

Marina Yazigi Solis

Eficácia e segurança da suplementação de creatina em pacientes com dermatomiosite de início juvenil

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos
Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Solis, Marina Yazigi

Eficácia e segurança da suplementação de creatina em pacientes com
dermatomiosite de início juvenil / Marina Yazigi Solis. -- São Paulo, 2014.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos.

Orientador: Bruno Gualano.

Descritores: 1.Dermatomiosite 2.Creatina 3.Força muscular
4.Músculos/metabolismo 5.Aptidão física 6.Criança 7.Adolescente 8.Ensaio
clínico 9.Resultado do tratamento

USP/FM/DBD-190/14

A minha mãe, Helena Yazigi de Solis, pelo amor e dedicação em todos esses anos. Sem sua força e apoio nada disso teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e amigo, Bruno Gualano pela confiança depositada em mim para executar este trabalho e por me auxiliar de forma ativa em todas as etapas de minha formação acadêmica. Muito obrigada por todas as oportunidades profissionais e científicas que você tem me apresentado. E por fim, lhe agradeço por compartilhar sua paixão, competência e experiência profissional com grande entusiasmo.

Agradeço à amiga Fabiana Braga Benatti, por ter guiado os meus primeiros passos na área acadêmica e com quem pude aprender muito ao longo de todo o seu doutorado.

Um agradecimento especial ao meu amigo e marido, Guilherme Giannini Artioli, que me apoia em todas as decisões e etapas da minha vida pessoal e acadêmica, e com quem venho compartilhando as maiores alegrias da minha vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Clóvis Artur Almeida da Silva, a Dr.^a Adriana Sallum, a Dr.^a Lúcia Campos, a Dr.^a Nádia Aikawa e a Dr.^a Maria Concepcion Otaduy pelo auxílio e carinho que vocês deram a este projeto. Também, agradeço à Dr.^a Clarissa, a Dr.^a Érica, e a Dr.^a Kátia por colaborar na realização das avaliações dos pacientes.

Agradeço à Dr.^a Ana Lúcia de Sá Pinto e a Dr.^a Fernanda Rodrigues Lima pelo acolhimento e confiança depositada em mim para execução deste projeto. Também, agradeço à equipe do LACRE, especialmente, à Thalita Dassouki e Luiz Perandini.

Agradeço à Dr.^a Rosa Maria Pereira pela grande colaboração na realização dos exames de densitometria óssea. Também, agradeço as técnicas, Valéria e Liliam, por inúmeras vezes marcarem e desmarcarem os exames dos pacientes.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Nutrição e do LACRE pela amizade e companheirismo nas disciplinas assistidas. Agradeço o auxílio dado na tabulação dos exames pelas colegas Ana Jéssica Pinto e Rebeca Lugaresi. Um agradecimento especial à minha grande companheira de pós-graduação, Ana Paula Tanaka Hayashi, que

compartilhou diariamente muitas das alegrias e frustrações acadêmicas vividas ao longo desses anos.

À minha família, principalmente aos meus pais, Helena e Rodolfo (*in memoriam*), e as minhas irmãs, Carolina e Gabriela, por sempre estarem presentes em todas as etapas da minha vida, me apoiando e me incentivando e também, pelo amor e compreensão. Ainda, agradeço as minhas tias, Haifa, Zákie e Latife pelo exemplo a ser seguido.

Muito obrigada a todos os voluntários e seus responsáveis que participaram do projeto, pois sem vocês não seria possível à realização deste trabalho.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e à Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) pelo enorme aprendizado e pelas inúmeras oportunidades de crescimento profissional.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| Lista de Abreviaturas | |
| Lista de Figuras | |
| Lista de Tabelas | |
| Resumo | |
| Abstract | |
| 61. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Papel da creatina no músculo esquelético..... | 18 |
| 1.2. Efeito da suplementação de creatina nas miopatias..... | 20 |
| 1.3. Papel da creatina no metabolismo ósseo..... | 23 |
| 1.4. Efeito da suplementação de creatina na função renal | 25 |
| 2. OBJETIVO | 28 |
| 2.1. Objetivos específicos | 28 |
| 3. MÉTODOS..... | 29 |
| 3.1. Desenho experimental | 29 |
| 3.2. Recrutamento e seleção de voluntários | 31 |
| 3.3. Consumo alimentar..... | 36 |
| 3.4. Suplementação e vendamento | 36 |
| 3.5. Fosforilcreatina intramuscular | 37 |
| 3.6. Avaliação do estágio puberal e exames clínicos | 38 |
| 3.7. Avaliação do nível de atividade física, da força e função muscular..... | 39 |
| 3.8. Avaliação da capacidade aeróbia..... | 40 |
| 3.9. Avaliação da densidade mineral óssea e composição corporal | 41 |
| 3.10. Avaliação da capacidade funcional e qualidade de vida | 42 |
| 3.11. Exames laboratoriais, marcadores do remodelamento ósseo e citocinas inflamatórias | 43 |
| 3.12. Clearance de ⁵¹ Cr-EDTA..... | 44 |
| 3.13. Cálculo do tamanho da amostra e análise estatística..... | 45 |
| 4. RESULTADOS | 48 |
| 4.1. Pacientes | 48 |
| 4.2. Consumo alimentar | 49 |
| 4.3. Suplementação e vendamento..... | 50 |
| 4.4. Fosforilcreatina intramuscular | 50 |
| 4.5. Função muscular e capacidade aeróbia..... | 52 |
| 4.6. Densidade mineral óssea, composição corporal, marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo e citocinas inflamatórias | 52 |
| 4.7. Parâmetros clínicos, capacidade funcional e qualidade de vida | 56 |
| 4.8. Exames laboratoriais, função renal e efeitos adversos | 58 |
| 4.9. Análise de sensibilidade post-hoc | 60 |
| 5. DISCUSSÃO | 61 |
| 6. REFERÊNCIAS | 72 |
| APÊNDICE | 85 |

LISTA DE ABREVIATURA

| | |
|-----------------|---|
| 31P-ERM | Espectroscopia de fósforo por ressonância magnética |
| ACR | <i>American College of Rheumatology</i> |
| ADP | Adenosina difosfato |
| ALT | Aspartato alaninatransferase |
| AST | Aspartato aminotranferase |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CHAQ | <i>Childhood Health Assessment Questionnaire</i> |
| CK | Creatina quinase |
| CMAS | <i>Childhood Myositis Assessment Scale</i> |
| CMO | Conteúdo mineral ósseo |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| Cr | Creatina |
| CTX | Concentrações de telo-peptídeos carboxi-terminais do colágenotípico I |
| DAS | <i>Disease Activity Score</i> |
| DM | Dermatomiosite |
| DMB | Distrofia de Becker |
| DMD | Distrofia de Duchenne |
| DMJ | Dermatomiosite juvenil |
| DMO | Densidade mineral óssea |
| DMOA | Densidade mineral óssea aparente |
| DXA | Densitometria de dupla emissão com fonte de raios-X |
| EEFE-USP | Escola de educação física e esporte da Universidade de São Paulo |
| EVA | Escala Visual Analógica |
| HC-FMUSP | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| ICr | Instituto da Criança |
| IMC | Índice de massa corporal |
| INRAD | Instituto de radiologia |
| IPAQ | <i>International Physical Activity Questionnaire</i> |
| LACRE | Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia |
| LAV | Limiar anaeróbico ventilatório |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| MCI | Miosite por corpúsculo de inclusão |
| MII | Miopatia inflamatória idiopática |
| MMT | <i>Manual Muscle Testing</i> |
| O ₂ | Oxigênio |

| | |
|---------------------|--|
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PedsQL | Questionário pediátrico de qualidade de vida |
| PCr | Fosforilcreatina |
| PCR | Ponto de compensação |
| P1NP | Pró-peptídeos amino-terminais do pró-colágeno tipo I |
| PM | Polimiosite |
| RM | Repetição máxima |
| TE | Tempo de eco |
| VE | Ventilação pulmonar |
| VCO ₂ | Produção de dióxido de carbono |
| VO ₂ | Consumo de oxigênio |
| VO ₂ máx | Consumo máximo de O ₂ |
| Z-escore | Escore de desvio-padrão |

LISTA DE FIGURA

| | |
|---|----|
| Figura 1. Desenho experimental do projeto..... | 17 |
| Figura 2. Fluxograma dos pacientes com DM de início juvenil..... | 35 |
| Figura 3. Dados individuais do conteúdo intramuscular de PCr dos pacientes com DM de início juvenil antes e depois da suplementação de Cr e de placebo. A) Valores absolutos e B) Delta escores..... | 37 |
| Figura 4. Dados individuais de ^{51}Cr -EDTA dos pacientes com DMJ antes e após a suplementação de Cr e placebo..... | 44 |

LISTA DE TABELA

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Características demográficas, regime de medicamentos e parâmetros de atividade da doença dos pacientes com DM de início juvenil antes da intervenção1..... | 19 |
| Tabela 2. Dados antropométricos, capacidade física, força e função muscular..... | 21 |
| Tabela 3. Consumo alimentar..... | 33 |
| Tabela 4. Dados de função muscular e capacidade aeróbia..... | 39 |
| Tabela 5. Dados de massa óssea e composição corporal..... | 40 |
| Tabela 6. Dados de marcadores do remodelamento ósseo e citocinas inflamatórias..... | 41 |
| Tabela 7. Parâmetros clínicos, capacidade funcional e qualidade de vida..... | 43 |
| Tabela 8. Exames laboratoriais e função renal..... | 45 |

RESUMO

Solis MY. *Eficácia e segurança da suplementação de creatina em pacientes com dermatomiosite de início juvenil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A dermatomiosite juvenil (DMJ) é uma doença autoimune idiopática caracterizada pela presença de lesão cutânea, perda de massa muscular, fraqueza muscular proximal, fadiga e redução da aptidão física. Nesse contexto, a suplementação de creatina emerge como estratégia terapêutica não farmacológica para atenuar os sintomas ocasionados pela disfunção muscular e perda de massa muscular em diversas condições, como nas doenças reumatológicas pediátricas; **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia e a segurança da suplementação de creatina em pacientes com DM de início juvenil; **Métodos:** Trata-se de um estudo duplo-cego, *crossover*, balanceado e controlado por placebo. Todos os voluntários ($n = 15$) receberam dois tratamentos, a saber: creatina (0,1 g/kg/dia) ou dextrose (placebo - 0,1 g/kg/dia). Para cada tratamento, o período de suplementação foi de 12 semanas, interpassadas por um período de *washout* de oito semanas. A ordem dos tratamentos foi determinada de forma aleatória e contrabalanceada. Tanto nos períodos pré-suplementação, como nos períodos pós-suplementação foram avaliadas a força e função musculares (desfechos primários), além da composição corporal, densidade mineral óssea, marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo, citocinas inflamatórias, aptidão aeróbia, qualidade de vida, parâmetros relacionados à atividade da doença, consumo alimentar e conteúdo

intramuscular de fosforilcreatina. Nos mesmos períodos de tempo, a segurança da intervenção foi avaliada por parâmetros laboratoriais e por *clearance* de ^{51}Cr -EDTA. Os eventos adversos foram registrados durante todo o estudo; **Resultados:** Não houve diferença significativa no conteúdo intramuscular de fosforilcreatina entre as condições, antes e após as intervenções (Creatina – Pré: $21,4 \pm 5,3$ /Pós: $20,6 \pm 2,7$, delta escore = - $0,3 \pm 2,5$ mmol/kg peso úmido; Placebo – Pré: $20,4 \pm 3,7$ /Pós: $20,7 \pm 3,6$, delta escore = - $0,1 \pm 4,2$ mmol/kg peso úmido, $p = 0,45$ da interação entre as condições). Também, não houve diferença significativa entre as condições placebo e creatina para função muscular, capacidade aeróbia, composição corporal, densidade mineral óssea e qualidade de vida. Além disso, não houve alteração na função renal após a suplementação de creatina e nenhum efeito adverso foi observado; **Conclusão:** O protocolo de suplementação de creatina ($0,1$ g/kg/d) por 12 semanas foi bem tolerado e livre de efeitos adversos. Entretanto, a suplementação de creatina não foi capaz de aumentar o conteúdo intramuscular de fosforilcreatina, o que se traduziu em ausência de melhora da função muscular, aptidão aeróbia, composição corporal e parâmetros de qualidade de vida em pacientes com DM de início juvenil.

Descritores: Dermatomiosite, creatina, força muscular, músculo/metabolismo, aptidão física, criança; adolescente, ensaio clínico, resultado do tratamento.

ABSTRACT

Solis MY. *Safety and efficacy of creatine supplementation in juvenile dermatomyositis* [thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Introduction: Juvenile dermatomyositis (JDM) is an autoimmune idiopathic disease characterized by skin rashes, insidious loss of muscle mass, symmetrical proximal muscle weakness, decreased physical capacity, and fatigue. In this context, creatine supplementation has emerged as a promising non-pharmacological therapeutic strategy to counteract muscle dysfunction and low lean mass in a variety of conditions, including in pediatric and rheumatic diseases. **Objective:** To examine the safety and efficacy of creatine supplementation in Juvenile Dermatomyositis (JDM) patients; **Methods:** JDM patients ($n = 15$) received placebo or creatine supplementation (0.1 g/kg/d) in a randomized, crossover, double-blind design. Subjects were assessed at baseline and after 12 weeks, with an 8-week washout period. Primary outcome was muscle function. Secondary outcomes included body composition, bone mineral density, biochemical markers of bone remodeling, inflammatory cytokines, aerobic conditioning, health-related quality of life, disease-related parameters, dietary intake and muscle phosphorylcreatine (PCR) content. Safety was assessed by laboratory parameters and kidney function measurements such as ^{51}Cr -EDTA clearance; **Results:** Intramuscular PCR content was not significantly different between creatine and placebo before or after the intervention (Creatine - Pre: 21.4 ± 5.3 , Post: 20.6 ± 2.7 , delta score = -0.3 ± 2.5 mmol/kg wet muscle, ES = -0.15; Placebo - Pre: 20.4 ± 3.7 , Post: 20.7 ± 3.6 , delta score

= -0.1 ± 4.2 mmol/kg wet muscle, ES = -0.15; 95% CI for delta score = -2.8 ± 2.4 , p = 0.45 for interaction between intervention). No significant changes between placebo and creatine for muscle function and aerobic conditioning, body composition, bone mineral density, and quality of life were detected, probably due to the lack of change in intramuscular PCR content. Kidney function was not changed after creatine supplementation and no side effects were noticed; **Conclusion:** a 12-week creatine supplementation protocol is well tolerable and free of adverse effects but did not affect intramuscular PCR, muscle function, body composition, bone mineral density or quality of life in JDM patients.

Descriptors: Dermatomyositis, creatine, muscle strength, muscles/metabolism, physical fitness, child, adolescent, clinical trial, treatment outcome.

1. INTRODUÇÃO

A dermatomiosite (DM), assim como a polimiosite (PM) e a miosite por corpúsculo de inclusão (MCI), é uma doença muscular denominada miopatia inflamatória idiopática (MII), caracterizando-se pela presença de fraqueza muscular e de infiltrados inflamatórios musculares (Rider e Miller, 1997). As MII's na infância e na adolescência são raras, sendo a DM juvenil (DMJ) a forma mais comum, representando 85% casos (Symmons et al. 1995).

A cada ano, a DMJ acomete, nos Estados Unidos, 3,2 crianças por milhão, considerando-se apenas aquelas entre dois a 17 anos de idade (Mendez et al. 2003). No Reino Unido e na Irlanda, estima-se que ocorram 0,19 casos por 100.000 crianças abaixo dos 16 anos de idade por ano (Symmons et al. 1995). No Brasil, há registros de mais 178 casos de DMJ em nove centros diferentes (Sato et al. 2009). Curiosamente, a DMJ acomete predominantemente o gênero feminino na proporção de 2:1 (Wedderburn; Li, 2004).

A DMJ é uma angiopatia autoimune sistêmica, resultante da interação entre o meio ambiente e a suscetibilidade genética individual, a qual leva à disfunção do sistema imune e resposta tecido-específica (McCann et al. 2006). Evidências indicam participação da imunidade celular contra os抗ígenos musculares, bem como a formação de imunocomplexos, os quais resultam em inflamação perivascular, depleção capilar, isquemia muscular, necrose e atrofia das fibras musculares (Sallum et al. 2002). Além de dano no músculo esquelético e na derme, 69% dos pacientes com DMJ

apresentam comprometimentos de um ou mais sistemas, tais como endócrino, gastrointestinal, pulmonar e cardiovascular (Ravelli et al. 2010).

De acordo com os critérios de Bohan e Peter (1975), o diagnóstico da DMJ pode ser confirmado pela presença de eritema característico, como o heliotropo (vasculite e edema periorbitário) e pápulas de Gottron (lesão eritematosa em face dorsal das articulações como metacarpofalangianas e interfalangianas proximais, joelhos, cotovelos e tornozelos), associado a três dos seguintes critérios: 1) fraqueza muscular proximal simétrica dos membros, 2) elevação dos níveis séricos das enzimas musculares, como a creatina quinase (CK), aldolase, lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST/TGO) e aspartato alaninatransferase (ALT/TGP), 3) eletromiografia alterada, caracterizada por unidades motoras curtas, polifásica, fibrilações, ondas positivas, irritabilidade insercional, descargas repetidas de alta frequência, e 4) biópsia muscular com evidências de miopatia inflamatória.

