocondrial citrato sintase.

5.1.5 Ensaios enzimáticos da cadeia respiratória

A atividade dos complexos II+III está apresentada na Tabela 9. É possível observar uma alteração significativa da atividade desses complexos nos pacientes com

DMC em comparação com o grupo controle. Esse achado confirma a deficiência real de CoQ₁₀ nas fibras musculares de indivíduos com DMC. Entretanto, ao comparar o grupo de pacientes com DMC2B (n=6), demais pacientes com DMC (n=15) e controles, segundo o teste Student-Newman-Keuls ($p=0,01$), não houve diferenciação adequada entre os grupos, pois os valores dos pacientes com DMC foram semelhantes aos dos pacientes com DMC2B, enquanto que os valores deste último foram semelhantes aos controles.

Tabela 9. A atividade dos complexos II+III da cadeia respiratória em pacientes com DMC. .

Pacientes	CII+III** Média ± DP	CII+III** Mín – Máx
DMC2B (n=6)	0,17 ± 0,09	0,04 – 0,28
DMC (n=15)	0,11 ± 0,08	0,02 – 0,32
DMC total (n=21)	0,12 ± 0,09	0,02 – 0,32
Controles (n= 7)	0,22 ± 0,02	0,17-0,25
P*	0,01	

* comparação entre grupo total de pacientes e controles; **valores relativos à atividade da citrato sintase; C= complexo da cadeia respiratória; DP= desvio padrão; Mín= mínimo valor encontrado; Máx= máximo valor encontrado; n= número de participantes.

Além disso, uma correlação moderada entre a quantidade de CoQ₁₀ e a atividade dos complexos II+III foi observada nos pacientes (Tabela 10). Não foi observada correlação entre as atividades dos complexos II+III e a quantidade de CoQ₁₀ no grupo controle.

Tabela 10. Correlação da dosagem de CoQ₁₀ e atividade dos complexos II+III.

	CoQ₁₀ (pacientes)	CoQ₁₀ (controles)
	r (p)	r (p)
CII+III	0,45 (0,04)	-0,16 (0,72)

r= coeficiente de correlação de Spearman; C=complexo enzimático da cadeia respiratória.

As atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória dos pacientes com DMC e dos controles estão apresentadas na Tabela 11. Os resultados demonstraram que não houve deficiência dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória comparando os pacientes com DMC e o grupo controle. As atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, tanto no grupo de pacientes como nos controles, foram corrigidas pela massa mitocondrial pela relação com a atividade da citrato sintase.

Ao comparar a medida da citrato sintase entre os grupos DMC2B, grupo com demais DMC e grupo controle, os pacientes com DMC2B apresentaram valores de massa mitocondrial reduzidos em comparação aos pacientes com demais DMC e controles ($p=0,01$). Já os pacientes com demais DMC e os controles apresentaram medidas semelhantes pelo teste Student-Newman-Keuls ($p=0,22$).

Quando foram comparadas as atividades dos complexos enzimáticos entre os grupos DMC2B, grupo com demais DMC e grupo controle, não foi observada deficiência enzimática em nenhum dos grupos de pacientes em relação ao grupo controle. As diferenças observadas decorreram de aumento da atividade dos complexos I ($p=0,02$) e III ($p=0,01$) no grupo DMC2B.

Tabela 11. Ensaios enzimáticos da cadeia respiratória e da citrato sintase.

Grupos	CS	CI**	CII**	CIII**	CIV**
	Média $\pm$ DP Mín – Máx	Média $\pm$ DP Mín – Máx	Média $\pm$ DP Mín – Máx	Média $\pm$ DP Mín – Máx	Média $\pm$ DP Mín – Máx
DMC 2B	5,01 $\pm$ 1,85	0,81 $\pm$ 0,29	0,72 $\pm$ 0,30	1,36 $\pm$ 0,52	1,68 $\pm$ 0,64
(n=6)	3,24 - 8,19	0,41 - 1,14	0,50 - 1,30	0,53 - 2,16	0,92 - 2,36
DMC	10,3 $\pm$ 5,08	0,44 $\pm$ 0,19	0,44 $\pm$ 0,28	0,66 $\pm$ 0,33	0,95 $\pm$ 0,46
(n=15)	2,92 - 18,6	0,12 - 0,97	0,17 - 1,09	0,16 - 1,27	0,34 - 1,97
DMC total	8,83 $\pm$ 5,0	0,54 $\pm$ 0,28	0,52 $\pm$ 0,31	0,86 $\pm$ 0,5	1,16 $\pm$ 0,60
(n=21)	2,92 - 18,6	0,12 - 1,14	0,17 - 1,30	0,16 - 2,16	0,34 - 2,36
Controles	13,07 $\pm$ 3,89	0,39 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,14	0,82 $\pm$ 0,16	1,28 $\pm$ 0,10
(n=7)	9,2 - 20,7	0,31 - 0,44	0,35 - 0,76	0,55 - 1,03	1,16 - 1,48
*p	0,07	0,32	0,21	0,69	0,17

Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão; * comparação entre grupo total de pacientes e controles; **valores em relação à atividade da enzima citrato sintase; n= número de participantes; CS = citrato sintase; C = complexo enzimático da cadeia respiratória.

Ao relacionar a atividade da citrato sintase com a dosagem de CoQ₁₀, observamos que houve perda da correlação desses parâmetros no grupo de pacientes com DMC. No grupo controle observa-se uma correlação muito alta entre a atividade da citrato sintase (massa mitocondrial) e a dosagem da CoQ₁₀. Contudo, no grupo de pacientes com DMC o índice de correlação foi baixo, corroborando que o comprometimento da CoQ₁₀ no grupo de pacientes não decorre da perda de massa mitocondrial (Tabela 12).

Tabela 12. Correlação da dosagem de CoQ₁₀ e atividade da citrato sintase.

	CoQ ₁₀ (pacientes)	CoQ ₁₀ (controles)
	<i>r</i> (<i>p</i>)	<i>r</i> (<i>p</i>)
Citrato sintase	0,38 (0,08)	0,82 (0,02)

r= coeficiente de correlação de Spearman.