Em relação ao tratamento para DMJ, desde 1970 a corticoterapia tem sido utilizada como tratamento de primeira escolha, podendo ser administrado na forma oral (prednisona 1 a 2mg/Kg/dia) ou como pulsoterapia (metilprednisona 30mg/Kg/dia), frequentemente associada a outros imunossupressores (*e.g.* metotrexato, azatioprina, hidoxicloroquina, ciclosporina) (Al-Mayouf et al. 2001). Embora o tratamento farmacológico tenha melhorado a sobrevida e o prognóstico dos pacientes com DMJ, o uso prolongado e de altas doses desses fármacos pode ocasionar danos severos e muitas vezes irreversíveis sobre diversos órgãos e sistemas, em especial o músculo esquelético e o tecido ósseo (Stewart et al. 2003).

Dessa maneira, o comprometimento microvascular do músculo esquelético e da pele pode levar à progressiva fraqueza muscular proximal, diminuição da capacidade

física e/ou fadiga muscular e também lesão cutânea, caracterizada pelas pápulas de Gottron, heliotropo e eritema malar (Mastaglia et al. 2003; Ravelli et al. 2010). As causas que levam à fraqueza, disfunção muscular e atrofia em pacientes com DMJ são diversas e incluem: inflamação sistêmica e intramuscular, aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (*e.g.* TNF- α , IL-1 α e IL-1 β), hipoatividade e o efeito do próprio tratamento com corticosteróides no catabolismo protéico (Gualano et al. 2009a, 2010; Maillard et al. 2005; Takken et al. 2005, 2008).

Além das alterações citadas acima, alguns autores têm demonstrado que os pacientes com DM e PM apresentam alterações metabólicas no músculo esquelético. Interessantemente, Tarnopolsky e Parise (1999a) demonstraram que pacientes com miopatias possuem conteúdos intramusculares de creatina (Cr) e fosfocreatina (PCr) reduzidos. Achados semelhantes foram observados por Park et al. (1998) que, por meio de espectroscopia de fósforo por ressonância magnética (31P-ERM), demonstraram que pacientes com PM e DM apresentavam redução nas concentrações intramusculares de adenosina tri-fosfato (ATP) e PCr, quando comparados a sujeitos saudáveis. Após dois anos, os mesmos autores verificaram uma redução de 35-40% das concentrações dos mesmos metabólitos musculares nesses pacientes (Park et al. 2000). Esses achados poderiam explicar a substancial piora na capacidade anaeróbia, a fadiga muscular e a intolerância à atividade física, especialmente durante o período de atividade da doença (Takken et al. 2003, 2005, 2008; Alexanderson et al. 2005, 2007; Ravelli et al. 2010). Como consequência dessas alterações, a maior parte dos pacientes relata piora da qualidade de vida (Tarnopolsky, 2011).

Nesse contexto, a suplementação de creatina (Cr) – sabidamente capaz de elevar os conteúdos intramusculares de Cr e PCr em até 20% em indivíduos saudáveis (Harris

et al. 1992) – emerge como potencial estratégia terapêutica nas desordens musculares. A Cr (ácido α -metil guanidino acético) é uma amina de ocorrência natural encontrada primariamente no músculo esquelético e sintetizada endogenamente (~1g/dia) por órgãos como fígado, rins e pâncreas, a partir dos aminoácidos glicina, metionina e arginina (Walker et al. 1976, Harris et al. 1992). Esse composto nitrogenado também pode ser obtido exogenamente por meio da dieta, principalmente pela ingestão carnes vermelhas, frango, peixes e leite humano (obtém-se ~1g/dia de Cr pelos alimentos), ou ainda, via suplementação. No corpo humano, a Cr pode ser encontrada nas formas livres (60 a 70%) e fosforiladas (30 a 40%). Cerca de 95% da Cr total (Cr livre + Cr fosforilada) é armazenada no músculo esquelético, e o restante encontra-se também em células de alta atividade metabólica, como o coração, músculos lisos, cérebro e testículos (Terjung et al. 2000; Walker et al. 1979; Wyss; Kaddurah-daouk, 2000).

1.1. Papel da creatina no músculo esquelético

A Cr exerce uma importante função bioquímica na rápida provisão energética, através da ressíntese de ATP, via doação do grupo N-fosforil advindo da PCr. Essa reação é catalizada pela enzima creatina quinase (CK), a qual está presente em diferentes isoformas em tecidos como o músculo esquelético (isoforma MM-CK) e cérebro (isoforma BB-CK) (Wyss; Kaddurah-Daouk, 2000). Além disso, a Cr é responsável pela transferência energética da mitocôndria (sítio de ressíntese de ATP) para o citosol (sítio de utilização de ATP), razão pela qual é conhecida como “tampão espacial de energia”. Outras importantes funções desse sistema envolvem: a) manutenção da razão ATP:ADP por meio do aumento da respiração mitocondrial, b) a atenuação da elevação de ADP, c) prevenção do estresse oxidativo, d) tamponamento de

íons hidrogênio, e) ativação da glicólise e glicogenólise por meio da liberação de fosfato inorgânico (para detalhes, ver Wyss; Kaddurah-Daouk, 2000). Esse sistema é comumente denominado sistema ATP/CK/PCr.

Dado que 95% do conteúdo total de Cr está armazenado no músculo esquelético, torna-se óbvio o papel ímpar do sistema ATP/CK/PCr no metabolismo desse tecido. Interessantemente, após o estudo pioneiro liderado pelo professor Harris et al. (1992) que demonstrou que a suplementação de Cr (20 g/dia por cinco dias) é capaz de elevar significativamente os conteúdos intramusculares de Cr e PCr, esse suplemento vem sendo efetivamente utilizado com o intuito de aumentar o rendimento físico e esportivo em sujeitos saudáveis e atletas. Diversos estudos têm demonstrado que, em adultos saudáveis, a suplementação de creatina (0,1 a 0,3g/Kg/dia) em curto (~ cinco dias) ou longo prazo (até 24 meses), associada ou não ao treinamento físico, pode aumentar, em média 15% a 35% as concentrações intramusculares de Cr e PCr (Harris et al. 1992; Rawson et al. 2002; Smith et al. 1999). A maior parte desse aumento ocorre nos dois primeiros dias de suplementação (Harris et al. 1992). Em certas condições patológicas, como é o caso de pacientes com fibromialgia, tal aumento pode ser ainda mais expressivo (~80%) (Alves et al. 2013), indicando que a presença de alguma condição clínica pode afetar o modo como o paciente responde à suplementação.

Assim, os achados disponíveis na literatura apontam, consistentemente, para a eficácia desse suplemento no aumento da força, massa magra e melhora do desempenho físico em atividades de alta intensidade e curta duração (Nissen; Sharp, 2003; Hoffman et al. 2005; Volek et al. 1999), além de aumentar a expressão de genes e proteínas relacionados à hipertrofia muscular (Deldicque et al. 2008; Safdar, 2008). Com base nessas evidências, o interesse nos possíveis efeitos terapêuticos da suplementação de Cr

tem crescido vertiginosamente, sendo este um emergente campo de pesquisa e intervenção em pacientes acometidos por um vasto espectro de doenças crônicas debilitantes, caracterizadas por fraqueza muscular, atrofia e disfunções mitocondriais, tais como as miopatias inflamatórias, distrofia muscular e câncer (Kley et al. 2008; Gualano et al. 2009a).

1.2. Efeito da suplementação de creatina nas miopatias

Como visto anteriormente, estudos utilizando a técnica 31P-ERM têm revelado reduções significativas das concentrações intramusculares de PCr em pacientes com miopatias, dentre as quais se destacam: a) distrofias musculares, tais como distrofia de Becker (DMB), distrofia de Duchenne (DMD), distrofia facioescapuloumral e distrofias miotônicas do tipo 1 e 2; b) miopatias inflamatórias, tais como DM e PM, c) miopatias metabólicas, como doença de McArdle; e d) miopatias congênitas e mitocondriais. Nesse contexto, pesquisadores tem avaliado o papel da suplementação de Cr nas desordens musculares, atuando como estratégia não medicamentosa concomitante ao tratamento farmacológico comumente utilizado com esses pacientes (Park et al. 1994; Tarnopolsky; Parise, 1999).

Tarnopolsky e Martin (1999b) reportaram ganhos de massa magra e força muscular em pacientes com distrofia muscular, miopatias inflamatórias e desordens neurológicas periféricas quando suplementados com Cr (5 a 10g/dia) por 11 dias. Em um estudo *crossover* e duplo-cego, Louis et al. (2003) investigaram o efeito da suplementação de Cr (3g/dia por três meses) em 15 pacientes entre seis a 16 anos com DMB e DMD, caracterizadas por atrofia muscular grave e fraqueza, bem como contratura muscular progressiva e rigidez articular. Como resultado, os pesquisadores

verificaram que os pacientes que receberam Cr não demonstraram qualquer alteração na rigidez articular total, porém, melhoraram a contração máxima voluntária (+15%) e praticamente dobraram a resistência à fadiga. Subsequentemente, Tarnopolsky et al. (2004) realizaram um estudo *crossover*, duplo-cego e controlado por placebo com 30 pacientes pediátricos com DMD, os quais foram submetidos à suplementação de Cr (0,1 g/kg/dia) por um período de quatro meses. Após a suplementação de Cr, houve um aumento significativo de massa livre de gordura e força de preensão manual nos pacientes com DMD. Outra condição que poderia ser potencialmente tratada com suplementação de Cr refere-se a doença de McArdle, a qual se caracteriza por deficiência metabólica levando à intolerância ao exercício, fadiga prematura e exacerbada dor muscular induzida por exercício. Vorgerd et al. (2000) conduziram um estudo duplo-cego, *crossover*, controlado por placebo, que demonstrou que a suplementação de Cr por cinco semanas (cinco dias de sobrecarga com 0,15g/kg de peso, seguido por 0,06g/kg de peso até o término do estudo) foi capaz de melhorar a função muscular em pacientes com essa condição.

Quanto às miopatias inflamatórias, o estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo conduzido por Chung et al. (2007) verificou o efeito da suplementação de Cr associada à prática de atividade física sobre a função e capacidade muscular em pacientes adultos com DM e PM. Após seis meses de intervenção, os pacientes que foram suplementados com Cr (oito dias com 20g de Cr/dia seguido por 3g de Cr/dia) apresentaram melhora significativa na função muscular e tolerância ao esforço quando comparados ao grupo placebo. Além disso, foram observados, por meio de 31P-ERM, aumentos nas concentrações intramusculares de PCr. Esses achados sugerem que a combinação da prática de exercícios físicos com a suplementação de Cr

pode ser um tratamento adjuvante eficaz para pacientes adultos com PM e DM (Chung et al. 2007). Entretanto, esses dados não podem ser irrestritamente generalizados para todas as miopatias inflamatórias, em especial na população pediátrica, como é o caso da DM de início juvenil, uma vez que não existem estudos que atentem tal efeito e, portanto, mais investigações se fazem necessárias.

Esses resultados foram confirmados pela metanálise conduzida por Kley et al. (2013), incluindo 14 ensaios clínicos randomizados com 364 pacientes com diversas distrofias musculares. Foi observado que os pacientes apresentaram melhoras clínicas, ganho de força e função muscular, exceto aqueles acometidos pelas distrofias miotônicas tipo 1 e distrofias facioescapuloumral, os quais parecem não ser responsivas à suplementação de Cr. Os efeitos positivos da suplementação com Cr pode ser explicado pelo aumento no conteúdo de Cr e PCr intramuscular, o que pode melhorar o fornecimento de energia e, consequentemente, melhorar a resistência e função musculares (para revisão, ver Gualano et al. 2012). Por outro lado, a suplementação de Cr também tem sido avaliada no metabolismo muscular por ativação de células satélite (Olsen et al. 2006) e fatores de crescimento específicos do músculo (por exemplo, IGF-1, 4EBP-1) (Deldicque et al. 2005). Cabe notar que todos os pacientes apresentaram boa tolerância à suplementação de Cr.

Além dos efeitos benéficos acima descritos, a suplementação de Cr poderia atenuar os efeitos negativos do tratamento em longo prazo com corticosteroide, potente anti-inflamatório comumente empregado no tratamento das miopatias. A corticoterapia, sabidamente, melhora a sobrevida, a atividade da doença e qualidade de vida dos pacientes, contudo, altas doses de corticosteroide por um longo período de tempo pode provocar sérios efeitos deletérios, como, fraqueza muscular, retard de crescimento e

perda de massa óssea (Levy et al. 2010; Tarnopolsky, 2011). Estudos experimentais tem demonstrado que animais tratados com metilprednisolona associada à suplementação de Cr apresentaram maior proporção de fibras musculares do tipo II e maior conteúdo total de Cr nas fibras musculares rápidas, quando comparados aos animais submetidos ao tratamento com corticosteroides sem a coadministração de Cr (Roy et al. 2002). Adicionalmente, Menezes et al. (2007) provaram que a suplementação de Cr reverteu completamente os efeitos atróficos da dexametasona em fibras musculares do tipo I, IIa e IIx. Embora tais achados não possam ser extrapolados para humanos, esse estudo sugere que a Cr possui um grande potencial terapêutico no tratamento de atrofia induzida por glicocorticóide, condição bastante prevalente em pacientes com DMJ.

1.3. Papel da creatina no metabolismo ósseo

Diversos estudos têm demonstrado que pacientes pediátricos com doenças reumatológicas apresentam retardo no crescimento linear ósseo, redução da densidade mineral óssea e aumento da frequência de fraturas (Pereira et al. 1998; Fernandes et al. 2004). Os mecanismos envolvidos nesse processo são multifatoriais e incluem o aumento de citocinas pró-inflamatórias (*e.g.* TNF- α , IL-1 e IL-6), redução dos níveis de atividade física, diminuição da exposição ao sol, ingestão inadequada de cálcio e vitamina D, atraso puberal e uso de fármacos (glicocorticoides, metotrexato e ciclosporina) (Perez et al. 1994). No que tange a DMJ, aproximadamente, 50% dos pacientes apresenta osteopenia ou osteoporose, decorrente da baixa massa óssea e alteração da microarquitetura do tecido ósseo, mesmo antes de iniciar o uso da corticoterapia, situação essa que pode ser agravada pelo diagnóstico tardio da doença ou persistência da atividade da doença (Stewart et al. 2003).

Curiosamente, o osso é um tecido metabolicamente ativo, o qual se encontra em constante renovação pelos processos de modelação e remodelação ao longo a vida (Clarke, 2008). A modelação óssea consiste na mudança da forma e tamanho dos ossos em resposta a estímulos mecânicos e fisiológicos, regulados, principalmente, por hormônios cuja homeostase é fortemente relacionada à idade e à maturação sexual (Teti, 2011). Cabe ressaltar que 90% da massa óssea é adquirida nas duas primeiras décadas de vida, atingindo o pico máximo de massa óssea e resistência óssea (Saggese et al. 2001). Já o remodelamento ósseo é o processo pelo qual o tecido ósseo é constantemente renovado, a fim de manter sua força e homeostase, sob a ação dos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente (Teti, 2011).

Assim, as células do tecido ósseo necessitam de grande aporte energético para que sobrevivam, proliferem e se diferenciem, a fim de manter o desenvolvimento e a reparação tecidual (Gerber et al. 2005). Essa energia provém da glicólise e da fosforilação oxidativa, bem como do sistema ATP/CK/PCr. Dentro das células ósseas, o sistema ATP/CK/PCr expressa diferentes isoformas de CK nos diferentes estágios de desenvolvimento (Wallmann; Hemmer, 1994; Funanage et al. 1992).

Evidências na literatura sugerem ainda que a utilização de Cr em cultura de osteoblastos primários de ratos pode estimular metabolismo, diferenciação e mineralização de osteoblastos, mencionando potencial ação da Cr sobre processos osteometabólicos durante o crescimento e a reparação tecidual *in vivo*. (Gerber et al. 2005). Outros estudos demonstram que a suplementação de Cr pode agir na manutenção de massa óssea em ratos saudáveis (Antolic et al. 2007) e em pacientes com distrofias musculares. Louis et al. (2003) verificaram aumento de 3% da densidade mineral óssea e redução, aproximadamente, de um terço na excreção de marcadores

bioquímicos de reabsorção óssea (*e.g.* colágeno tipo 1 e N-telopeptídeo – NTx) em crianças com distrofia muscular após 12 semanas de suplementação de Cr (3g/dia). Tarnopolsky et al. (2004) observaram importante redução de marcadores do metabolismo ósseo, como o NTx, após 16 semanas de suplementação de Cr (0,1g/Kg de peso/dia) em crianças com DMD sob regime crônico de corticoesteroides. Ambos os estudos ilustram os possíveis benefícios da Cr também sobre a massa óssea. Contudo, nenhuma pesquisa até o presente momento investigou o efeito da suplementação de Cr sob a densidade mineral óssea e metabolismo ósseo de pacientes com DMJ.

1.4. Efeito da suplementação de creatina na função renal

Apesar de diversas evidências assegurarem a eficácia da suplementação de na melhora do desempenho físico esportivo, força e função muscular em indivíduos saudáveis, bem como em algumas doenças, como em miopatias, há uma preocupação acerca da segurança desse suplemento, sobretudo em relação à função renal (Pritchard; Kalra, 1998; Kuehl et al. 1998).

A Cr é espontaneamente convertida, por meio de reação não enzimática, à creatinina. Em humanos, a taxa de degradação de Cr é de aproximadamente 1,6% do estoque total, ou seja, cerca de 2 g de Cr por dia são convertidos em creatinina, que segue pela circulação até os rins para ser excretada pela urina (Snow; Murphy, 2003). Quando o rim funciona de modo normal (ou seja, quando a taxa de filtração glomerular é normal), a creatinina presente no sangue é constantemente direcionada à urina, de tal forma que a concentração sanguínea de creatinina é mantida constantemente baixa, dentro de valores fisiológicos (que, em geral, variam entre 0,9 a 1,5 mg/dl). Sempre que a taxa de filtração glomerular diminui, a taxa de remoção da creatinina do sangue

diminui, e a concentração sanguínea de creatinina aumenta. Dessa forma, o aumento na concentração de creatinina sérica indica redução na taxa de filtração glomerular, o que, em última análise, é entendido como queda na função renal. Sendo assim, o marcador indireto para avaliar a função renal mais comumente utilizado na prática clínica tem sido a concentração de creatinina sérica.

De fato, alguns estudos em humanos demonstraram que a suplementação de Cr pode aumentar as concentrações de creatinina sérica (Poortmans et al. 1997; Robinson et al. 2000), o que poderia ser interpretado como uma redução da função renal. Por outro lado, a maioria dos estudos mostrou aumentos apenas discretos na concentração de creatinina sérica, os quais não ultrapassavam os limites de normalidade desse marcador (Poortmans; Francaux, 1999; Kreider et al. 2003; Poortmans et al. 2005; Gualano et al. 2008). Sendo assim, o uso da creatinina sérica como marcador da função renal não parece ser apropriado quando do uso de Cr suplementar, pois a suplementação de Cr poderá levar ao aumento na formação de creatinina (Gualano et al. 2008). Utilizando-se de outro marcador indireto da função renal, a cistatina C, Gualano et al. 2008 demonstraram que altas doses de Cr por longo período de tempo (10 g/d por três meses) não alterou a filtração glomerular de indivíduos jovens submetidos ao treinamento físico.

Nosso grupo têm demonstrado repetidamente, por meio de técnica padrão-ouro conhecida como *clearance* de ^{51}Cr -EDTA, que altas doses de Cr são seguras e não ocasionam sobrecarga renal em adultos sedentários (Gualano et al. 2008); em indivíduos aparentemente saudáveis com dieta de alto teor proteico (Lugaresi et al. 2013); em um indivíduo com rim único (Gualano et al. 2010), em indivíduos com risco aumentado para desenvolver doença renal crônica como, por exemplo, diabéticos do tipo II

(Gualano et al. 2011), mulheres na pós-menopausa (Neves et al. 2011) e pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de inicio juvenil (Hayashi et al. *in press*).

Por fim, é importante ressaltar que a suplementação de Cr não possui efeitos adversos conhecidos em adultos jovens (Pluim et al. 2010). Entretanto, tendo em vista que não há estudos atestando a segurança da suplementação de Cr em pacientes com DM de início juvenil, faz-se prudente e necessário o acompanhamento da função renal nessa população.

Notadamente, a maioria dos tratamentos para MII juvenil está baseado em estudos observacionais e em experiência clínica, sendo escasso o número de estudos clínicos, randomizados e controlados com esta população (Feldman et al. 2008). Apesar do prognóstico para a DMJ ser frequentemente positivo, diversos pacientes apresentam fraqueza muscular persistente, perda de densidade mineral óssea e atrofia do músculo esquelético, oriundos do curso da própria doença e/ou uso em longo prazo de fármacos (como, por exemplo, prednisona). Nesse sentido, novas estratégias terapêuticas capazes de atenuar os efeitos adversos têm ganhado relevância clínica.

Diante do exposto, portanto, pode-se inferir que há um grande potencial terapêutico da suplementação de Cr em pacientes com miopatias inflamatórias, em especial DM de início Juvenil. Contudo, apenas estudos duplo-cegos, aleatorizados e controlados por placebo poderão confirmar se esse suplemento nutricional é efetivo e seguro também para a população juvenil. Desta forma, torna-se relevante investigar os possíveis efeitos terapêuticos da suplementação de Cr em pacientes com DM de início juvenil.

2. OBJETIVO

Investigar a eficácia e a segurança da suplementação de Cr em pacientes com DM de início juvenil.

2.1. *Objetivos específicos*

- 1) Determinar os efeitos da suplementação de Cr sobre a atividade da doença, qualidade de vida e capacidade física em pacientes com DM de início juvenil;
- 2) Investigar a influência da suplementação de Cr sobre o metabolismo ósseo, composição corporal e marcadores inflamatório em pacientes com DM de início juvenil;
- 3) Investigar a eficácia da suplementação de Cr sobre as concentrações intramusculares de PCr e ATP através de 31P-ERM em pacientes com DM de início juvenil;
- 4) Avaliar a segurança da suplementação de Cr sobre a função renal em pacientes com DM de início juvenil;
- 5) Comparar as concentrações intramusculares de PCr e ATP de pacientes com DM de início juvenil com indivíduos saudáveis.

3. MÉTODOS

O trabalho foi realizado durante o período de Novembro de 2010 a Outubro de 2013 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). A equipe de pesquisa foi composta por quatro médicos reumatologistas e pediatras (Dr^a. Ana Lúcia S. Pinto e Dr^a Fernanda Rodrigues Lima - Reumatologia HC-FMUSP; Prof. Dr. Clóvis Artur da Silva e Dr^a Adriana S. Maluf - Reumatologia Instituto da Criança ICr-FMUSP), responsáveis por recrutar, selecionar e acompanhar os voluntários durante o seguimento. As avaliações de 31P-ERM foram realizadas com supervisão da Dra. Maria C. G. Otaduy (Instituto de Radiologia - INRAD HC-FMUSP). As avaliações de função renal foram realizadas com supervisão de médico nefrologista (Dr. Marcelo Tatit Sapienza - Medicina Nuclear INRAD HC-FMUSP). A densidade mineral óssea e a composição corporal foram avaliadas por meio de densitometria de dupla emissão com fonte de raios-X (DXA), no Laboratório de Metabolismo Ósseo da FMUSP, com supervisão da Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Rodrigues Pereira. Os testes físicos (realizados no Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia - LACRE) foram conduzidos por especialistas treinados. Os recordatórios alimentares e os questionários foram aplicados pela aluna de doutorado Marina Yazigi Solis (Reumatologia HC-FMUSP), que supervisionou todas as etapas experimentais da pesquisa, com orientação do Prof. Dr. Bruno Gualano (EEFE-USP).

3.1. Desenho experimental

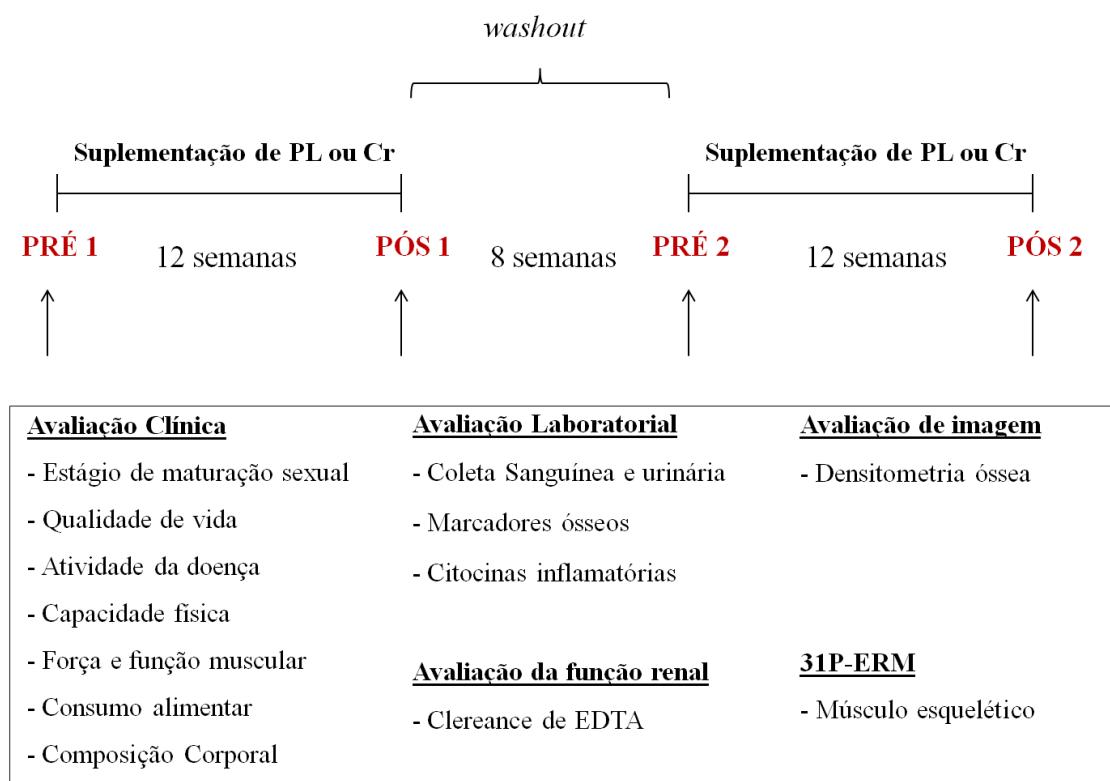
Trata-se de um estudo clínico *crossover*, duplo-cego, contrabalanceado e controlado por placebo. A randomização da ordem dos tratamentos foi estratificada por

força muscular (valores de *leg press*) e estágio de maturação sexual. O período de suplementação (placebo ou Cr) foi de 12 semanas, intercalado por um período de *washout* de oito semanas. O projeto foi inscrito no banco de ensaios clínicos norte-americano *ClinicalTrial* (www.clinicaltrial.gov – registrado como NCT01217320), conforme solicitado pelos principais jornais científicos da área de saúde.

Quinze voluntários com DM de início juvenil foram selecionados para participar deste estudo. Todos os voluntários foram aleatoriamente alocados em uma das seguintes condições: Placebo (PL) ou Creatina (Cr). Ao longo de 12 semanas, um grupo de pacientes com DM de início juvenil foi submetido à suplementação de Cr, enquanto o outro foi submetido à administração de PL. Após oito semanas do término da intervenção, os pacientes que foram submetidos à suplementação de Cr e os que foram com PL, foram suplementados por mais 12 semanas, com PL e Cr, respectivamente. Assim, em um período de oito meses, todos os pacientes foram submetidos a ambos os tratamentos. Todos os voluntários foram orientados a não ingressarem em programas de atividade física sistematizada durante o período de estudo.

Todos os pacientes foram avaliados em relação à atividade da doença, força e função muscular, capacidade aeróbia, qualidade de vida e os possíveis efeitos adversos da suplementação. Além disso, foram realizados exames bioquímicos para verificar a função renal e a atividade de enzimas musculares. A ³¹P-ERM foi realizada para mensuração das concentrações intramusculares de PCr. Todos os exames foram realizados no período inicial (PRÉ 1), após a primeira intervenção (PÓS 1), após o período de *washout* (PRÉ 2) e após a segunda intervenção (PÓS 2). A Figura 1 ilustra o modelo experimental do estudo.

Figura 1. Desenho experimental do projeto.



Abreviação: PL = placebo; Cr = creatina; 31P-ERM = espectroscopia de fósforo por ressonância magnética; PRÉ = pré-intervenção; PÓS = pós-intervenção.

Ademais, foram selecionados 15 voluntários saudáveis, os quais foram denominados grupo controle, sendo pareados por idade com os pacientes de DM de início juvenil. Todos os voluntários foram avaliados quanto à força e função muscular, nível de atividade física, capacidade aeróbica e concentrações intramusculares de PCr apenas no período inicial (PRÉ 1).

3.2. Recrutamento e seleção de voluntários

O recrutamento dos pacientes com DM de início juvenil foi realizado no ICr-FMUSP e no Ambulatório do Instituto Central da FMUSP. Foram considerados

elegíveis pacientes com sete a 21 anos, pré e pós-púberes de ambos os gêneros, diagnosticados com DMJ antes dos 18 anos, de acordo com os critérios descritos por Bohan e Peter (1975), podendo estar em atividade da doença ($n = 5$) ou fora de atividade da doença ($n = 10$) (Lazarevic et al. 2012).

Os pacientes com DM de início juvenil selecionados mantinham estável o tratamento medicamentoso (durante, pelo menos, dois meses anteriores ao início do protocolo e durante todo o período de intervenção), com doses de prednisona inferiores ou igual a 40 mg/dia. Foram considerados critérios de exclusão: 1) macroalbuminúria, 2) taxa de filtração glomerular menor que 30 mL/min/1,73m², 3) uso de contraceptivos hormonais, 4) gravidez, 5) diabetes *mellitus*, 6) hipotiroidismo, 7) amenorreia (ausência de ciclos menstruais consecutivamente por um período superior a quatro meses) e 8) uso de corticosteróides acima de 40 mg/dia. As características demográficas basais, regime de medicamentos utilizados e os parâmetros de atividade da doença dos pacientes com DM de início juvenil antes da intervenção são apresentados na Tabela 1.

O uso de contraceptivo masculino por barreira (camisinha) foi orientado para todos os pacientes atendidos no ICr-FMUSP e no Instituto Central. Se houvesse casos particulares, seria indicado para as pacientes do sexo feminino o uso do contraceptivo de emergência Levonorgestrel (pílula do dia seguinte). Assim, durante o estudo, foram orientados métodos contraceptivos para todos os pacientes, de ambos os gêneros, que mantinham relações sexuais.

Tabela 1. Características demográficas, regime de medicamentos e parâmetros de atividade da doença dos pacientes com DM de início juvenil antes da intervenção

| Paciente | Gênero (F/M) | Idade (anos) | Estágio de Tanner | IPAQ | Tempo de doença (anos) | Dose atual (mg/d)/ Dose cumulativa de prednisona (g) | Uso de outros imunossupressores/ antimaláricos | CMAS | MMT | EVA médico | CPK (U/L) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|----------|------------------------------|--|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <i>Ativo</i> | | | | | | | | | | | |
| 1 | F | 14 | M4P4 | Moderado | 7 | 7,5 / 19 | MTX; Ciclo / HCLQ | 45 | 80 | 3,0 | 143 |
| 2 | M | 17 | G3P3 | Moderado | 5 | 0 / 25,9 | MTX; Ciclo / HCLQ | 41 | 79 | 1,0 | 130 |
| 3 | F | 13 | M5P4 | Baixo | 13 | 0 / 57,4 | MTX / - | 44 | 80 | 2,0 | 70 |
| 4 | M | 13 | G3P4 | Baixo | 2 | 40 / 38,2 | MTX; Ciclo / HCLQ | 46 | 80 | 1,0 | 162 |
| 5 | F | 7 | M1P1 | Moderado | 2 | 5 / 19,8 | MTX / HCLQ | 44 | 80 | 2,0 | 80 |
| <i>Inativo</i> | | | | | | | | | | | |
| 6 | F | 9 | M2P1 | Moderado | 8 | 0 / 6,6 | - | 52 | 79 | 0,0 | 160 |
| 7 | F | 7 | M1P1 | Baixo | 5 | 0 / 11,6 | MTX / - | 49 | 80 | 0,0 | 98 |
| 8 | F | 21 | M5P5 | Moderado | 6 | 5 / 57,9 | MTX; Ciclo / - | 52 | 80 | 0,0 | 287 |
| 9 | M | 15 | G3P3 | Moderado | 9 | 0 / 17,8 | - | 52 | 80 | 0,0 | 584 |
| 10 | F | 11 | M4P4 | Baixo | 8 | 0 / 13,0 | MTX / - | 52 | 80 | 3,0 | 98 |
| 11 | F | 15 | M5P4 | Alto | 10 | 0 / 27,5 | - | 51 | 80 | 0,0 | 65 |
| 12 | F | 11 | M3P3 | Baixo | 11 | 3 / 17,3 | MTX / HCLQ | 51 | 80 | 0,0 | 165 |
| 13 | M | 21 | G4P4 | Moderado | 7 | 0 / 14,6 | MTX / HCLQ | 51 | 80 | 0,0 | 77 |
| 14 | M | 14 | G3P3 | Alto | 9 | 0 / 19,5 | - | 52 | 80 | 2,0 | 75 |
| 15 | F | 13 | M3P3 | Moderado | 8 | 0 / 19,2 | MTX / - | 52 | 80 | 0,0 | 81 |
| Média (dp) | 13 (4) | | | | 7 (3) | 4(10) / 24,4(15,4) | | 48,9 (3,8) | 79,9 (0,4) | 0,9 (1,2) | 151,7 (133,0) |

Abreviação: G = genitália; P = pelos pubianos M = mamas; IPAQ = *International Physical Activity Questionnaire* (versão curta [Klatchoian et al., 2008]); MTX = Metotrexato; Ciclo = Ciclosporina; HCLQ = hidroxicloroquina; CMAS = *Childhood Myositis Assessment Scale*, MMT = *Manual Muscle Testing*, EVA médico = Escala Visual Analógica do médico e CPK = creatina fosfoquinase. Nota: os 5 primeiros pacientes foram considerados em atividade da doença de acordo com os critérios de Lazarevic et al. 2012.