6. DISCUSSÃO

Os genes envolvidos nas DMC não apresentam um envolvimento direto no metabolismo energético mitocondrial, o que caracteriza as disfunções mitocondriais nas DMC como fenômenos secundários. Contudo, tais disfunções permanecem pouco descritas na literatura. Apesar dos mecanismos envolvidos nas alterações mitocondriais não serem completamente esclarecidos, defeitos bioquímicos têm sido caracterizados como achados patológicos comuns nas DMC (YAMAMOTO et al., 1989; MILES et al. 2005; BISCEGLIA et al., 2010; LIU et al., 2015; VINCENT et al., 2016; NILSSON et al., 2014). Apenas um estudo observou a deficiência de CoQ₁₀ em dois pacientes com DMC através de sua quantificação (MILES et al. 2005). Outros dois estudos prévios referiram deficiência da CoQ₁₀, observada pela melhora dos sintomas clínicos após a administração oral dessa coenzima, em amostras pouco significativas de pacientes com DMC (FOLKERS et al., 1985; FOLKERS, SIMONSEN, 1995). O comprometimento da atividade enzimática da cadeia respiratória, corrigido pela atividade da citrato sintase, foi observado em um estudo prévio (LIU et al., 2015). Contudo, a maior parte dos estudos que realizaram essa análise não observaram alterações da atividade da cadeia respiratória (YAMOTO et al., 1989; FABRIZI et al., 1996; NILSSON et al., 2014). Até o momento, não foram descritos estudos na literatura que analisaram as alterações na cadeia respiratória considerando-se a área relativa de fibras musculares, sendo este um aspecto importante por se tratar de uma doença que resulta em perda de fibras musculares. Portanto, uma análise ampla do metabolismo energético mitocondrial que inclua a quantificação de CoQ₁₀, da atividade enzimática da cadeia respiratória e da perda de área de fibras musculares, considerando-se um tamanho amostral maior, é necessária para uma maior abrangência dos fatores que podem estar envolvidos na disfunção mitocondrial na DMC. Uma melhor compreensão dos eventos secundários na patogênese das DMC é importante para o desenvolvimento de ensaios clínicos que possibilitem novas terapias.

Ensaio com evidências bioquímicas de anormalidades mitocondriais em pacientes com mutações no gene *CAPN3* (DMC2A) e *DYSF* (DMC2B) são os mais descritos em experimentos clínicos. Apesar do grupo de DMC ser heterogêneo, em nosso estudo houve uma predominância de adultos e indivíduos acometidos pelo subtipo DMC2B. Em nossa pesquisa, nove pacientes com diagnóstico definitivo de DMC foram confirmados por sequenciamento genético, o qual foi realizado para os

genes *CAPN3*, *DYSF*, *TCAP* e *ANO5*. Seis pacientes foram caracterizados como homozigotos e três como heterozigotos duplos. Em relação ao subgrupo DMC2B, o sequenciamento do gene *DYSF* encontrou mutações patogênicas que confirmaram o diagnóstico de disferlinopatia.

Parâmetros clínicos como gênero, idade de início dos sintomas e tempo de evolução da doença são bastante variáveis entre os subtipos. Em nossa amostra de pacientes com DMC, houve predomínio de mulheres e de indivíduos que apresentaram idade de início dos sintomas durante a fase adulta. Embora o prognóstico e a progressão da doença sejam variáveis de acordo com os subtipos de DMC, geralmente os pacientes que manifestam os sintomas clínicos na infância apresentam uma progressão mais grave (KANITKAR et al., 2015).

A maioria dos indivíduos que participou do nosso estudo, tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle, foi submetido à biópsia na fase adulta. Para a realização das nossas análises, o tamanho amostral de pacientes e controles foi pequeno, caracterizando uma amostra de conveniência. Tal limitação se deve ao fato da DMC ser uma doença rara e pelo estudo ter sido realizado em um único centro. Portanto, esse estudo foi realizado apenas com os fragmentos de biópsias musculares que possuíam quantidade suficiente armazenada em nosso laboratório. Em nossa amostra de grupo controle, os valores normais foram obtidos em um tamanho amostral reduzido, pois os indivíduos que fizeram parte desse grupo apresentavam biópsia com alterações mínimas, sendo descartadas as doenças degenerativas ou metabólicas. As amostras utilizadas no presente estudo estiveram armazenadas em nitrogênio líquido desde a sua coleta, garantindo que fossem mantidas em temperaturas menores que -196°C. Lampert et al. (2003) relataram que a dosagem de CoQ₁₀ permanece estável mesmo quando as biópsias são armazenadas por tempo prolongado em temperaturas inferiores a -70°C. Adicionalmente, estudo prévio realizado neste laboratório com biópsias musculares de pacientes com DMD não mostrou diferenças entre as amostras antigas e recentes. No referido estudo, foram avaliadas as alterações mitocondriais na patogênese da DMD por meio da quantificação da CoQ₁₀ e da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória. A redução significativa de CoQ₁₀ observada por meio da dosagem direta da coenzima e da atividade dos complexos II+III foi um achado importante². Devido à

² OKAMA, L. O.; ESCARSO, S. H. A.; MARANHÃO, D. A. C.; HIRANO, M.; SOBREIRA, C. F. R. Mitochondrial function in skeletal muscle from patients with Duchenne muscular dystrophy. Em preparação.

possibilidade da deficiência de CoQ₁₀ ser um achado patológico comum a outras distrofias musculares, realizamos análises morfológicas e bioquímicas nos pacientes com diagnóstico de DMC.