O recrutamento do grupo controle foi realizado por intermédio dos próprios pacientes que participaram do estudo, sendo convidados irmãos, primos, amigos e conhecidos, com idade entre sete a 21 anos, pré o pós-púbere e de ambos os gêneros (oito meninos e sete meninas). Foram considerados critérios de exclusão: 1) presença de DMJ ou qualquer doença autoimune, 2) macroalbuminúria, 3) taxa de filtração glomerular menor que 30 mL/min/1,73m², 4) uso de contraceptivos hormonais, 5) gravidez, 6) diabetes *mellitus*, 7) hipotiroidismo, 8) amenorreia (ausência de ciclos menstruais consecutivamente por um período superior a quatro meses) e 8) uso crônico de imunossupressores.

Na tabela 2 são apresentadas as características antropométricas, capacidade física, força e função muscular no período basal dos pacientes do DM de início juvenil e do grupo controle.

Os pacientes e os voluntários saudáveis (grupo controle) que se adequaram ao perfil supracitado foram convocados mais uma vez, para serem informados sobre todos os detalhes do projeto. Além disso, os pais ou responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação do projeto.

Tabela 2. Dados antropométricos, capacidade física, força e função muscular dos pacientes com DM de início juvenil e do grupo controle

| Variável | Pacientes com DM de inicio juvenil | Grupo controle | p |
|--|---------------------------------------|------------------|-------|
| Peso (Kg) | 51,45 (19,06) | 49,91 (18,19) | 0,64 |
| Estatura (m) | 1,53 (0,16) | 1,55 (0,19) | 0,94 |
| IMC (Kg/m²) | 21,36 (5,19) | 20,04 (3,59) | 0,42 |
| Idade (anos) | 13,53 (4,66) | 14,31 (4,01) | 0,90 |
| 1 RM Leg press (kg) | 34,67 (12,88) | 53,00 (22,32) | 0,02* |
| 1 RM Supino (kg) | 16,07 (10,37) | 24,71 (14,13) | 0,10 |
| Preensão manual (kg) | 20,53 (10,06) | 23,14 (9,89) | 0,64 |
| Timed-Stands (rep) | 16,47 (3,74) | 18,93 (2,02) | 0,05* |
| Timed-Up-And-Go (s) | 5,62 (3,74) | 5,26 (0,42) | 0,14 |
| VO₂ no La (mL/min/kg) | 16,22 (4,65) | 20,21 (3,33) | 0,01* |
| VO₂ no PCR (mL/min/kg) | 25,52 (5,65) | 36,91 (6,84) | 0,01* |
| VO_{2max} (mL/min/kg) | 31,57 (8,54) | 41,77 (5,68) | 0,01* |
| Tempo no La (s) | 348,00 (75,04) | 428,57 (90,71) | 0,03* |
| Tempo no PCR (s) | 594,00 (129,88) | 747,86 (121,98) | 0,01* |
| Tempo de teste (s) | 716,00 (181,73) | 923,57 (141, 78) | 0,01* |

Todos os dados são expressos em média (desvio padrão). O símbolo (*) representa diferença significativa entre as variáveis dos pacientes com DM de início juvenil e o grupo controle. Abreviações: IMC = índice de massa corpórea; La = limiar anaeróbico; PCR = ponto de compensação respiratória; VO₂ = consumo de oxigênio; VO_{2max} = consumo máximo de oxigênio. Nota: 8 voluntários do grupo controle apresentavam nível de atividade física alto e 7 apresentaram nível moderado.

3.3. Consumo alimentar

No período PRÉ 1, PÓS 1, PRÉ 2, PÓS 2, foram conduzidas avaliações nutricionais por meio de recordatórios alimentares em três dias não consecutivos (dois dias úteis e um dia do final de semana), para que a variação da ingestão, que normalmente ocorre neste período, constasse na avaliação. Para auxílio na quantificação das porções alimentares durante o recordatório, foi utilizada uma cartilha com desenhos de utensílios e porções, desenvolvida e validada pela equipe de nutrição do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado a Atividade Motora (Polacow et al. 2003a; Polacow et al. 2003b) e, também, um livro contendo fotos de 100 porções alimentares.

Os recordatórios foram aplicados aos voluntários na presença dos pais e/ou responsáveis, por um nutricionista treinado. Os dados das três avaliações foram tabulados por um único avaliador experiente, com o auxílio do programa Avanutri versão *online*. Foram analisadas as ingestões de energia (em quilocalorias) e macronutrientes (em gramas e porcentagem do total). As quantidades de creatina (g) presentes na dieta foram estimadas com base nas tabelas específicas contendo alimentos fonte de creatina (Harris et al. 1997; Newcomer et al. 1993).

3.4. Suplementação e vendamento

Os suplementos foram providenciados conforme o modelo duplo-cego. A alocação dos pacientes nos grupos foi estratificada por força muscular e maturação sexual. Apenas um pesquisador do estudo, sem contato com qualquer tipo de avaliação e análise dos dados, se responsabilizou pela alocação dos pacientes no estudo. Em uma das condições, os voluntários receberam 0,1 g/kg de peso/dia de Cr monoidrato em pó,

enquanto que na outra, receberam a mesma dose de dextrose. Os suplementos foram entregues em plásticos do tipo *zip lock*, dentro de uma sacola devidamente identificada com o nome do voluntário. Todos os voluntários foram orientados a ingerir o suplemento acompanhado de suco de livre escolha, uma vez ao dia, de preferência após o almoço.

Para confirmar a aderência à suplementação, os voluntários preencheram uma tabela com data e horário da suplementação, bem como foram comunicados a devolverem os plásticos *zip lock* após o consumo do suplemento.

Ao final do estudo, os pacientes foram inquiridos acerca do suplemento ingerido. A porcentagem de acerto foi comparada entre os grupos como forma de assegurar a eficiência do “vendamento” da pesquisa.

3.5. Fosforilcreatina intramuscular

As concentrações intramusculares de PCr foram determinadas por 31P-ERM, utilizando equipamento de corpo inteiro de imagem, por ressonância magnética de 3 Tesla (Achieva Intera, Philips, The Netherlands) e bobina de superfície de fósforo (31P) com diâmetro de 14 cm.

Para seleção do volume muscular, foram adquiridas três imagens nos planos axial, coronal e sagital da perna com a bobina de corpo na frequência de 1H. Para aquisição do espectro, foi utilizada a técnica de voxel único (*single voxel*), com a sequência de pulso *image selected in vivo spectroscopy* (ISIS), tempo de eco (TE) mínimo de 0,62 ms e tempo de repetição (TR) de 4500 ms. O tamanho do voxel foi adaptado ao volume do músculo do paciente e a largura de banda do espectro foi de

3000 Hz, com amostragem de 2048 pontos e 64 repetições. O tempo de aquisição de cada 31P-ERM foi de, aproximadamente, 9 min. Os dados brutos da espectroscopia foram processados incluindo os seguintes passos: apodização, correção de fase e transformada de Fourier. O sinal da PCr foi quantificado em relação ao sinal total do ATP (soma dos picos α -, β -, γ -ATP).

Além disso, também foram realizadas avaliações basais de 31P-ERM em crianças e adolescentes saudáveis (oito meninos e sete meninas), pareados de acordo com a idade dos pacientes com DM de início juvenil que participaram do projeto e finalizaram o protocolo.

3.6. Avaliação do estágio puberal e exames clínicos

A avaliação do estágio de maturação sexual foi realizada por meio do estágio puberal de Tanner (Tanner, 1962). Como padrão das medidas antropométricas (peso e estatura), foi utilizada a curva de crescimento e desenvolvimento da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2007) e foram calculados os escores de desvio-padrão (Z-escores) para nossa amostra (Ogden et al. 2002).

Os dados clínicos específicos da doença, assim como idade de início, tempo de duração e atividade foram obtidos através de revisão de prontuários e entrevista. A avaliação da terapêutica medicamentosa incluiu tempo de utilização, dose atual em miligramas e dose cumulativa (em gramas) de cada um dos medicamentos empregados para controle da doença, a saber: corticosteróides, metotrexato, ciclosporina e gamaglobulina endovenosa. As doses de todos os corticosteróides utilizados

(prednisona, prednisolona e metilprednisolona) foram transformadas em gramas de prednisona, através do cálculo de equivalência entre as drogas.

Nos períodos PRÉ 1, PÓS 1, PRÉ 2 e PÓS 2, foram determinadas a atividade da doença e qualidade de vida por meio de questionários específicos. A atividade da doença dos pacientes com DM de início juvenil foram aferidas através dos seguintes instrumentos: *Childhood Myositis Assessment Scale* (CMAS) - pontuação que pode variar entre 0 a 52 (escores mais altos significam melhor capacidade funcional) (Lovell et al. 1999); *Manual Muscle Testing* (MMT) - pontuação que pode variar entre 0 a 80 (escores mais altos significam melhor capacidade funcional) e *Disease Activity Score* (DAS) - pontuação que pode variar entre 0 a 20 (escores mais altos significam piora da atividade da doença) (Bode et al. 2003), cujas reproduzibilidades já foram comprovadas em um recente estudo realizado por Santiago et al. (2008).

3.7. Avaliação do nível de atividade física, da força e função muscular

Para avaliar o nível de atividade física diária antes e durante o estudo, cada voluntário respondeu ao questionário internacional de atividade física (IPAQ – *International Physical Activity Questionnaire* - versão curta) com o auxílio de um pesquisador treinado, podendo ser classificado em nível de atividade física baixo, moderado ou alto (Katchoian et al. 2008).

A força dinâmica foi avaliada por teste de uma repetição máxima (1 RM). Os pacientes realizaram aquecimento com oito repetições, com um peso leve (50% de 1 RM). Após dois minutos de intervalo, nova série com três repetições foi realizada, com peso moderado (70% de 1 RM). Após três minutos de intervalo, foram realizadas de

três a cinco tentativas para estimar a carga máxima, com três minutos de descanso entre cada tentativa. Os testes foram realizados nos aparelhos *leg press* unilateral e supino horizontal. Além disso, foi avaliada a força de preensão manual (*handgrip*) através de um dinamômetro de mão. O teste foi realizado com a mão dominante do paciente, o qual se manteve em posição ereta e com o braço estendido ao longo do corpo. O paciente realizou o máximo de força de preensão manual no aparelho por cinco segundos. O maior valor obtido dentre três tentativas, separadas por um minuto de intervalo, foi considerado a força de preensão manual.

Para avaliar a função muscular, foi empregado o teste “*Timed-Stands*” adaptado (Newcomer et al. 1993), no qual é contabilizado, em 30 segundos, o número de vezes que o sujeito consegue se levantar e sentar em uma cadeira utilizando apenas os membros inferiores. Já a mobilidade funcional foi avaliada pelo teste “*Timed Up-And-Go*” (Podsiadlo; Richardson, 1991), no qual se avalia o tempo necessário para que o paciente se levante de uma cadeira, caminhe três metros, dê uma volta de 180 graus, e retorne à cadeira. Em cada teste o paciente realiza duas tentativas e o melhor desempenho foi considerado. Além disso, os voluntários passaram por duas sessões de familiarização realizada pelo menos 48 horas antes do teste inicial.

3.8. Avaliação da capacidade aeróbia

Para a determinação dos limiares ventilatórios e potência aeróbia, os pacientes realizaram um teste ergoespirométrico, em esteira rolante (*Centurion 200, Micromed*), seguindo um protocolo em rampa com aumento a cada minuto na carga de trabalho (velocidade e/ou inclinação) até a exaustão, sendo verificada a percepção subjetiva de esforço, com o auxílio da escala de Borg (Borg, 1987), antes e após o período de

suplementação. No dia anterior ao teste, os voluntários receberam por escrito todas as instruções relevantes à execução do teste. Durante o teste, o comportamento cardiovascular foi continuamente avaliado através de eletrocardiógrafo de 12 derivações, com monitoração da FC. Por meio de um ergoespirômetro computadorizado (*Metalyzer modelo III b/breath-by-breath*), a ventilação pulmonar (VE) foi medida a cada expiração; sensores de oxigênio (O_2) e de dióxido de carbono (CO_2) foram utilizados para analisar as frações expiradas de O_2 e CO_2 , respectivamente, a cada ciclo respiratório. A partir das análises da VE e das concentrações dos gases expirados, foram calculados o consumo de oxigênio (VO_2) e a produção de dióxido de carbono (VCO_2). O consumo máximo de O_2 ($VO_{2\text{máx}}$) foi determinado pela média dos últimos 30 segundos obtidos do VO_2 no teste. Os testes foram considerados máximos quando um dos quatro seguintes critérios foram atingidos: 1) platô do VO_2 ; 2) razão de troca respiratória $\geq 1,0$; 3) $FC > 180$ bpm; e 3) $PSE \geq 17$. Os limiares ventilatórios foram determinados com base nas respostas dos equivalentes ventilatórios de O_2 (VE/VO_2) e CO_2 (VE/VCO_2). O limiar anaeróbio ventilatório (LAV) foi considerado como o ponto em que ocorreu abrupto aumento no VE/VO_2 , sem concomitante aumento do VE/VCO_2 . O ponto de compensação respiratório (PCR) foi considerado como a intensidade em que ambos os equivalentes ventilatórios apresentaram aumento similar.

Todos os testes físicos foram realizados no LACRE nos períodos PRÉ 1, PÓS1, PRÉ 2 e PÓS 2 por um único avaliador experiente, sob a supervisão de um médico.

3.9. Avaliação da densidade mineral óssea e composição corporal

A composição corporal foi avaliada por meio de DXA, através do equipamento *Hologic Discovery*. O índice de massa magra e o de massa gorda foi calculado dividindo-se massa magra (kg) ou massa gorda pela altura, em metros quadrados (m^2). A análise do corpo inteiro foi realizada sem considerar a cabeça, a qual pode aumentar a variabilidade da medida em crianças (Pecoraro et al. 2003). Para minimizar possíveis efeitos intervenientes do tamanho do esqueleto em medidas repetidas, foi calculada a densidade mineral óssea aparente (DMOA) dos pacientes. A DMOA foi avaliada dividindo a densidade mineral óssea (DMO) em um determinado local (coluna, fêmur total e corpo inteiro) pela raiz quadrada da área do corpo (AC) correspondente ($DMOA = DMO/\sqrt{AC}$) (Carter et al. 1992; Santiago et al. 2008). Todas as medições foram realizadas pelo mesmo técnico treinado. O erro de precisão para a medida de DMO foi determinado de acordo com as normas estipuladas pela *International Society for Clinical Densitometry protocols* (Baim et al. 2005). A menor variação considerada foi 0,033 g/cm^2 , 0,039 g/cm^2 e 0,010 g/cm^2 para coluna, fêmur total e corpo inteiro, respectivamente.

3.10. Avaliação da capacidade funcional e qualidade de vida

A avaliação funcional da qualidade de vida relacionada à saúde na doença foi feita pelo Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) - pontuação que pode variar entre 0 a 3 (escores mais altos significam piora da qualidade de vida relacionada à saúde na doença), que foi validado para o português por Machado et al. (2001). O questionário pediátrico de qualidade de vida (PedsQL) - pontuação que pode variar entre 0 a 100 (escores mais altos significam melhora da qualidade de vida) - foi utilizado pelos os pacientes e seus respectivos pais/responsáveis, de acordo com as

diferentes faixas etárias dos voluntários: quatro a oito anos, nove a 12 anos e 13 a 18 anos. A avaliação global do paciente, do familiar e do médico foi determinada pela Escala Visual Analógica (EVA), que pontua a doença com notas entre zero (doença inativa) e 10 (doença muito ativa) (Rider et al. 1997).

3.11. Exames laboratoriais, marcadores do remodelamento ósseo e citocinas inflamatórias

Nos períodos de coleta, os pacientes compareceram a enfermaria da Reumatologia em jejum noturno de 12 horas. Foram coletados 15 mL de sangue da veia antecubital para as posteriores análises de sódio, potássio, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (TGP/AST), alanina aminotransferase (TGP/ALT), creatina fosfoquinase (CPK), desidrogenase láctica (DHL), aldolase, proteína C-reativa (pcr) e velocidade de hemosedimentação (VHS). As amostras foram imediatamente centrifugadas a 4°C, 4000 rotações por minuto, durante cinco minutos, e então o plasma foi pipetado e dispensado em *eppendorfs*, congelados e armazenados em freezer - 80°C.

Para a coleta urinária, o paciente foi orientado a desprezar a primeira urina do dia e marcar seu horário. A partir desse momento, ele armazenou toda a diurese em um frasco fornecido pela equipe de pesquisadores, durante 24 horas, até o horário da primeira coleta.

A creatinina sérica foi determinada pelo método colorimétrico de Jaffé. O *clearance* de creatinina foi estimado através da equação de Cockcroft et al. (1976). As dosagens de potássio e sódio plasmático foram realizadas em Fotômetro de Chama. As concentrações de uréia, tanto séricas quanto urinárias, foram mensuradas por método cinético em ultravioleta através da ação da urease, com medida da absorbância em 340

nm. Dosou-se a proteinúria através de método cinético por cloreto de benzetônio e a microalbuminúria foi dosada por meio do método de imunoturbidimetria.

No mesmo dia da realização da densitometria óssea, uma amostra de sangue foi colhida após jejum noturno de 12 horas, centrifugada e armazenada a -80º C no Laboratório de Metabolismo Ósseo (LIM-17 - Disciplina de Reumatologia da FMUSP), para posterior análise das concentrações de telo-peptídeos carboxi-terminais do colágeno tipo I (CTX), pró-peptídeos amino-terminais do pró-colágeno tipo I (P1NP) e das citocinas inflamatórias séricas.

As concentrações de P1NP e CTX, marcadores de formação e reabsorção óssea, respectivamente, foram dosadas no soro por método automatizado de eletroquimioluminescência (E411, Roche Diagnostics®, Mannheim, Alemanha). O limite de detecção do P1NP foi 5 µg/L e o coeficiente de variação (CVs) intra e inter ensaio foi de 2,2% e 1,8%, respectivamente. Já o limite de detecção do CTX foi de 10 ng/L e o CVs intra e inter ensaio foi de 2,5% e 3,4%, respectivamente.

E por fim, as concentrações de citocinas inflamatórias séricas (IL-6, IL-10, IL-17-A, TNF-α e IFN-γ) foram determinadas pela técnica de Luminex xMAP (Millipore, MA, USA). O CVs de IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN-γ foi de 0,32%, 1,15%, 0,17%, 0,23% e 0,81%, respectivamente.

3.12. Clearance de ^{51}Cr -EDTA

A administração do ^{51}Cr -EDTA foi realizada em veia periférica, com atividade de 100 µCi, no volume de 1 mL. A coleta de amostras sanguíneas de 10 mL foi feita no

braço contralateral à injeção do radiofármaco, após 240 e 360 min. As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 min, para separação do plasma.

Amostras de 3 mL de plasma e da solução padrão, obtida pela diluição da mesma atividade (100 μ Ci) em 1000 mL de água, foram analisadas em um contador de poço.

A atividade radioativa das amostras, expressa em contagens por mL, permitiu ajustar a curva exponencial que representou o *clearance* plasmático do radiofármaco. A inclinação da curva (*slope*) representou a taxa de *clearance* de EDTA, ou seja, a percentagem de depuração por unidade tempo ($k = 0,693/t_{1/2}$). O volume de distribuição foi obtido dividindo-se a atividade administrada pela concentração plasmática no tempo zero (intercepto da curva plasmática).

A taxa de *clearance* plasmático multiplicada pelo volume de distribuição do radiofármaco forneceu o *clearance* plasmático em mL/min, sobre o qual foi aplicada a correção para superfície 1,73 m² e a correção de Chantler.

3.13. Cálculo do tamanho da amostra e análise estatística

O tamanho da amostra foi determinado com auxílio do programa G-Power®(versão 3.1.2 – Universitat Kiel, Alemanha). A análise foi conduzida inserindo-se o erro α (0,05), o poder esperado ($1 - \beta = 0,95$) e o *Effect Size* (0,66), este calculado a partir de dados de ganho de força relatados num estudo prévio que investigou os efeitos da suplementação de Cr em jovens com distrofia muscular suplementados com Cr (Louis et al. 2003). O modelamento resultou em uma amostra necessária de 10 participantes, que foi aumentada para 18, dando conta de possíveis desistências ao longo do seguimento.

Foi utilizado o Mixed Model (SAS) para análises de medidas repetidas e, quando pertinente, *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Os grupos e os períodos foram considerados fatores fixos e os sujeitos, definidos como fatores aleatórios.

Foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis clínicas (atividade da doença, capacidade física, função e força muscular) e metabólicas (PCr intramuscular). Também, foi conduzido teste T- *student* para comparação dos dados antropométricos, capacidade física, força e função muscular dos pacientes com DM de início juvenil *versus* o grupo controle, no período basal.

Todos os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e intervalo de confiança. O nível de significância adotado para rejeitar a hipótese nula foi de $p \leq 0,05$.

Análise de sensibilidade post-hoc

Foi realizada análise de sensibilidade *post-hoc* com objetivo de verificar a eficiência da suplementação de Cr. Para identificar se a atividade da doença dos pacientes com DM de início juvenil poderia influenciar no resultado final do estudo, foi conduzida uma subanálise comparando pacientes em atividade da doença ($n=5$) e pacientes sem atividade da doença ($n=10$). Adicionalmente, foi realizada outra análise *post-hoc* levando em consideração a “responsividade” dos pacientes à suplementação de Cr. Nessa análise, foram comparados os pacientes “responsivos” (pacientes que aumentaram o conteúdo intramuscular de PCr) *versus* os “não responsivos” (pacientes que não aumentaram o conteúdo intramuscular de PCr).

Em ambas as situações, o teste T- *student* foi utilizado para comparação entre o delta escore (valores do período PÓS – valores do período PRÉ) dos subgrupos para todos os parâmetros de função muscular. Ainda, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre o delta escore do conteúdo intramuscular de PCr e os parâmetros de função muscular após a suplementação de Cr.

4. RESULTADOS

4.1. *Pacientes*

De acordo com os registros de 2013 do Instituto da Criança e do Ambulatório de Reumatologia do Instituto Central da FMUSP, o número aproximado de crianças e adolescentes diagnosticados com DMJ que frequentam o ambulatório com regularidade correspondia a 107 pacientes. Destes, 20 pacientes se recusaram a participar do estudo, 37 pacientes não puderam ser contatados (via telefone) e 32 pacientes não preencheram os critérios de inclusão [DMJ apenas cutânea ($n = 1$), dose de corticoide $> 40\text{mg}$ ($n = 11$), prática regular de atividade física ($n = 8$), outros ($n = 12$)]. Sendo assim, 18 pacientes foram considerados elegíveis e, portanto, convidados a participar do estudo. Contudo, ao longo do seguimento, três pacientes deixaram o estudo por motivos não relacionados à participação no estudo, totalizando 15 pacientes que finalizaram o estudo (Figura 2).

Durante todo o estudo, dez pacientes não alteraram o regime farmacológico, mantendo a dose estável dos medicamentos utilizados quando fosse o caso. Três pacientes reduziram as doses de prednisona utilizada durante o período de *washout* (paciente #1: 7,5 para 5,0 mg; paciente #8: 5,0 para 2,5 mg; paciente #4: 40 para 20 mg). Dois pacientes tiveram agravamento dos sintomas da doença (durante o período de suplementação de Cr) e então, suas medicações foram alteradas (inclusão de 20 mg e 5 mg de prednisona nos pacientes #10 e #12, respectivamente). Os dados foram analisados com ou sem esses pacientes e os resultados obtidos foram similares, motivo pelo qual reportamos os dados completos.

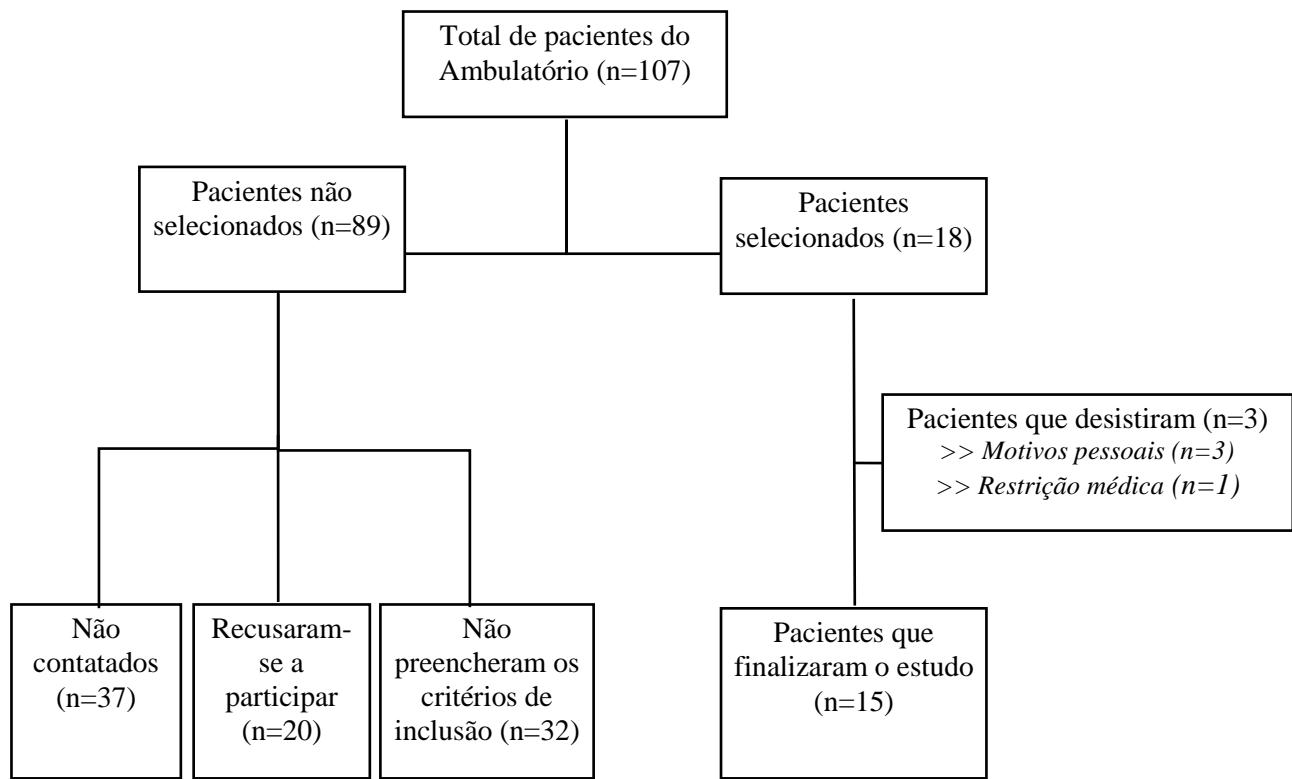


Figura 2. Fluxograma dos pacientes com DM de início juvenil.

4.2. Consumo alimentar

Os dados de consumo alimentar são apresentados na Tabela 3. Não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas ($p > 0,05$).

Tabela 3. Consumo alimentar dos pacientes com DM de início juvenil antes e depois da suplementação de Cr e placebo

| Variável | Creatina | | Placebo | |
|-----------------------------|-----------------|------------|----------------|-------------|
| | Pré | Pós | Pré | Pós |
| Proteína (g) | 19,3 ± 5,2 | 16,5 ± 2,2 | 16,2 ± 4,8 | 16,8 ± 6,3 |
| Carboidratos (g) | 52,0 ± 5,7 | 51,0 ± 3,4 | 50,9 ± 8,3 | 51,5 ± 12,8 |
| Lipídios (g) | 29,7 ± 2,9 | 32,5 ± 4,5 | 32,8 ± 6,3 | 31,8 ± 9,2 |
| Energia total (Kcal) | 1725 ± 320 | 1785 ± 248 | 1887 ± 448 | 1560 ± 606 |
| Creatina (g) | 1,5 ± 1,1 | 1,7 ± 1,5 | 1,3 ± 1,0 | 1,2 ± 1,1 |

Todos os dados são expressos em média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa para nenhuma variável no período basal e entre condições. Abreviações: g = gramas, Kcal = quilocalorias.

4.3. Suplementação e vendamento

Sete pacientes (47%) identificaram corretamente o suplemento que haviam consumido. Destes, cinco pacientes (33,33%) identificaram corretamente o suplemento na condição Cr, ao passo que dois pacientes (13,33%) foram capazes de identificar o suplemento correto na condição placebo ($p > 0,05$ entre as condições). Onze pacientes (73,33%) autorrelataram aderência de 100% à suplementação, enquanto um paciente autorrelatou 50% e três autorrelataram 85% de aderência durante a suplementação.

4.4. Fosforilcreatina intramuscular

A figura 3 apresenta os valores intramusculares de PCr. O conteúdo de PCr intramuscular foi similar entre as condições Cr e placebo no período basal ($p = 0,52$). Não houve diferença entre as condições Cr e placebo (Cr - Pré: 21,4 ± 5,3/ Pós: 20,6 ± 2,7/delta escore = -0,3 ± 2,5 mmol/kg peso úmido/ ES = -0,15; placebo - Pré: 20,4 ±

3,7/ Pós: $20,7 \pm 3,6$ / delta escore = $-0,1 \pm 4,2$ mmol/kg peso úmido/ ES = -0,15; 95% IC parar delta escore = $-2,8 \pm 2,4$ / p = 0,45 para interação entre Cr e placebo).

Além disso, crianças saudáveis avaliadas ($18,76 \pm 2,12$ mmol/kg/ peso úmido) obtiveram valores de PCr intramuscular semelhantes aos pacientes com DM de início juvenil ($20,85 \pm 4,16$ mmol/kg/ peso úmido; p = 0,09).

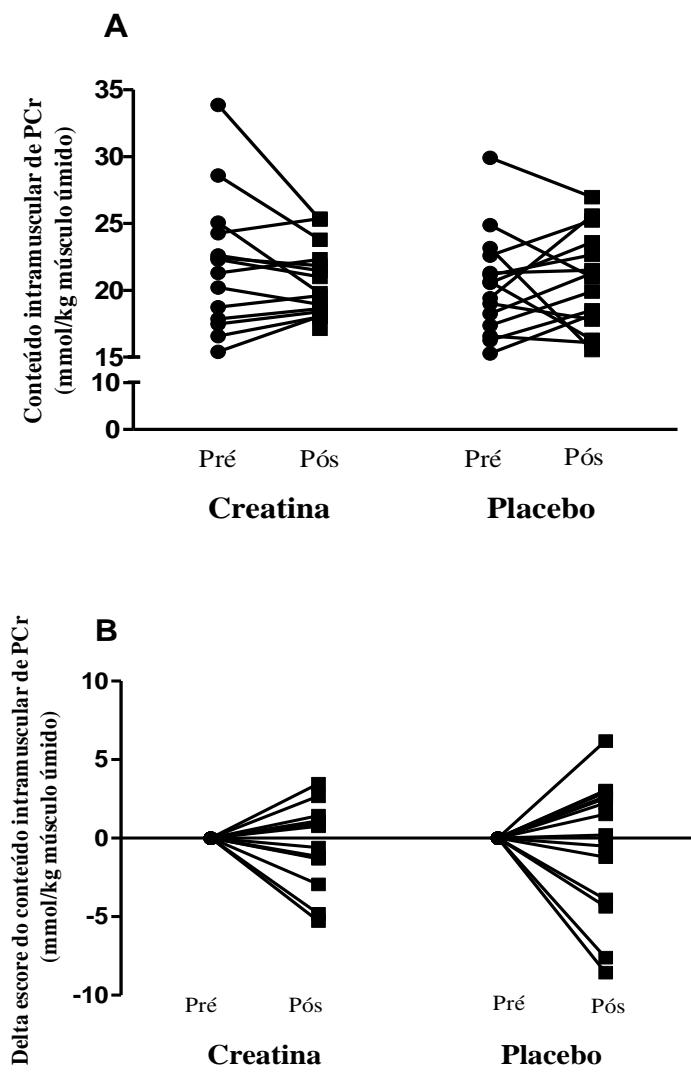


Figura 3. Dados individuais do conteúdo intramuscular de PCr dos pacientes com DM de início juvenil antes e depois da suplementação de Cr e de placebo. A) Valores absolutos e B) Delta escores.

4.5. Função muscular e capacidade aeróbia

A Tabela 4 apresenta os dados referentes à força e função muscular (1 RM de *Leg press*, supino, preensão manual e os testes funcionais “*Timed-Stands*” e o “*Timed-Up-And-Go*”), bem como dados de capacidade aeróbia dos pacientes com DM de início juvenil. Não houve diferença significativa entre as condições no período basal (PRÉ 1) ($p > 0,05$). Houve efeito principal de tempo para as variáveis de 1 RM *Leg press*, 1 RM supino, *hand-grip* e no tempo até exaustão no teste incremental ($p = 0,005$, $p = 0,01$, $p = 0,03$ e $p = 0,01$, respectivamente). Entretanto, não houve nenhum efeito de interação para qualquer variável de função muscular e de capacidade aeróbia ($p > 0,05$).