Uma característica comum nas distrofias musculares é a degeneração da musculatura esquelética em decorrência dos processos fisiopatológicos. Clinicamente, os pacientes apresentam perda da massa muscular associada à fraqueza e fadiga muscular (SICILIANO et al., 2015). Em decorrência do processo degenerativo, observa-se perda de fibras no tecido muscular esquelético. Por ser um tecido de elevada demanda energética, a função mitocondrial nas fibras musculares é elevada, mas não no tecido conjuntivo que se encontra aumentado nos pacientes com DMC devido à perda de fibras musculares. Portanto, para análise quantitativa da CoQ₁₀, foi considerada a proporção de fibras musculares do fragmento analisado, sendo realizada morfometria do tecido muscular para esse cálculo. Em nossa amostra de pacientes com DMC, o grau de perda de fibras musculares e a substituição por tecido conjuntivo e adiposo foi variável entre os diferentes fragmentos de biópsia muscular. Devido ao processo degenerativo progressivo da doença, é esperada uma perda de fibras musculares. Quanto maior o grau de atrofia e degeneração da fibra muscular, maior o comprometimento clínico da doença, risco para o desenvolvimento de comorbidades e perda da capacidade funcional (ANGELINI et al., 2014).

Para que a quantificação da CoQ₁₀ pudesse ser analisada levando-se em consideração a perda de fibras musculares, os procedimentos foram realizados em cortes consecutivos do mesmo fragmento longitudinal de músculo em que foi realizada a análise morfométrica, para que houvesse uma mesma representação de fibras musculares para essas duas medidas. Nosso grupo controle apresentou uma média de dosagem de CoQ₁₀ de 29,47 ($\pm$ 3,0) μ g/g de tecido congelado. Lampert et al. (2003) ao analisarem 121 amostras de biópsias musculares de indivíduos normais, obtiveram uma média de concentração de CoQ₁₀ de 27,64 ($\pm$ 4,43) μ g/g de tecido fresco, demonstrando resultados próximos aos valores encontrados no nosso grupo controle. Os reduzidos valores dos desvios padrões obtidos nos dois estudos indicam baixa variabilidade entre indivíduos controle. Tais achados indicam elevada reprodutibilidade do método empregado para dosagem da coenzima.

Os resultados do nosso estudo evidenciaram uma deficiência significativa de CoQ₁₀ nos pacientes com DMC em relação ao grupo controle. Apesar da carência de estudos que realizaram a dosagem dessa coenzima em indivíduos com distrofias

musculares, a deficiência da CoQ₁₀ observada em nossos pacientes está em concordância com um experimento realizado por outros autores, mesmo que em reduzido número de pacientes com DMC. Miles et al. (2005) analisaram os níveis de CoQ₁₀ em uma população pediátrica, com a demonstração de redução significativa dessa coenzima no grupo de cinco pacientes com distrofia muscular, dos quais dois pacientes apresentavam DMC, dois apresentavam distrofia muscular congênita e um apresentava distrofia muscular de Becker. Okama et al. (2018) observaram deficiência de CoQ₁₀ em um tamanho amostral de 32 indivíduos com DMD. Analisados em conjunto, nossos resultados no grupo das DMC e os demais estudos citados indicam que a deficiência de CoQ₁₀ não representa um achado de um tipo específico de distrofia muscular. Em oposição aos resultados referidos, um estudo realizado por Nilsson et al. (2014) a atividade dos complexos I+III, cujo conjunto também reflete a atividade da CoQ₁₀, em um grupo de 14 pacientes com diagnóstico de DMC2A foi considerada normal. Contudo, os autores não realizaram correção dos valores pela atividade da enzima citrato sintase.

Ao analisarmos em nossos pacientes a relação entre a alteração da CoQ₁₀ e as características clínicas envolvendo idade no momento de realização da biópsia, idade de início dos sintomas e tempo de evolução da doença, não foi encontrada uma correlação. Tais achados podem indicar que as alterações sejam bem precoces na doença.

A correlação moderada entre a deficiência de CoQ₁₀ com a porcentagem de fibras no fragmento de biópsia muscular, assim como a redução da atividade dos complexos II+III, revelaram dois aspectos importantes para a interpretação desses resultados. Para elucidar se a deficiência da coenzima era uma consequência da perda de área de fibras musculares ou uma deficiência real baseada na atividade dos complexos II+III, e não da cadeia respiratória como um todo, foram realizados os ensaios enzimáticos isolados dos complexos enzimáticos, assim como da atividade dos complexos II+III medidos como um conjunto.

A análise do conjunto dos complexos II+III, os quais refletem a presença de CoQ₁₀ para suas atividades normais, indicou uma deficiência significativa nos pacientes com DMC em comparação ao grupo controle. Essa alteração, em oposição à atividade isolada normal dos complexos enzimáticos, demonstra não haver um acometimento predominante da cadeia respiratória em si, mas isolado da CoQ₁₀, confirmando nossa hipótese de deficiência real dessa coenzima nas DMC. Além disso, a correlação moderada entre a quantidade de CoQ₁₀ e o conjunto dos complexos II+III nos pacientes

com DMC corrobora que a diminuição da atividade desses complexos seja decorrente da baixa concentração de CoQ₁₀ nas biópsias musculares. Outra evidência que confirma nossa hipótese é a correção dos valores da atividade dos complexos II+III pela atividade da citrato sintase, uma medida estimada de massa mitocondrial, anulando a interferência da redução no número de fibras musculares nas análises.

A análise isolada dos complexos da cadeia respiratória em pacientes com DMC não revelou alterações quando comparada ao grupo controle. No entanto, defeitos bioquímicos envolvendo redução da atividade dos complexos enzimáticos têm sido comumente referidos em ensaios enzimáticos de indivíduos com mutação no gene *DYSF* (LIU et al., 2015; VICENTE et al. 2016). Liu et al. (2015) descreveram o comprometimento da atividade dos complexos I, III e IV através de uma análise retrospectiva de nove pacientes com fenótipo de DMC2B, indicando uma redução de 21%, 18% e 40% da atividade em cada um desses complexos, respectivamente, comparados ao grupo controle composto por quatro pacientes com distrofia muscular de Duchenne e quatro com distrofia muscular de Becker. Para as análises do referido estudo foi realizada correção dos valores da atividade dos complexos enzimáticos pela massa mitocondrial. Vicente et al. (2016) observaram deficiência na expressão dos complexos I e IV em seis pacientes com DMC2B ao serem comparados com um grupo controle saudável de idade pareada. Com isso, os resultados de ambos sugeriram que anormalidades mitocondriais são fenômenos comuns em pacientes com disferlinopatia. Entretanto, em nossa amostra composta predominantemente por indivíduos diagnosticados com DMC2B, os resultados dos ensaios bioquímicos foram contrários aos descritos por Liu et al. (2015), pois não houve alteração da atividade isolada dos complexos enzimáticos. Além disso, quando o grupo DMC2B foi comparado ao grupo composto pelos demais subtipos de DMC, foi evidenciada maior atividade dos complexos I e III no subtipo DMC2B. Esses achados podem decorrer do fato de corrigirmos as atividades enzimáticas de acordo com a massa mitocondrial, representada pela atividade da enzima da matriz mitocondrial citrato sintase. De fato, os pacientes com DMC2B apresentam atividade da citrato sintase significativamente menor que a observada no grupo das demais DMC e no grupo controle. Em maior proximidade com nossos resultados bioquímicos, Nilsson et al. (2014) também não observaram alterações das atividades da cadeia respiratória mitocondrial em um grupo de 14 pacientes com DMC2A, sendo realizadas análises das atividades do complexo I+III, da COX e da citrato sintase.