4.6. Densidade mineral óssea, composição corporal, marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo e citocinas inflamatórias

Os dados de massa óssea e composição corporal são apresentados na Tabela 5. Não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas entre as condições Cr e Placebo (p da interação $> 0,05$). Entretanto, detectou-se efeito principal de tempo para as variáveis, como peso, estatura, massa magra, conteúdo mineral ósseo total, DMOA L1-L4, Z-escore DMO LI-L4 e DMOA corpo inteiro ($p < 0,05$ para todas as variáveis).

Adicionalmente, nenhuma diferença significativa foi encontrada para as concentrações dos marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo, CTX e P1NP, bem como para as concentrações séricas de citocinas inflamatórias ($p > 0,05$). Os dados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 4. Dados de função muscular e capacidade aeróbia dos pacientes com DM de início juvenil antes e após a suplementação de Cr e placebo

| Variável | Placebo | | | | Creatina | | | | Creatina vs. Placebo | | |
|--|-------------|-------------|--------------|-------|-------------|-------------|--------------|-------|----------------------|--------------|------|
| | Pré | Pós | Delta | ES | Pré | Pós | Delta | ES | Dif. Delta | 95% IC | p |
| 1 RM Leg press (kg) £ | 36,6 ± 13,2 | 37,7 ± 13,6 | 1,1 ± 3,5 | 0,08 | 34,7 ± 12,9 | 36,9 ± 14,2 | 2,2 ± 5 | -0,09 | -1,1 | -4,3 a 2,3 | 0,48 |
| 1 RM Supino (kg) # | 15,7 ± 10,5 | 16,8 ± 10,4 | 1,1 ± 2,1 | 0,10 | 16,1 ± 10,4 | 16,6 ± 10,8 | 0,6 ± 1,5 | 0,17 | -0,5 | -0,8 a 1,8 | 0,43 |
| Hand grip (kg) & | 20,2 ± 11,4 | 21,4 ± 10,9 | 1,2 ± 2,9 | 0,11 | 20,5 ± 10,1 | 21,5 ± 10,7 | 1,0 ± 2,5 | 0,10 | -0,2 | -1,8 a 2,2 | 0,84 |
| Timed-Stands (rep) | 17,1 ± 3,3 | 17,3 ± 3,9 | 0,3 ± 1,1 | 0,06 | 16,5 ± 3,7 | 17,5 ± 3,5 | 1,1 ± 1,3 | 0,27 | -0,8 | -1,7 a 0,1 | 0,08 |
| Timed-Up-And-Go (s) | 5,8 ± 0,8 | 5,4 ± 0,7 | -0,0 ± 0,3 | -0,50 | 5,6 ± 0,7 | 5,4 ± 0,7 | -0,2 ± 0,3 | -0,29 | -0,1 | -0,0 a 0,4 | 0,17 |
| VO₂ no La (mL/min/kg) | 15,5 ± 3,8 | 14,5 ± 3,1 | -1,7 ± 3,9 | -0,28 | 16,2 ± 4,6 | 15,3 ± 3,9 | -0,9 ± 4,4 | -0,19 | 1,7 | -3,9 a 1,8 | 0,90 |
| VO₂ no PCR (mL/min/kg) | 26,4 ± 8,6 | 26,4 ± 8,0 | -0,0 ± 3,1 | 0,00 | 25,5 ± 5,6 | 24,5 ± 6,6 | -1,1 ± 4,5 | -0,19 | -0,0 | -3,9 a 1,8 | 0,46 |
| VO_{2max} (mL/min/kg) | 31,3 ± 9,6 | 32,2 ± 9,4 | 0,9 ± 2,6 | 0,10 | 31,5 ± 8,5 | 31,4 ± 9,1 | -0,1 ± 4,8 | -0,02 | -0,9 | -2,9 a 3,4 | 0,45 |
| Tempo no La (s) | 336 ± 71 | 322 ± 62 | -14,0 ± 49,3 | -0,20 | 348 ± 75 | 354 ± 81 | 6,9 ± 59,1 | 0,08 | 14,0 | -20,7 a 60,7 | 0,32 |
| Tempo no PCR (s) | 578 ± 153 | 604 ± 139 | 26,0 ± 67,9 | 0,17 | 594 ± 129 | 586 ± 118 | -8,0 ± 66,6 | -0,06 | -26,0 | -84,3 a 16,3 | 0,17 |
| Tempo de teste (s) § | 738 ± 224 | 780 ± 254 | 42,0 ± 64,8 | 0,19 | 716 ± 181 | 764 ± 191 | 48,0 ± 106,3 | 0,26 | -42,0 | -60,6 a 72,7 | 0,85 |

Todos os dados são expressos em média ± desvio padrão, effect size (ES); diferença entre os deltas, intervalo de confiança de 95% (IC) dos escores delta e o nível de significância (p) entre as condições Cr e placebo (testado pelo modelo misto de medidas repetidas). Não houve diferença significativa para nenhuma variável no período basal. Os símbolos representam efeitos principais de tempo (£ p = 0,005; # p = 0,01; & p = 0,03, e § p = 0,01). Abreviação: Dif. Delta = diferente entre os deltas escores; RM = repetição máxima; rep = repetições; La = limiar anaeróbico; PCR = ponto de compensação respiratória; VO₂ = consumo de oxigênio; VO_{2max} = consumo máximo de oxigênio.

Tabela 5. Dados de massa óssea e composição corporal dos pacientes com DM de início juvenil antes e após a suplementação de Cr e placebo

| Variável | Placebo | | | | Creatina | | | | Creatina vs. Placebo | | |
|--|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|---------------|-------|----------------------|--------------|------|
| | Pré | Pós | Delta | ES | Pré | Pós | Delta | ES | Dif. Delta | 95% IC | p |
| Peso (kg) £ | 50,6 ± 17,7 | 52,9 ± 19,6 | 1,8 ± 3,2 | 0,10 | 51,4 ± 19,1 | 52,6 ± 19,4 | 1,6 ± 1,5 | 0,06 | -1,7 | -2,5 a 1,2 | 0,47 |
| Estatura (cm) # | 153,4 ± 15,4 | 154,3 ± 15,3 | 0,9 ± 1,3 | 0,06 | 153,2 ± 16,4 | 153,8 ± 15,6 | 0,6 ± 1,5 | 0,04 | -0,9 | -1,3 a 0,8 | 0,61 |
| Massa magra (kg) § | 32,9 ± 10,9 | 34,0 ± 11,5 | 0,9 ± 1,2 | 0,09 | 33,3 ± 11,2 | 33,9 ± 11,5 | 0,4 ± 0,9 | 0,05 | 0,5 | -1,3 a 0,3 | 0,46 |
| Massa gorda (kg) | 16,2 ± 9,9 | 17,4 ± 11,0 | 0,9 ± 2,1 | 0,13 | 16,9 ± 10,5 | 17,2 ± 10,7 | 0,3 ± 0,9 | 0,02 | 0,6 | -1,9 a 0,8 | 0,34 |
| Gordura corporal (%) | 30,3 ± 9,7 | 30,9 ± 9,8 | 0,2 ± 2,1 | 0,06 | 31,1 ± 9,7 | 31,2 ± 10,7 | 0,0 ± 1,4 | 0,00 | 0,1 | -1,5 a 1,2 | 0,73 |
| CMO Total (g) + | 1553 ± 485 | 1592 ± 570 | 4,50 ± 48,38 | 0,08 | 1535 ± 501 | 1593 ± 495 | 40,59 ± 40,32 | 0,12 | -6,07 | -27,2 a 39,4 | 0,07 |
| DMOA LI-L4 (g/cm²) Φ | 0,78 ± 0,14 | 0,80 ± 0,15 | 0,01 ± 0,02 | 0,16 | 0,79 ± 0,16 | 0,81 ± 0,16 | 0,01 ± 0,06 | 0,16 | 0,00 | -0,04 a 0,03 | 0,23 |
| Z-escore DMO LI-L4 * | -0,64 ± 1,40 | -0,60 ± 1,41 | 0,03 ± 0,21 | 0,09 | -0,68 ± 1,4 | -0,56 ± 1,41 | 0,09 ± 0,22 | 0,09 | -0,05 | -0,11 a 0,22 | 0,33 |
| DMOA FT (g/cm³) | 0,76 ± 0,17 | 0,79 ± 0,19 | 0,01 ± 0,02 | 0,06 | 0,77 ± 0,17 | 0,78 ± 0,17 | -0,00 ± 0,04 | 0,06 | 0,01 | -0,01 a 0,05 | 0,97 |
| Z-escore DMO FT | -0,98 ± 1,31 | -0,84 ± 1,39 | 0,02 ± 0,23 | 0,00 | -0,96 ± 1,26 | -0,96 ± 1,26 | -2,78 ± 11,74 | 0,00 | 2,80 | -9,0 a 3,4 | 0,79 |
| DMOA CI (g/cm²) ¥ | 0,90 ± 0,12 | 0,91 ± 0,13 | 0,01 ± 0,02 | 0,09 | 0,90 ± 0,12 | 0,92 ± 0,12 | 0,03 ± 0,07 | 0,09 | -0,00 | -0,01 a 0,01 | 0,72 |
| Z-escore DMO CI | 0,20 ± 2,67 | -0,82 ± 1,20 | -0,02 ± 0,15 | -0,18 | -0,75 ± 1,56 | -1,04 ± 1,53 | -0,19 ± 0,47 | -0,18 | -0,17 | -0,03 a 0,06 | 0,77 |

Todos os dados são expressos em média ± desvio padrão, effect size (ES); diferença entre os deltas, intervalo de confiança de 95% (IC) dos escores delta e o nível de significância (p) entre as condições Cr e placebo (testado pelo modelo misto de medidas repetidas). Não houve diferença significativa para nenhuma variável no período basal. Os símbolos representam efeitos principais de tempo (£ p = 0,0028; # p = 0,0062; § p = 0,0024; + p = 0,001; Φ p <0,001; * = p = 0,05; ¥ p = 0,001). Abreviações: CMO = Conteúdo mineral ósseo; DMOA = densidade mineral óssea aparente; FT= fêmur total; CI = corpo inteiro.

Tabela 6. Dados de marcadores do remodelamento ósseo e citocinas inflamatórias dos pacientes com DM de início juvenil antes e após a suplementação de Cr e placebo

| Variável | Placebo | | | | Creatina | | | | Creatina vs. Placebo | | |
|---|---------------|---------------|--------------|-------|---------------|---------------|---------------|-------|----------------------|----------------|------|
| | Pré | Pós | Delta | ES | Pré | Pós | Delta | ES | Dif. Delta | 95% IC | p |
| CTX (ng/mL) | 1,37 ± 0,43 | 1,49 ± 0,55 | 0,12 ± 0,45 | -0,22 | 1,36 ± 0,73 | 1,42 ± 0,65 | 0,06 ± 0,58 | -0,09 | -0,06 | -0,45 to 0,33 | 0,75 |
| P1NP (ng/mL) | 440,7 ± 296,1 | 409,6 ± 285,5 | -31,0 ± 93,0 | 0,11 | 454,6 ± 343,7 | 400,2 ± 309,3 | -54,4 ± 163,9 | 0,18 | -23,39 | -123,1 to 76,3 | 0,63 |
| IL-6 (pg/mL) | 3,24 ± 2,36 | 3,26 ± 2,61 | -0,1 ± 4,2 | 0,08 | 4,26 ± 3,83 | 2,48 ± 2,40 | -1,70 ± 3,58 | 0,46 | -1,6 | 1,78 ± 2,06 | 0,08 |
| IL-10 (pg/mL) | 15,19 ± 15,47 | 14,23 ± 15,53 | -0,1 ± 4,2 | 0,06 | 13,01 ± 13,16 | 13,19 ± 14,83 | 0,18 ± 8,10 | -0,01 | 0,28 | 0,12 ± 6,04 | 0,92 |
| IL-17-A (pg/mL) | 1,35 ± 1,59 | 2,94 ± 2,58 | 1,36 ± 0,41 | -0,99 | 4,77 ± 5,74 | 2,68 ± 2,49 | -2,95 ± 5,6 | 0,36 | -4,31 | -4,32 ± 2,96 | 0,27 |
| TNF- α (pg/mL) | 8,13 ± 4,05 | 7,52 ± 4,17 | -0,1 ± 4,2 | 0,15 | 7,69 ± 3,56 | 7,71 ± 3,82 | 0,02 ± 2,53 | 0,01 | 0,12 | 0,62 ± 1,99 | 0,52 |
| IFN-γ (pg/mL) | 2,99 ± 3,99 | 4,71 ± 8,95 | -0,1 ± 4,2 | -0,43 | 2,58 ± 3,70 | 3,01 ± 2,88 | 0,06 ± 3,06 | -0,12 | 0,16 | -1,49 ± 3,33 | 0,40 |

Todos os dados são expressos em média ± desvio padrão, effect size (ES); diferença entre os deltas, intervalo de confiança de 95% (IC) dos escores delta e o nível de significância (p) entre as condições Cr e placebo (testado pelo modelo misto de medidas repetidas). Não houve diferença significativa para nenhuma variável para ambas as condições. Abreviações: CTX = telo-peptídeos carboxi-terminais do colágeno tipo I; P1NP = pró-peptídeos amino-terminais do pró-colágeno tipo I; IL = interleucina; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ = interferon gama.

4.7. Parâmetros clínicos, capacidade funcional e qualidade de vida

Foi observada melhora significativa para as variáveis CHAQ e CMAS, indicando efeito positivo de ambas as intervenções propostas ao longo de todo o estudo (efeito principal de tempo) ($p < 0.05$). Contudo, não houve nenhuma alteração nos resultados de PedsQL (pacientes e responsáveis), EVA (pacientes/responsáveis e médico), MMT e DAS ($p > 0.05$). Também, não houve nenhuma diferença entre as condições Cr e Placebo para qualquer parâmetro clínico, capacidade funcional e qualidade de vida relacionada à saúde (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros clínicos, capacidade funcional e qualidade de vida dos pacientes com DM de início juvenil antes e após a suplementação de Cr e placebo

| Variável | Placebo | | | | Creatina | | | | Creatina vs. Placebo | | |
|-----------------------------------|----------------|---------------|---------------|-----------|-----------------|---------------|--------------|-----------|-----------------------------|---------------|----------|
| | Pré | Pós | Delta | ES | Pré | Pós | Delta | ES | Dif. Delta | 95% IC | p |
| PedsQL Paciente (0-100) | 82,03 ± 10,35 | 84,43 ± 8,66 | 2,41 ± 8,90 | 0,23 | 80,03 ± 14,08 | 82,20 ± 11,39 | 2,17 ± 12,31 | 0,15 | -0,24 | -8,3 a 7,8 | 0,95 |
| PedsQL responsável (0-100) | 81,93 ± 12,83 | 81,84 ± 12,70 | -0,09 ± 12,06 | -0,01 | 78,05 ± 14,17 | 83,09 ± 11,92 | 5,04 ± 9,91 | 0,36 | 5,13 | -3,1 a 13,4 | 0,21 |
| CHAQ (0-3) # | 0,21 ± 0,39 | 0,13 ± 0,32 | -0,07 ± 0,14 | -0,18 | 0,15 ± 0,34 | 0,10 ± 0,25 | -0,05 ± 0,12 | -0,16 | 0,02 | -0,1 a 0,1 | 0,74 |
| EVA Médico (0-10) | 0,73 ± 1,09 | 0,93 ± 0,93 | 0,20 ± 0,86 | 0,18 | 1,0 ± 1,25 | 0,46 ± 0,74 | -0,53 ± 0,99 | -0,43 | -0,73 | -1,4 a - 0,0 | 0,51 |
| EVA Paciente(0-10) | 1,23 ± 1,42 | 1,10 ± 1,13 | -0,13 ± 0,88 | -0,09 | 1,23 ± 1,14 | 1,33 ± 1,44 | 0,10 ± 1,07 | 0,09 | 0,23 | -0,5 a 0,9 | 0,03 |
| CMAS (0-52) £ | 49,13 ± 4,42 | 50,33 ± 2,71 | 1,20 ± 2,96 | 0,27 | 49,47 ± 2,92 | 50,40 ± 2,19 | 0,93 ± 1,44 | 0,32 | -0,27 | -2,0 a 1,5 | 0,75 |
| MMT (0-80) | 79,73 ± 0,59 | 80,00 ± 0,0 | 0,27 ± 0,59 | 0,45 | 79,73 ± 0,59 | 79,87 ± 0,51 | 0,13 ± 0,83 | 0,22 | -0,13 | -0,7 a 0,4 | 0,61 |
| DAS (0-20) | 2,73 ± 3,61 | 2,20 ± 2,93 | -0,53 ± 2,26 | -0,15 | 2,13 ± 2,03 | 1,53 ± 1,84 | -0,60 ± 1,99 | -0,30 | -0,07 | -1,7 a 1,5 | 0,93 |

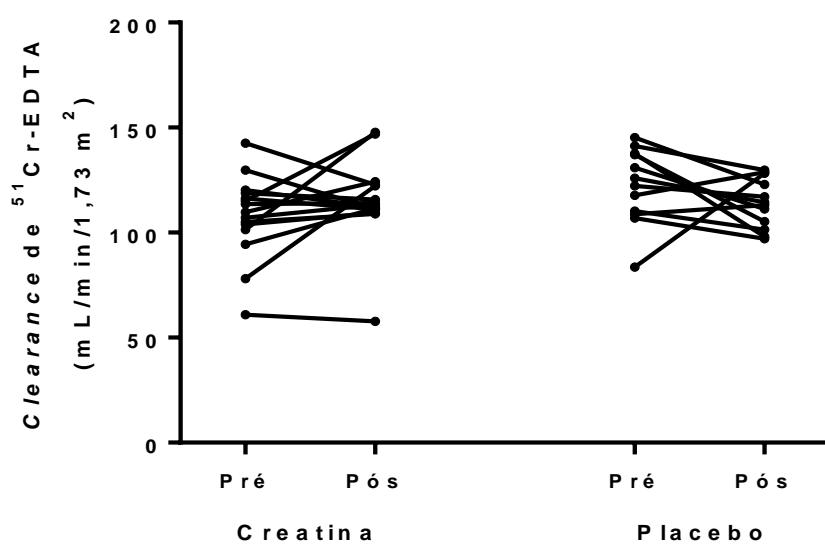
Todos os dados são expressos em média ± desvio padrão, effect size (ES); diferença entre os deltas, intervalo de confiança de 95% (IC) dos escores delta e o nível de significância (p) entre as condições Cr e placebo (testado pelo modelo misto de medidas repetidas). Não houve diferença significativa após ambas intervenções e entre as condições Cr e placebo. Os símbolos representam efeitos principais de tempo (£ p = 0,01; # p <.001). Abreviações: PedsQL= questionário pediátrico de qualidade de vida; CHAQ = *Childhood Health Assessment Questionnaire*; EVA = Escala visual analógica. CMAS = *Childhood Myositis Assessment Scale*; MMT = *Manual Muscle Testing*; DAS = *Disease Activity Score*.