A principal limitação do presente estudo resultado do número reduzido do tamanho amostral, que não permitiu a constituição de subgrupos de tipos específicos de DMC, exceto um grupo reduzido de DMC2B. Por se tratar de estudo em seres humanos, á também limitação da quantidade de amostra disponível por paciente, o que dificulta avaliação mais abrangente dos vários aspectos a serem analisados no contexto de uma disfunção mitocondrial. Alguns dos quais requerem tecido fresco para sua realização, como é o caso da análise da respiração celular refletida pelo consumo de O_2 no tecido.

Portanto, ao avaliar o metabolismo mitocondrial nos fragmentos musculares de pacientes com DMC, nosso estudo demonstrou que a deficiência de CoQ_{10} é um achado patológico importante, indicativo de disfunção mitocondrial nesse grupo de doenças. A partir dos nossos resultados, a organização de um estudo multicêntrico poderia contribuir para um melhor esclarecimento do acometimento mitocondrial na DMC. Com isso, o entendimento dos defeitos primários e secundários dessas doenças permitirá uma melhor compreensão dos processos fisiopatológicos relacionados à DMC e uma abordagem terapêutica mais eficaz.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo, concluímos que:

- há disfunção mitocondrial nos pacientes com DMC caracterizada predominantemente pela deficiência secundária de CoQ₁₀;
- a disfunção mitocondrial não depende da idade no momento da biópsia, da idade do início dos sintomas e do tempo de evolução da doença;
- tal disfunção, embora decorra do processo degenerativo crônico das distrofias musculares, não resulta da perda de fibras musculares no tecido em si;
- não há comprometimento da cadeia respiratória como um todo, mas da atividade isolada do conjunto dos complexos II+III, corroborando que a principal alteração mitocondrial decorre da deficiência de CoQ₁₀;
- não houve diferença entre os subtipos de DMC quanto à deficiência de CoQ₁₀;
- a principal diferença observada entre os subgrupos de DMC foi a redução da massa mitocondrial no subtipo DMC2B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADAMS, J. C.; BRANCACCIO A. The evolution of the dystroglycan complex, a major mediator of muscle integrity. *Biology open*, v. 4 (9), p. 1163-79, 2015.

ANGELINI, C. et al. The clinical course of calpainopathy (LGMD2A) and dysferlinopathy (LGMD2B). *Neurological research*, v. 32 (1): 41-6, 2010.

BALCI, B. et al. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker–Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscular Disorders*, v. 15, p. 271-275, 2005.

BECKMANN, J. S. et al. 66th/67th ENMC sponsored international workshop: the limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, v. 9, p. 436–445, 1999.

BELLO, L. et al. Cardiomyopathy in patients with POMT1-related congenital and limb-girdle muscular dystrophy. *European journal of human genetics*, v. 20 (12), p. 1234-9, 2012.

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*, v. 51, p. 35-42, 1994.

BISCEGLIA, L. et al. A new locus on 3p23–p25 for an autosomal-dominant limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1H. *European Journal of Human Genetics*, v. 18, p. 636–641, 2010.

BISWAS, S.; CHIDA, A. S.; RAHMAN, I. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochemical Pharmacology*, v. 71, p. 551–564, 2006.

BOGERSHAUSEN, N. et al. Recessive TRAPPC11 mutations cause a disease spectrum of limb girdle muscular dystrophy and myopathy with movement disorder and intellectual disability. *American Journal of Human Genetics*, v. 93, p. 181-90, 2013.

BRUNO C. et al. Caveolinopathies. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1385/>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2018.

BUSHBY, K. M. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, v. 5, p. 71–74, 1995.

BUSHBY, K. M.; BECKMANN, J. S. The limb-girdle muscular dystrophies: proposal for a new nomenclature. *Neuromuscular Disorders*, v. 5, p. 337–343, 1995.

CARLSSON, L. et al. Myotilin: a prominent marker of myofibrillar remodelling. *Neuromuscular Disorders*, v. 17 (1), p. 61-8, 2007.

- CETIN, N. et al. A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. **Journal of medical genetics**, 50 (7), p. 437-43, 2013.
- CHAE, J. et al. Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, p. 547-555, v. 11, 2001.
- CHARDON, J. W. et al. LIMS2 mutations are associated with a novel muscular dystrophy, severe cardiomyopathy and triangular tongues. **Clinical Genetics**, v. 88 (6), p. 558-64, 2015.
- CIRAK, S. et al. ISPD gene mutations are a common cause of congenital and limb-girdle muscular dystrophies. **Brain**, v. 136 (1), p. 269–281, 2013.
- CLEMEN, C. S. et al. Desminopathies: pathology and mechanisms. **Acta Neuropathologica**, v. 125, p. 47–75, 2013.
- CLEMENT, E. M. et al. Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. **Archives of Neurology**, v. 65, p. 137-41, 2008.
- DECOSTRE, V.; BEN YAOU, R.; BONNE, G. Laminopathies affecting skeletal and cardiac muscles: clinical and pathophysiological aspects. **Acta Myologica**, v. 24 (2), p. 104-9, 2005.
- DEEV, R. V. et al. Glu20Ter Variant in PLEC 1f Isoform Causes Limb-Girdle Muscle Dystrophy with Lung Injury. **Frontiers in neurology**, v. 8: 367, 2007.
- DE PAULA, F. et al. Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the FKRPF gene: the other end of the spectrum. **European Journal of Human Genetics**, v. 11 (12), p. 923-30, 2003.
- DIMAURO, S.; SERVIDEI, S.; ZEVIANI, S.; et al. Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome. **Annals of Neurology**, v. 22, p. 498–506, 1987.
- DINCER, P. et al. A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of α -dystroglycan. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 771-778, 2003.
- EYMARD, B. et al. Primary adhalinopathy (alpha-sarcoglycanopathy): clinical, pathologic and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy. **Neurology**, v. 48, p. 1227–1234, 1997.
- FANIN, M.; ANGELINI, C. Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy. **Muscle Nerve**, 54 (5), p. 821-835, 2016.
- FOLKERS, K.; SIMONSEN, R. Two successful double-blind trials with coenzyme Q10 (vitamin Q10) on muscular dystrophies and neurogenic atrophies. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1271 (1), p. 281-6, 1995.