4.8. Exames laboratoriais, função renal e efeitos adversos

Todos os parâmetros laboratoriais, plasmáticos e urinários, dos pacientes com DM de início juvenil ao longo de todo o estudo permaneceram inalterados ($p > 0,05$). A avaliação da função renal pelo *clearance* de ^{51}Cr -EDTA também se manteve estável após ambas as condições. Não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas ($p > 0,05$). Todos os dados são apresentados na Tabela 8 e Figura 4.

Nenhum efeito adverso foi reportado pelos pacientes durante todo o seguimento.

Figura 4. Dados individuais de ^{51}Cr -EDTA dos pacientes com DMJ antes e após a suplementação de Cr e placebo.



Nota: paciente #1 não realizou o exame após a suplementação de Cr, e por isso foi removido desta análise. O resultado do exame da paciente #4 após a suplementação de placebo foi incurável, de acordo com o laudo médico, provavelmente em função da diluição anormal do radiofármaco durante o exame; desta forma, optamos, também, por excluí-la desta análise.

Tabela 8. Exames laboratoriais e função renal dos pacientes com DM de início juvenil antes e após a suplementação de Cr e placebo

| Variável | Placebo | | | | Creatina | | | | Creatina vs. Placebo | | |
|--|-------------|-------------|--------------|-------|-------------|-------------|--------------|-------|----------------------|---------------|------|
| | Pré | Pós | Delta | ES | Pré | Pós | Delta | ES | Dif. Delta | 95% IC | p |
| CPK (U/L) | 161 ± 133 | 167 ± 123 | 6 ± 63 | 0,05 | 160 ± 131 | 196 ± 218 | 36 ± 106 | 0,28 | 32,0 | -35,2 a 96,6 | 0,35 |
| DHL (U/L) | 338 ± 118 | 318 ± 128 | -19,9 ± 130 | -0,17 | 385 ± 150 | 351 ± 118 | -33 ± 117 | -0,22 | 14,0 | -106,5 a 78,9 | 0,35 |
| Aldolase (U/L) | 4,3 ± 1,4 | 4,5 ± 1,8 | 0,1 ± 1,6 | 0,10 | 5,1 ± 2,1 | 4,9 ± 1,9 | -0,2 ± 1,7 | -0,10 | -0,4 | -1,6 a 0,8 | 0,54 |
| pcr (mg/L) | 2,7 ± 3,7 | 2,2 ± 4,1 | -0,5 ± 3,7 | -0,14 | 2,3 ± 4,9 | 2,0 ± 3,5 | -0,3 ± 6,1 | -0,06 | 0,2 | -3,6 a 4,0 | 0,91 |
| TGO/AST (U/L) | 24,2 ± 4,1 | 22,2 ± 4,1 | -2,0 ± 4,6 | -0,48 | 23,6 ± 9,0 | 22,8 ± 5,8 | -0,7 ± 9,9 | -0,08 | 1,3 | -4,5 a 7,0 | 0,65 |
| TGP/ALT (U/L) | 30,0 ± 12,2 | 19,4 ± 8,5 | -1,4 ± 7,0 | -0,11 | 21,9 ± 16,6 | 19,8 ± 6,9 | -2,1 ± 17,6 | -0,13 | -0,7 | -10,8 a 9,3 | 0,88 |
| VHS (mm/Hg) | 10,6 ± 9,0 | 11,8 ± 11,4 | 0,7 ± 7,7 | 0,13 | 9,6 ± 6,7 | 10,2 ± 9,0 | 0,6 ± 7,1 | 0,09 | -0,9 | -5,6 a 5,4 | 0,93 |
| Potássio sérico (mEq/L) | 4,36 ± 0,22 | 4,38 ± 0,29 | 0,02 ± 0,27 | 0,12 | 4,41 ± 0,22 | 4,46 ± 0,29 | 0,06 ± 0,36 | 0,25 | 0,03 | -0,2 a 0,3 | 0,79 |
| Sódio sérico (mEq/L) | 139,6 ± 3,9 | 139,9 ± 1,7 | 0,6 ± 3,4 | 0,10 | 140,3 ± 2,4 | 140,1 ± 2,5 | -0,2 ± 2,5 | -0,08 | -0,87 | -3,1 a 1,4 | 0,58 |
| Ureia urinária (mg/24h) | 17,9 ± 9,2 | 17,1 ± 6,6 | 0,8 ± 11,6 | -0,08 | 14,4 ± 6,9 | 17,1 ± 10,2 | 0,7 ± 3,9 | 0,39 | 1,57 | -5,5 a 8,6 | 0,45 |
| Ureia sérica (mg/dL) | 26,2 ± 10,6 | 27,2 ± 11,6 | 1,0 ± 6,4 | 0,09 | 27,9 ± 11,8 | 27,7 ± 10,2 | -0,85 ± 10,1 | -0,02 | -1,85 | -8,2 a 4,5 | 0,65 |
| Creatinina urinária (g/24h) | 0,78 ± 0,39 | 0,91 ± 0,47 | 0,06 ± 0,36 | 0,31 | 0,83 ± 0,49 | 0,99 ± 0,75 | 0,13 ± 0,52 | 0,32 | 0,02 | -0,4 a 0,4 | 0,89 |
| Creatinina sérica (mg/dL) | 0,57 ± 0,23 | 0,59 ± 0,21 | 0,01 ± 0,09 | 0,05 | 0,63 ± 0,23 | 0,65 ± 0,24 | 0,01 ± 0,08 | 0,09 | -0,00 | -0,1 a 0,1 | 0,96 |
| Proteinúria (g/24h) | 0,11 ± 0,07 | 0,09 ± 0,02 | -0,02 ± 0,08 | -0,23 | 0,10 ± 0,06 | 0,13 ± 0,16 | 0,03 ± 0,19 | 0,51 | 0,05 | -0,1 a 0,2 | 0,63 |
| Albuminúria (mg/L) | 7,9 ± 4,9 | 6,8 ± 4,2 | -1,4 ± 5,1 | -0,33 | 6,4 ± 2,8 | 9,1 ± 4,6 | 2,9 ± 5,6 | 0,94 | 4,34 | 0,3 a 8,4 | 0,09 |
| ⁵¹Cr-EDTA (mL/min/1,73m²) | 121 ± 17 | 110 ± 23 | -6,4 ± 17,7 | -0,63 | 107 ± 19 | 115 ± 20 | 7,5 ± 20,7 | 0,38 | 13,8 | -0,4 a 28,0 | 0,43 |

Todos os dados são expressos em média ± desvio padrão, effect size (ES); diferença entre os deltas, intervalo de confiança de 95% (IC) dos escores delta e o nível de significância (p) entre as condições Cr e placebo (testado pelo modelo misto de medidas repetidas). Não houve diferença significativa entre as condições Cr e placebo. Abreviações: CPK= creatina fosfoquinase; DHL= desidrogenase lática; pcr = proteína C-reativa; TGO/AST = aspartato aminotransferase; TGP/ALT = alanina aminotransferase; VHS = velocidade de hemossedimentação. Valores de referência: CPK: mulheres: 26 a 192 U/L, homens: 39 a 308 U/L; DHL: 240 a 480 U/L; Aldolase: inferior a 7,6 U/L; pcr: inferior a 5,0 mg/L; TGO/AST: mulheres: inferior a 31 U/L, homens: inferior a 41 U/L; TGP/ALT: mulheres: inferior a 31 U/L, homens: inferior a 37 U/L; VHS: 3,1 a 10,7 mm/Hg; Potássio sérico: 3,5 a 5,0 mEq/L; Sódio sérico: 135 a 145 mEq/L; Ureia urinária: 10 a 35 g/vol 24h; Ureia sérica: 10 a 50 mg/dL; Creatinina urinária: 1,04 a 2,35 g/vol 24h; Creatinina sérica: mulheres: 0,50 a 0,90 mg/dL, homens: 0,70 a 1,20 mg/dL; Proteinúria: inferior a 0,15 g/vol 24h; ⁵¹Cr-EDTA: 13-15 anos: 114 +/- 24 mL/min/1,73m², 16-19 anos: 110 +/- 25 mL/min/1,73m².

4.9. Análise de sensibilidade post-hoc

Em análise de sensibilidade *post-hoc*, os pacientes com DM de início juvenil foram subdivididos entre os pacientes que se encontravam em “atividade da doença” (n = 5) e “fora de atividade da doença” (n = 10). Como esperado, os valores de força e função muscular (*leg press, supino, hand grip, Time-stands, Time-up-and-go*), tempo até a exaustão no teste incremental, bem como os escores pontuados pelo DAS, CMAS, EVA médico, PedsQL dos pais foram melhores, no período basal, no grupo de pacientes “fora de atividade da doença” ($p < 0,05$). Entretanto, o conteúdo intramuscular de PCr dos pacientes “fora de atividade da doença” e dos pacientes em “atividade da doença”, antes do início da intervenção, foi similar ($21,1 \pm 5,1$ e $20,6 \pm 3,6$ mmol/kg músculo úmido, respectivamente; $p = 0,83$). É importantemente destacar que todas as variáveis dependentes analisadas não sofreram alteração em ambos os subgrupos, após a suplementação de Cr ou placebo ($p > 0,05$).

Outra subanálise com os pacientes com DM de início juvenil foi realizada de acordo com a responsividade à suplementação de Cr.. Os pacientes “responsivos” à suplementação de Cr (n = 8; média de aumento: +1,5; variação: +0,8 a +3,5 mmol/kg músculo úmido) tiveram aumento significativo do conteúdo intramuscular de PCr quando comparados com o grupo “não responsivo” (n = 7; média de redução: -3,8; variação: -8,6 a -0,6 mmol/kg músculo úmido; $p = 0,001$ entre os subgrupos). Todavia, nenhum parâmetro de função muscular foi significantemente diferente entre os “responsivos” e “não responsivos” ($p > 0,05$). Adicionalmente, a mudança no conteúdo intramuscular de PCr após a suplementação de Cr não foi associado às mudanças nos parâmetros de função muscular ($p > 0,05$; $r = 0,64$ a 0,28). O aumento apenas marginal das concentrações intramusculares de Cr observadas no subgrupo "responsivo" pode explicar a ausência de ganhos funcionais.

5. DISCUSSÃO

O presente ensaio clínico teve como objetivo verificar a eficácia e segurança da suplementação de Cr em pacientes com DM de início juvenil. A intervenção com a suplementação Cr não resultou em nenhuma melhora significativa de força muscular, capacidade funcional, densidade mineral óssea, composição corporal e parâmetros de qualidade de vida relacionados à saúde dos voluntários. Apesar de o protocolo de suplementação de Cr (0,1 g/kg/d por 12 semanas) ter sido bem tolerado e não ter provocado nenhum efeito adverso, essa dose não foi capaz de aumentar o conteúdo intramuscular de PCr em pacientes com DM de início juvenil, o que provavelmente explica a ausência de resultados clínicos positivos.

Já tem sido bem documentado que pacientes com doenças sistêmicas do tecido conjuntivo, como, por exemplo, o lúpus eritematoso sistêmico (Josefson et al. 1996), esclerose sistêmica (Blom-bulow et al. 1983) e artrite reumatoide (Beals et al. 1985) apresentam capacidade física diminuída. Adicionalmente, um grande corpo de evidências tem demonstrado que pacientes com DM e PM também apresentam redução significativa da capacidade física, tanto força muscular quanto resistência aeróbia, devido ao comprometimento das paredes dos vasos endoteliais e à redução dos capilares, resultando em hipoperfusão e isquemia muscular (Karpati; Carpenter, 1993). Pacientes com DMJ podem apresentar redução da capacidade física (aeróbia e anaeróbia) de até 37%, quando comparado a seus pares saudáveis (Hicks et al. 2002; Takken et al. 2005). Ainda, sabe-se que pacientes em atividade da doença apresentam capacidade física显著emente reduzida quando comparados àqueles em remissão (Takken et al. 2008). No presente estudo, resultados similares quanto à capacidade física foram encontrados. Os pacientes com DM de início

juvenil apresentaram redução de, aproximadamente, 24% da capacidade aeróbia e 13% da capacidade funcional (avaliada pelo *Timed-Stands* teste) quando comparados aos indivíduos saudáveis. Também observou-se diferença significante para os parâmetros de força e função muscular (*leg press*, supino, *hand grip*, *Time-stands*, *Time-up-and-go*) e capacidade aeróbia (tempo até a exaustão no teste incremental) capacidade física entre os pacientes com e sem atividade da doença

Tem sido demonstrado que pacientes pediátricos com PM e DM, em atividade da doença apresentam redução de 35-40% nas concentrações intramusculares ATP e PCr quando comparados a pacientes em remissão e indivíduos saudáveis, os quais apresentavam concentrações intramusculares de ATP e PCr similares entre si (Park et al. 2004; 2008). Esses achados poderiam explicar a piora na capacidade anaeróbia, fadiga muscular, intolerância à atividade física e qualidade de vida nessa doença, especialmente durante o período de atividade da doença (Takken et al. 2003, 2005, 2008; Alexanderson et al. 2005, 2007; Ravelli et al. 2010). Nesse tocante, o emprego da suplementação de Cr poderia redundar em benefícios clínicos, caso fosse capaz de aumentar as concentrações intramusculares de Cr e PCr.

A Cr é uma amina de ocorrência natural sintetizada endogenamente (~1g/dia) e obtida exogenamente (~1g/dia) através da dieta, principalmente em carnes vermelhas, frango, peixes e leite humano, e ainda, via suplementação. A Cr exerce papel ímpar na rápida provisão energética, através da ressíntese de ATP, via doação do grupo N-fosforil advindo da PCr (Walker et al. 1976, Harris et al. 1992). Dado que 95% do conteúdo total de Cr (Cr livre + Cr fosforilada) está armazenado no músculo esquelético, torna-se evidente a importância do sistema ATP/CK/PCr no metabolismo desse tecido, especialmente em condições em que o

metabolismo energético muscular apresenta-se comprometido, como nas miopatias (Tarnopolsky; Martin, 1999b; Chung et al. 2007).

De fato, a suplementação de Cr tem emergido como uma potencial estratégia terapêutica numa ampla variedade de doenças/condições caracterizadas por fraqueza muscular e diminuição de massa muscular, tais como miopatias (Tarnopolsky; Martin, 1999; Chung et al. 2007), diabetes *mellitus* tipo 2 (Gualano et al. 2011), osteoartrite (Neves et al. 2011), fibromialgia (Alves et al. 2013), câncer (Bourgeois et al. 2008) e idosos (Gualano et al. 2014). Entretanto, não se podem extrapolar os dados desses estudos, que avaliaram a população adulta, para crianças e adolescentes. No que tange à população pediátrica, dados de uma meta-análise com seis estudos clínicos controlados indicaram uma melhora da função muscular (+ 8,47%) em pacientes com distrofias musculares (Kley et al. 2013). De acordo com os autores, essa melhora está associada ao aumento de massa magra (+0,63 Kg) observado nos pacientes. Com base em observações prévias na literatura, poder-se-ia esperar mudanças benéficas na composição corporal após a suplementação de Cr (Tarnopolsky et al. 2004). Por exemplo, Bourgeois et al. (2008) demonstraram que 16 semanas de suplementação de Cr (0,1 g/kg/d), como parte de um protocolo de manutenção da quimioterapia, resultou na atenuação do acúmulo de gordura corporal em crianças com leucemia linfoblástica aguda tratadas com corticosteroides. Além disso, Tarnopolsky et al. (2004) relataram maiores ganhos de massa magra em pacientes com DMD suplementados com Cr (0,1 g/kg/por 16 semanas), em comparação aos controles saudáveis. Tendo em vista que os pacientes com DMJ podem apresentar perda de força e de função musculares, acúmulo excessivo de gordura corporal e perda de massa magra (Ravelli et al. 2003, 2004; Lilleby et al. 2007), especulamos que a suplementação de Cr pudesse mitigar essas indesejáveis características.