- FREY, T. G., MANNELLA C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25 (7), p. 319-324, 2000.
- GAZZERRO, E. et al. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. **European Journal of Human Genetics**, v. 18 (2), p. 137-45, 2010.
- GUGLIERI, M. et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. **Human Mutation**, v. 29, p. 258–66, 2008.
- GUNDESLI, H. et al. Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, p. 834-41, 2010.
- HACKMAN, P. et al. Four new Finnish families with LGMD1D; refinement of the clinical phenotype and the linked 7q36 locus. **Neuromuscular Disorders**, v. 21 (5), p. 338-44, 2011.
- HARA, Y. et al. A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. **The New England Journal Medicine**, v. 364, p. 939-46, 2011.
- HAUERSLEV, S. et al. Calpain 3 is important for muscle regeneration: Evidence from patients with limb girdle muscular dystrophies. **Musculoskeletal Disorders**, p. 13-43, 2012.
- HAUSER, M. A. Myotilin Mutation found in second pedigree with LGMD1A. **American Journal of Human Genetics**, v. 71 (6), p. 1428-32, 2002.
- HICKS, D. et al. A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. **Brain**, v. 134, p. 171–182, 2011.
- KANITKAR, S. A. et al. Limb Girdle Muscular Dystrophy (LGMD): Case Report. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9 (1), 2015.
- KHADILKAR, S. V.; PATEL, B. A.; LALKAKA J. A. Making sense of the clinical spectrum of limb girdle muscular dystrophies. **Practical Neurology**, v. 18 (3), p. 201-210, 2018.
- KATSETOS, C. D. et al. Mitochondrial dysfunction in neuromuscular disorders. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 20 (3), p. 202–15, 2013.
- KAWAI, H. et al. Clinical, pathological, and genetic features of limb-girdle muscular dystrophy type 2A with new calpain 3 gene mutations in seven patients from three Japanese families. **Muscle Nerve**, p. 1493-1501, v. 21, 1998.
- KAWAMUKAI, M. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 53, p. 217-226, 2009.

KAYMAN-KUREKCI, G. et al. Mutation in TOR1AIP1 encoding LAP1B in a form of muscular dystrophy: a novel gene related to nuclear envelopathies. **Neuromuscular Disorders**, v. 24, p. 624-633, 2014.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47 (4), p. 333-43, 2009.

KRAMEROVA, I. et al. Mitochondrial abnormalities, energy deficit and oxidative stress are features of calpain 3 deficiency in skeletal muscle. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 17, p. 3194-3205, 2009.

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

LAVAL, S. H.; BUSHBY, K. M. D. Limb-girdle muscular dystrophies from genetics to molecular pathology. **Neuropath and Applied Neurobiology**, v. 30, p. 91-105, 2004.

LEK, A. et al. Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. **Traffic**, v. 13, p. 185-194, 2012.

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

LITTARRU, G. P.; LANGSJOEN, P. Coenzyme Q10 and statins: biochemical and clinical implications. **Mitochondrion**, p. S168-S174, 2007.

LIU, F. et al. Dysferlinopathy: mitochondrial abnormalities in human skeletal muscle. **International Journal of Neuroscience**, v. 126 (6), p. 499-509, 2016.

MAH, J. K. et al. A Systematic Review and Meta-analysis on the Epidemiology of the Muscular Dystrophies. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 43 (1), p. 163-177, 2016.

MARSOLIER, J. et al. 1st International Workshop on Clinical trial readiness for sarcoglycanopathies 15-16 November 2016, Evry, France. **Neuromuscular disorders**, v. 27 (7), p. 683-692, 2017.

MATHEWS, K. D.; MOORE, S. A. Limb-Girdle Muscular Dystrophy. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 3 (1), p. 78-85, 2003.

MATSUI, M. et al. A case of limb-girdle muscular dystrophy 2M diagnosed by the occurrence of dilated cardiomyopathy. **Rinsho shinkeigaku**, v. 55 (8), p. 585-8, 2015.

MELIÀ, M. J. et al. Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. **Brain**, v. 136, p. 1508-17, 2013.

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

MORI-YOSHIMURA, M. et al. Cardiopulmonary dysfunction in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2A. **Muscle Nerve**, v. 55 (4), p. 465-469, 2017.

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

NARAYANASWAMI, P. et al. Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies. **American Academy of Neurology**, v. 83, p. 1453–1463, 2014.

NIGRO, V.; SAVARESE, M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. **Acta Myologica**, v.33, p. 1-12, 2014.

NILSSON, M. I. et al. Redox State and Mitochondrial Respiratory Chain Function in Skeletal Muscle of LGMD2A Patients. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0102549>. Acesso em 28 de fevereiro de 2018.

NORWOOD, F. L. et al. EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. **European Journal of Neurology**, v. 14, p. 1305-1312, 2007.

OKAMA, L. O.; ESCARSO, S. H. A.; MARANHO, D. A. C.; HIRANO, M.; SOBREIRA, C. F. R. Mitochondrial function in skeletal muscle from patients with Duchenne muscular dystrophy. 2018. Em preparação.

OLIVÉ, M. et al. Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. **Brain**, v. 128 (10), p. 2315-26, 2005.

OSTERGAARD, S. T. et al. Muscle involvement in limb-girdle muscular dystrophy with GMPPB deficiency (LGMD2T). **Neurology Genetics**, v. 2(6):e112, 2016.

PAIM, J. F. et al. Muscle phenotypic variability in limb girdle muscular dystrophy 2 G. **Journal of molecular neuroscience**, v. 50 (2), p. 339-44, 2013.

PALMIO, J. et al. Novel mutations in DNAJB6 gene cause a very severe early-onset limb-girdle muscular dystrophy 1D disease. **Neuromuscular Disorders**, v. 25 (11), p. 835-42, 2015.

PAULSEN, C. E.; CARROLL, K. S. Orchestrating redox signaling networks through regulator cysteine switches. **ACS Chemical Biology**, v. 5, p. 47–62, 2009.

PENISSON-BESNIER, I. et al. Myopathies caused by homozygous titin mutations: limb-girdle muscular dystrophy 2J and variations of phenotype. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 81 (11), p. 1200-2, 2010.

PREISLER, N. et al. Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies. **Molecular genetics and metabolism**, v. 110 (3), p. 287-9, 2013.

PUCKETT, R. L. et al. Further evidence of fukutin mutations as a cause of childhood onset limb-girdle muscular dystrophy without mental retardation. **Neuromuscular disorders**, v. 19 (5), p. 352-6, 2009.

QUINZII, C. et al. A Mutation in Para-Hydroxybenzoate-Polyprenyl Transferase (COQ2) Causes Primary Coenzyme Q10 Deficiency. **American Journal of Human Genetics**, v. 78 (2), p. 345-9, 2006.

QUINZII, C. M.; DIMAURO, S.; HIRANO, M. Human coenzyme Q10 deficiency. **Neurochemical Research**, v. 32(4-5), p. 723–727, 2007.

RANDO, T. A. Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies. **American Journal of Physical Medicine Rehabilitation**, v. 81, p. 175–186, 2002.

RANKIN, J.; ELLARD, S. The laminopathies: a clinical review. **Clinical Genetics**, v.71 (3), p. 293, 2007.

REILICH, P. et al. A novel mutation in the myotilin gene (MYOT) causes a severe form of limb girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A). **Journal of Neurology**, v. 258 (8), p. 1437-44, 2011.

RICHARD, I. et al. 216th ENMC international workshop: Clinical readiness in FKRPs related myopathies January 15-17, 2016 Naarden, **The Netherlands**. **Neuromuscular disorders**, v. 26 (10), p. 717-724, 2016.

RICHARD, I. et al. Natural history of LGMD2A for delineating outcome measures in clinical trials. **Annals of clinical and translational Neurology**, v. 3 (4), p. 248-65, 2016.

RIISAGER, M. et al. A new mutation of the fukutin gene causing late-onset limb girdle muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 23 (7), p. 562-7, 2013.

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

SANDELL, S. et al. Diagnostically important muscle pathology in DNAJB6 mutated LGMD1D. Disponível em: <
<https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-016-0276-9>>.
 Acesso em 8 de fevereiro de 2018.

SARKOZY, A. et al. Muscle MRI findings in limb girdle muscular dystrophy type 2L. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, p. 122–S129, 2012.

SARPARANTA, J. et al. Mutations affecting the cytoplasmic functions of the co-chaperone DNAJB6 cause limb-girdle muscular dystrophy. **Nature Genetics**, v. 44 (4), p. 450-5, 2012.

- SCHINDLER, R. F. et al. POPDC1(S201F) causes muscular dystrophy and arrhythmia by affecting protein trafficking. **The journal of clinical investigation**, 126 (1), p. 239-53, 2016.
- SERVIAN-MORILLA, E. et al. A POGLUT1 mutation causes a muscular dystrophy with reduced Notch signaling and satellite cell loss. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, p. 1289-1309, 2016.
- SICILIANO, G. et al. Muscle exercise in limb girdle muscular dystrophies: pitfall and advantages. **Acta Myologica**, v. 34 (1), p. 3-8, 2015.
- SHIEH, P. B.; KUDRYASHOVA, E.; SPENCER, M. J. Limb-girdle muscular dystrophy 2H and the role of TRIM32. **Handbook of clinical neurology**, v. 101, p. 25-33, 2011.
- SHOKEIR, M. H.; KOBRINSKY, N. L. Autosomal recessive muscular dystrophy in Manitoba Hutterites. **Clinical Genetics**, v. 9 (2), p. 197-202, 1976.
- SPURNEY, C. F. Cardiomyopathy of Duchenne Muscular Dystrophy: current understanding and future directions. **Muscle & Nerve**, v. 44, p. 8-19, 2011.
- SRERE, P. A. Citrate synthase. **Methods in enzymology**, v. 13, p. 3-11, 1969.
- WEILER, T. et al. Limb girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites does not map to any of the known LGMD loci. **American Journal of Medical Genetics**, v. 72 (3), p. 363-368, 1997.
- THOMPSON, R.; STRAUB, V. Limb-girdle muscular dystrophies - international collaborations for translational research. **Nature Reviews Neurology**, v. 12 (5), p. 294-309, 2016.
- TERRILL, J. R. et al. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. **The FEBS Journal**, v. 280, p. 4149-4164, 2013.
- VIEIRA, N. M. et al. A defect in the RNA-processing protein HNRPDL causes limb-girdle muscular dystrophy 1G (LGMD1G). **Human Molecular Genetics**, v. 23 (15), p. 4103-10, 2014.
- VIHOLA, A. et al. Diagnostic anoctamin-5 protein defect in patients with ANO5-mutated muscular dystrophy. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, p. 1-8, 2017.
- VINCENT, A. E. et al. Dysferlin mutations and mitochondrial dysfunction. **Neuromuscular Disorders**, v. 26, p. 782-788, 2016.
- WICKLUND, M. P. Rare disease clinical trials: Power in numbers. **Neurology Genetics**, v. 2 (4): e92, 2016.

WICKLUND, M. P.; KISSEL, J. T. The Limb-Girdle Muscular Dystrophies. **Neurologic Clinics**, v. 32, p. 729–749, 2014.

WINKLER-STUCK, K et al. Effect of coenzyme Q10 on the mitochondrial function of skin fibroblasts from Parkinson patients. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 220 (1-2), p. 41–48, 2004.

YAMAMOTO, M. et al. Focal cytochrome c oxidase deficiency in various neuromuscular diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 91(1-2), p. 207-13, 1989.

YANG, H. et al. Analysis of phenotype, enzyme activity and genotype of Chinese patients with POMT1 mutation. **Journal of human genetics**, v. 61 (8), p. 753-9, 2016.

ZATZ, M. et al. The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. **Neuromuscular Disorders**, v. 13(7-8), p. 532-44, 2003.

ZHANG, S. et al. Transcriptional analysis of the titin cap gene. **Molecular genetics and genomics**, v. 285 (3), p. 261-72, 2011.

ANEXO

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, 11 de maio de 2017

Ofício nº 1383/2017
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL NO TECIDO MUSCULAR DE PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURA” – versão 2.0, de 07/04/2017**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 449ª Reunião Ordinária, realizada em 08/05/2017 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 2.0, de 07/04/2017, de acordo com o Processo HCRP nº 2167/2017.

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.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.
Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

PROFª.DRª.CLÁUDIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA (Orientadora)
MARJORY IRINEU BENÁ

Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

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 FUNÇÃO MITOCONDRIAL NO TECIDO MUSCULAR DE PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS

Pesquisadoras responsáveis: Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, Marjory Irineu Bená.

Estamos realizando um projeto de pesquisa sobre as distrofias musculares de cinturas, que são doenças que causam fraqueza muscular, principalmente afetando os ombros e quadril, levando a dificuldade para realizar atividades físicas. Nas distrofias musculares de cinturas, a fraqueza e a incapacidade física ocorrem por perda progressiva das fibras que compõem os músculos. Nesse processo, pode haver defeitos numa pequena estrutura chamada mitocôndria, que é muito importante para a produção de energia e um desempenho muscular eficiente. Esses danos na produção de energia permanecem pouco compreendidos. Portanto, esse estudo pretende analisar de forma detalhada as possíveis alterações da função mitocondrial presentes no músculo, pois uma melhor compreensão dessas alterações poderá trazer benefícios que contribuirão para um tratamento mais eficaz.

Desse modo, os objetivos desta pesquisa são:

- avaliar de forma detalhada as alterações da mitocôndria nos pedaços de músculo da biópsia muscular;
- quantificar a perda de fibras nos pedaços do músculo obtidos por biópsia;
- analisar o grau de perda da produção de energia, relacionando com a perda de fibras do músculo e com a redução da força e da capacidade de fazer atividades.

Convidamos você a fazer parte da pesquisa e, ao concordar, sua contribuição será no sentido de permitir que avaliemos sua força e capacidade de movimento e que utilizemos parte da sua biópsia muscular, colhida durante a investigação do seu diagnóstico, para determinar os efeitos da distrofia muscular de cinturas na produção de energia pela mitocôndria. Não será necessária coleta de nova biópsia.

A sua participação neste estudo é voluntária e não implica em gastos da sua parte e nem qualquer tipo de remuneração. Todas as informações que possam identificá-lo serão mantidas em sigilo. Não haverá benefícios imediatos aos participantes da pesquisa.

Essa pesquisa não oferece riscos à sua saúde. Entretanto, apesar dos cuidados, há o risco potencial de perda do sigilo e confidencialidade.

Você pode retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento. Também poderá entrar em contato para o esclarecimento de qualquer dúvida relacionada com essa pesquisa.

Caso concorde em participar do estudo, 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 _____, aceito espontaneamente participar deste trabalho, podendo desistir a qualquer momento, se assim achar conveniente.

Assinatura do(a) participante

Nome _____ do _____ pesquisador: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Telefones para contato: (16) 3315-3312 e 3602-2548

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e da FMRP-USP:

(16) 3602-2228

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 FUNÇÃO MITOCONDRIAL NO TECIDO MUSCULAR DE PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS

Pesquisadoras responsáveis: Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, Marjory Irineu Bená.

Estamos realizando um projeto de pesquisa sobre as distrofias musculares de cinturas, que são doenças que causam fraqueza muscular, principalmente afetando os ombros e quadril, levando a dificuldade para realizar atividades físicas. Nas distrofias musculares de cinturas, a fraqueza e a incapacidade física ocorrem por perda progressiva das fibras que compõem os músculos. Nesse processo, pode haver defeitos numa pequena estrutura chamada mitocôndria, que é muito importante para a produção de energia e um desempenho muscular eficiente. Esses danos na produção de energia permanecem pouco compreendidos. Portanto, esse estudo pretende analisar de forma detalhada as possíveis alterações da função mitocondrial presentes no músculo, pois uma melhor compreensão dessas alterações poderá trazer benefícios que contribuirão para um tratamento mais eficaz.

Desse modo, os objetivos desta pesquisa são:

- avaliar de forma detalhada as alterações da mitocôndria nos pedaços de músculo da biópsia muscular;
- quantificar a perda de fibras do músculo nos pedaços do músculo obtidos por biópsia;
- analisar o grau de perda da produção de energia, relacionando com a perda de fibras do músculo e com a redução da força e da capacidade de fazer atividades.

Convidamos seu filho(a) a fazer parte da pesquisa e, ao concordarem, a contribuição será no sentido de permitir que avaliemos sua força e capacidade de movimento e que

utilizemos parte da biópsia muscular colhida durante a investigação do diagnóstico, para determinar os efeitos da distrofia muscular de cinturas na produção de energia pela mitocôndria. Não será necessária coleta de nova biópsia.

A participação do seu filho neste estudo é voluntária e não implica em gastos da sua parte e nem qualquer tipo de remuneração para sua família. Todas as informações que possam identificá-lo serão mantidas em sigilo. Não haverá benefícios imediatos aos participantes da pesquisa.

Essa pesquisa não oferece riscos à saúde do seu filho. Entretanto, apesar dos cuidados, há o risco potencial de perda do sigilo e confidencialidade.

Vocês poderão retirar o consentimento, deixando de participar do estudo a qualquer momento. Também poderão entrar em contato para o esclarecimento de qualquer dúvida relacionada com essa pesquisa.

Caso você e seu(sua) filho(a) concordem que ele(a) participe do estudo, solicitamos que assine o termo abaixo:

Declaro que concordo com as condições que foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade que meu filho participe 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.

Nome _____ do _____ pesquisador: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Telefones para contato: (16) 3315-3312 e 3602-2548

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e da FMRP-USP:

(16) 3602-2228

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 FUNÇÃO MITOCONDRIAL NO TECIDO MUSCULAR DE PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS

Pesquisadoras responsáveis: Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, Marjory Irineu Bená.

Estamos realizando um projeto de pesquisa sobre as distrofias musculares de cinturas, que são doenças que causam fraqueza muscular, principalmente afetando os ombros e quadril, levando a dificuldade para realizar atividades físicas. Nas distrofias musculares de cinturas, a fraqueza e a incapacidade física ocorrem por perda progressiva das fibras que compõem os músculos. Nesse processo, pode haver defeitos numa pequena estrutura chamada mitocôndria, que é muito importante para a produção de energia e um desempenho muscular eficiente. Esses danos na produção de energia permanecem pouco compreendidos. Portanto, esse estudo pretende analisar de forma detalhada as possíveis alterações da função mitocondrial presentes no músculo, pois uma melhor compreensão dessas alterações poderá trazer benefícios que contribuirão para um tratamento mais eficaz.

Desse modo, os objetivos desta pesquisa são:

- avaliar de forma detalhada as alterações da mitocôndria nos pedaços de músculo da biópsia muscular;
- quantificar a perda de fibras nos pedaços do músculo obtidos por biópsia;
- analisar o grau de perda da produção de energia, relacionando com a perda de fibras do músculo e com a redução da força e da capacidade de fazer atividades.

Convidamos você a fazer parte da pesquisa e, ao concordar, sua contribuição será no sentido de permitir que avaliemos sua força e capacidade de movimento como integrante de um grupo controle para a determinação dos valores normais. Será utilizada parte de sua biópsia colhida durante a investigação da sua doença para comparar com o grupo de pacientes com distrofia muscular de cinturas. Não será necessária coleta de nova biópsia.

A sua participação neste estudo é voluntária e não implica em gastos da sua parte e nem qualquer tipo de remuneração. Todas as informações que possam identificá-lo serão mantidas em sigilo. Não haverá benefícios imediatos aos participantes da pesquisa.

Essa pesquisa não oferece riscos à sua saúde. Entretanto, apesar dos cuidados, há o risco potencial de perda do sigilo e confidencialidade.

Você pode retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento. Também poderá entrar em contato para o esclarecimento de qualquer dúvida relacionada com essa pesquisa.

Caso concorde em participar do estudo, 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 _____, aceito espontaneamente participar deste trabalho, podendo desistir a qualquer momento, se assim achar conveniente.

Assinatura do(a) participante

Nome _____ do _____ pesquisador: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Telefones para contato: (16) 3315-3312 e 3602-2548

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e da FMRP-USP:

(16) 3602-2228

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 FUNÇÃO MITOCONDRIAL NO TECIDO MUSCULAR DE PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS

Pesquisadoras responsáveis: Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira, Marjory Irineu Bená.

Estamos realizando um projeto de pesquisa sobre as distrofias musculares de cinturas, que são doenças que causam fraqueza muscular, principalmente afetando os ombros e quadril, levando a dificuldade para realizar atividades físicas. Nas distrofias musculares de cinturas, a fraqueza e a incapacidade física ocorrem por perda progressiva das fibras que compõem os músculos. Nesse processo, pode haver defeitos numa pequena estrutura chamada mitocôndria, que é muito importante para a produção de energia e um desempenho muscular eficiente. Esses danos na produção de energia permanecem pouco compreendidos. Portanto, esse estudo pretende analisar de forma detalhada as possíveis alterações da função mitocondrial presentes no músculo, pois uma melhor compreensão dessas alterações poderá trazer benefícios que contribuirão para um tratamento mais eficaz.

Desse modo, os objetivos desta pesquisa são:

- avaliar de forma detalhada as alterações da mitocôndria nos pedaços de músculo da biópsia muscular;
- quantificar a perda de fibras nos pedaços do músculo obtidos por biópsia;
- analisar o grau de perda da produção de energia, relacionando com a perda de fibras do músculo e com a redução da força e da capacidade de fazer atividades.

Convidamos você a fazer parte da pesquisa e, ao concordar, sua contribuição será no sentido de permitir a utilização de parte da sua biópsia muscular como integrante de um

grupo controle para a determinação dos valores normais. Será utilizada parte de sua biópsia colhida durante a investigação da sua doença para comparar com o grupo de pacientes com distrofia muscular de cinturas. Não será necessária coleta de nova biópsia.

A sua participação neste estudo é voluntária e não implica em gastos da sua parte e nem qualquer tipo de remuneração. Todas as informações que possam identificá-lo serão mantidas em sigilo. Não haverá benefícios imediatos aos participantes da pesquisa.

Essa pesquisa não oferece riscos à sua saúde. Entretanto, apesar dos cuidados, há o risco potencial de perda do sigilo e confidencialidade.

Você pode retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento. Também poderá entrar em contato para o esclarecimento de qualquer dúvida relacionada com essa pesquisa.

Caso concorde em participar do estudo, 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.

<p><u>Termo de Consentimento</u></p> <p>Eu, _____, RG _____ _____, aceito espontaneamente participar deste trabalho, podendo desistir a qualquer momento, se assim achar conveniente.</p> <p style="text-align: center;">_____</p> <p style="text-align: center;">Assinatura do(a) participante</p> <p style="text-align: center;">Data: _____</p>
--

Nome _____ do _____ pesquisador: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Telefones para contato: (16) 3315-3312 e 3602-2548

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e da FMRP-USP:

(16) 3602-2228