Em contraste com nossa hipótese inicial, o resultado do presente estudo não demonstrou nenhuma alteração na força, função muscular e composição corporal, sugerindo que a suplementação de Cr é ineficaz em pacientes com DM de início juvenil com doença ativa e inativa. A explicação mais plausível para a ausência de resultados "positivos" refere-se à incapacidade da suplementação de Cr em aumentar suficientemente o conteúdo intramuscular de PCr. De fato, tal argumento tem sido postulado como a principal razão para o insucesso de ensaios clínicos envolvendo a suplementação de Cr (Tarnopolsky et al. 2004). Tem-se, consistentemente demonstrado, que um aumento intramuscular de Cr e/ou PCr induzidos pela ingestão dietética de Cr melhora a produção e transporte de energia através do sistema ATP/CK/PCr, resultando em melhorias na função muscular em indivíduos saudáveis ou não (Wallimann et al. 2011; Gualano et al. 2012). Além disso, o aumento intramuscular de Cr e/ou PCr tem sido associado com a estimulação de vias intracelulares, como por exemplo, a ativação de células satélites e fatores de crescimento muscular (*e.g.*, IGF-1, 4EBP-1), os quais estão associados à síntese de proteína, o que poderia, em última análise, propiciar aumentos de massa magra (Deldicque et al. 2005, 2007).

Diante da ausência de resultados "positivos", especula-se que alguns fatores intrínsecos e extrínsecos, como, por exemplo, dose de Cr administrada, nível de atividade física dos pacientes, conteúdo inicial de PCr e características específicas da própria população, poderiam ter levado à incapacidade da suplementação de Cr em aumentar suficientemente o conteúdo intramuscular de PCr.

Diversos estudos têm demonstrado que a suplementação de creatina (0,1 a 0,3g/Kg/dia) em curto (cerca de cinco dias) ou longo prazo (até 24 meses), associada ou não ao treinamento físico, pode aumentar as concentrações intramusculares de Cr e PCr. Em adultos saudáveis, esse aumento varia, em média, de 15% a 35% (Harris et al. 1992; Rawson

et al. 2002; Smith et al. 1999). Interessantemente, há algumas evidências que indicam que a suplementação de Cr em doses mais baixas do que aquela utilizada em nosso estudo (0,075 a 0,1 g/kg/d) são suficientemente capazes de aumentar o conteúdo intramuscular de PCr em indivíduos jovens e saudáveis (Hultman et al. 1996), em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (Gualano et al. 2011) e em idosos (Rawson et al. 2002). Em contrapartida, protocolos com dosagem de Cr semelhante à empregada nesses estudos (0,15 g/kg/d) não foram capazes de elevar significativamente o conteúdo muscular de PCr em pacientes com distrofia muscular de Becker (Zangue et al. 2002) e miopatias metabólicas (Kornblum et al. 2005).

Durante a atividade física, diversas alterações fisiológicas e metabólicas ocorrem, incluindo distribuição e utilização de substratos energéticos, por vias anaeróbias ou aeróbias, dependendo do tempo e intensidade do esforço realizado. Zange et al. (2002) verificaram, por meio de ³¹P-ERM, que indivíduos praticantes de atividade física regular apresentaram aumento significativo das concentrações intramusculares de PCr:ATP após a suplementação de Cr, quando comparados a indivíduos sedentários. Tarnopolsky (2004) especula que a atividade física poderia ser um fator que contribui para otimizar a captação de Cr muscular. Assumindo que essa hipótese seja verdadeira, poder-se-ia aventar a possibilidade de que o estilo de vida inativo, adotado pela maioria dos pacientes com DM de início juvenil, explicaria, parcialmente, a resposta ineficaz à suplementação de Cr encontrada em nosso estudo. No entanto, pacientes com fibromialgia, que normalmente são hipoativos, parecem ser altamente responsivos à suplementação de Cr no que tange ao aumento do conteúdo intramuscular de PCr (Alves et al., 2013), sugerindo que a atividade física tem um papel secundário (se algum) na captação de Cr frente à suplementação de Cr.

No músculo esquelético, a resposta à suplementação de Cr depende de diversos fatores. como aqueles supracitados, mas também dos níveis iniciais de Cr e PCr intramusculares. No

estudo de Harris et al. (1992), observou-se maior aumento intramuscular de Cr e PCr naqueles indivíduos que apresentavam baixas concentrações intramusculares desses substratos antes da suplementação. Portanto, os indivíduos com maiores concentrações iniciais de Cr intramuscular foram os que menos responderam à suplementação. Esses resultados sugerem que, em condições não patológicas, existe um limite máximo de concentração de Cr que o músculo humano é capaz de atingir, o que pode ser entendido como um "ponto de saturação" (Spillane et al. 2009). Sendo assim, é possível que indivíduos submetidos a uma dieta rica em creatina já apresentem concentrações intramusculares de Cr próximas a esse ponto de saturação, o que provavelmente os tornaria não responsivos (ou pouco responsivos) à suplementação de Cr. No presente estudo, em uma subanálise realizada com os pacientes com DM de início juvenil de acordo com a responsividade à suplementação de Cr, verificou-se que os pacientes "responsivos" à suplementação de Cr ($n = 8$) apresentaram aumento médio de PCr intramuscular de +1,5 mmol/kg músculo úmido. Já os pacientes "não responsivos" ($n = 7$) apresentaram redução média -3,8 mmol/kg músculo úmido ($p < 0,05$ entre os subgrupos). Contudo, nenhum parâmetro de função muscular foi significantemente diferente entre os "responsivos" e "não responsivos" ($p > 0,05$). Isso indica que a mudança no conteúdo intramuscular de PCr após a suplementação de Cr não foi suficientemente marcante a ponto de promover mudanças nos parâmetros de função muscular.

Esperava-se, neste estudo, que os pacientes com DM de início juvenil em atividade da doença apresentassem conteúdos intramusculares de PCr menores do que aqueles em remissão, bem como do que aqueles em indivíduos saudáveis (Park et al. 2004; 2008). Entretanto, os pacientes com DM de início juvenil apresentaram valores similares de conteúdo intramuscular de PCr quando comparados com seus pares saudáveis ($20,85 \pm 4,16$ versus $18,76 \pm 2,12$ mmol/kg/ peso úmido, respectivamente, $p = 0,09$). Também não houve

diferença no conteúdo intramuscular de PCr dos pacientes com ou sem atividade da doença ($20,6 \pm 3,6$ versus $10,21,1 \pm 5,1$ mmol/kg músculo úmido, respectivamente, $p = 0,83$) no período basal. Tal similaridade nas concentrações intramusculares de PCr é difícil de ser explicada e reabre a discussão se pacientes com DM de início juvenil apresentam, de fato, redução nas concentrações de substratos fosfagênicos, ao que se atribui a redução na tolerância ao esforço e, sobretudo, capacidade anaeróbia nesses pacientes.

Tem-se, também, postulado que uma possível diferença "intrínseca" no músculo esquelético poderia ser responsável pela aparente incapacidade de alguns pacientes em aumentar o conteúdo de Cr intramuscular em resposta à suplementação de Cr. A esse respeito, por exemplo, demonstrou-se que o músculo distrófico pode apresentar uma redução da expressão da proteína transportadora de Cr em até 60%, quando comparado com músculos saudáveis (Tarnopolsky et al. 2000). Adicionalmente, essa população pode apresentar pior utilização (captação e liberação) de Cr (Fitch et al. 1969), o que provavelmente contribui para a redução da capacidade em responder à suplementação de Cr em distrofinopatias. Os mesmos autores discutem a importância, na presença dessas condições, de aumentar a dose de Cr administrada e o tempo de intervenção. O fato de os pacientes com DM de início juvenil não responderem à suplementação de Cr sugere que algumas anormalidades do metabolismo da Cr também poderiam ocorrer nessas doenças. Todavia, o conteúdo intramuscular de PCr foi comparado entre indivíduos saudáveis e pacientes com DM de início juvenil, e não foi observada diferença significante entre eles, sugerindo um metabolismo normal de Cr em ambas as condições. No entanto, a presente amostra da pesquisa foi composta por pacientes em remissão ou com atividade leve da doença, de modo que não se pode descartar a possibilidade de que pacientes com comprometimento muscular mais grave possam apresentar um declínio no conteúdo intramuscular de PCr, como demonstrado anteriormente com DMJ (Park et al. 2008). Finalmente, é importante ressaltar

que, segundo nosso conhecimento, não há nenhum estudo que ateste a eficácia da suplementação de Cr no aumento das concentrações intramusculares de Cr e/ou PCr em crianças saudáveis. Na ausência desses dados, permanece incerto se as doses utilizadas em indivíduos adultos são adequadas para se obter aumentos significativos no conteúdo intramuscular de Cr/PCr em populações pediátricas.

Em divergência com observações prévias (Louis et al. 2003), a suplementação de Cr não aumentou a massa óssea, tampouco melhorou a composição corporal e o perfil de marcadores ósseos dos pacientes com DM de início juvenil. Louis et al. (2003) demonstraram que a suplementação de Cr (3 g/d por três meses) foi capaz de aumentar a densidade mineral óssea em 3,9% e reduzir as concentrações do marcador da reabsorção óssea N-telopeptídio de colágeno tipo I (NTx) urinário em 19% a 33% em pacientes com distrofia de DMD e Becker sob tratamento com corticoide. Um ano depois, um estudo de Tarnopolsky et al. (2004), com pacientes com a mesma distrofia muscular, sob mesmo tratamento, não verificou aumento da densidade mineral óssea após a suplementação de Cr (0,1 g/kg/d por quatro meses). Tais resultados contraditórios são difíceis de serem explicados, considerando as divergências das amostras em questão. Tendo em vista a frequente redução de massa óssea observada em DMJ (Santiago et al. 2008) e o aumento do risco de fraturas (Leblanc et al. 2014), estudos com maior tempo de seguimento continuam necessários para testar o potencial terapêutico da suplementação de Cr sobre a massa óssea. Ainda, cabe ressaltar que algumas variáveis, como peso, estatura, massa magra, conteúdo mineral ósseo total, DMOA L1-L4, Z-escore DMO LI-L4 e DMOA corpo inteiro, sofreram alteração ao longo de toda a intervenção (efeito principal de tempo), possivelmente devido ao crescimento e desenvolvimento dos pacientes com DM de início juvenil que completaram o estudo.

Outro possível efeito benéfico da suplementação de Cr ainda pouco explorado na literatura diz respeito à produção de citocinas pró-inflamatórias. Alguns autores têm sugerido que a suplementação de Cr poderia atenuar a produção de marcadores inflamatórios, como TNF- α e proteína C-reativa, após um estímulo estressor (Santos et al. 2004; Deminice et al, 2013). Outros falharam em encontrar qualquer efeito positivo (Silva et al. 2013). Adicionalmente, sabe-se que os pacientes com DMJ apresentam quadro de inflamação sistêmica e intramuscular, representado pelo aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (*e.g.* TNF- α , IL-1 α e IL-1 β (Caproni et al. 2004; Maillard et al. 2005). Contudo, no presente estudo, a suplementação de Cr não promoveu nenhuma alteração nas concentrações séricas de citocinas inflamatórias. Possivelmente, este fato se deu pela ausência dos níveis séricos elevados no período basal dos pacientes com DM de início que, em sua maioria, encontrava-se fora de atividade da doença ou ainda em atividade leve.

Apesar da ausência de eficácia da suplementação de Cr, a intervenção foi bem tolerada e não provocou deterioração da função renal ou outro evento adverso. Em contraste com alguns estudos de caso, que sugerem que a suplementação de Cr pode ser responsável por uma diminuição da função renal, um número crescente de evidências, em diversas faixas etárias e em uma ampla variedade de populações, têm consistentemente refutado essas alegações (Gualano et al. 2008, 2009, 2011; Neves et al. 2011; Alves et al. 2013; Lugaresi et al. 2013; Hayashi et al. *in press*). O presente estudo contribui para a literatura fornecendo evidências consistentes de que a suplementação de Cr não afeta a função renal, avaliada por marcadores séricos e urinários, bem como a taxa de filtração glomerular (utilizando a técnica padrão-ouro, o clearance de ^{51}Cr -EDTA) em pacientes com DM de início juvenil. Entretanto, novos estudos devem ser realizados em populações pediátricas saudáveis.

Finalmente, é importante ressaltar que o nosso estudo possui limitações. Primeiramente, a amostra foi composta por pacientes com características bastante singulares (doença em remissão ou com atividade leve, idade variável, dose estável de terapia medicamentosa). Tendo em vista que a DMJ é uma doença heterogênea, com um vasto e diversificado espectro de sintomas, o presente resultado não pode ser extrapolado para todos os pacientes com DM de início juvenil, especialmente com sintomas mais severos da doença. Em segundo lugar, é sabido que o efeito da suplementação Cr é mais pronunciado em combinação com um programa de treinamento de força. De acordo com os dados publicados por Chung et al. (2007), a suplementação de Cr, associada ao treinamento físico supervisionado, foi capaz de melhorar capacidade física dos pacientes adultos com DM. Sendo assim, acredita-se que o efeito benéfico encontrado nesta população ocorreu devido à combinação da suplementação de Cr ao treinamento físico. Portanto, ensaios clínicos adicionais devem testar o possível efeito sinérgico da suplementação de Cr e do exercício físico na tentativa de atenuar a disfunção muscular na população pediátrica. Em terceiro lugar, não foi possível incluir um grupo controle que realizasse a suplementação de Cr. Como não existe nenhuma pesquisa que tenha demonstrado a típica resposta à suplementação de Cr em crianças saudáveis, ainda não se sabe qual o melhor protocolo de suplementação de Cr que garanta aumento significativo do conteúdo intramuscular de Cr/PCr na população pediátrica, em especial, em condições patológicas como nas miosites. Em quarto lugar, foi além do escopo do presente projeto determinar um possível efeito de "dose-resposta" da suplementação de Cr em pacientes com DM de início juvenil. Estudos com indivíduos jovens e idosos demonstraram que a suplementação de Cr não induz *downregulation* do transportador de Cr (Tarnopolsky et al. 2003), sugerindo que o potencial benefício de doses mais elevadas de Cr pode ser explorado em futuros estudos. No entanto, em um ensaio clínico prévio, a suplementação de Cr em doses mais altas agravou os principais sintomas

clínicos de intolerância ao exercício em pacientes com a doença de McArdle (Vorgerd et al. 2002). Com base nesse e em outros dados da literatura, Vorgerd et al. (2002) sugeriram que a dose de Cr eficaz e livre de efeitos adversos situa-se entre 0,06 e 0,15 g/kg/d em pacientes com a doença de McArdle. Entretanto, a investigação da dose ideal da suplementação de Cr em pacientes com DM de início juvenil continua sendo necessária. Finalmente, o tempo de segmento adotado no estudo em questão pode ter sido insuficiente para detectar mudanças em parâmetros como, por exemplo, massa óssea. De fato, houve uma tendência no aumento do CMO total após a suplementação de Cr ($p = 0,07$), sugerindo que a suplementação de Cr a longo prazo (e.g. ≥ 1 ano) poderia ocasionar efeitos mais expressivos sob a massa óssea. Ainda, estudos com longo período de segmentação se fazem necessários para promover conclusões definitivas da eficácia da suplementação de Cr na DMJ.

Em suma, um protocolo de 12 semanas de suplementação de Cr monohidrato a 0,1 g/kg/d foi bem tolerado e livre de efeitos adversos, mas não afetou o conteúdo de PCr intramuscular, a função muscular, a composição corporal ou parâmetros relacionados à qualidade de vida nos pacientes com DM de início juvenil em remissão com leve atividade da doença.

6. REFERÊNCIAS

- Alexanderson H, Lundberg IE. The role of exercise in the rehabilitation of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17:164-71.
- Alexaderson H, Dastmalchi M, Esbjörnsson-Liljedahl M, Opava CH, Lundberg IE. Benefits of intensive resistance training in patients with chronic polymyositis or dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 2007;57(4):768-77.
- Al-Mayouf SM, Al-Eid W, Bahabri S, Al-Mofada S. Interstitial pneumonitis and air leakage in juvenile dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford).* 2001; 40: 588-90.
- Alves CR, Santiago BM, Lima FR, Otaduy MC, Calich AL, Tritto AC, de Sa Pinto AL, Roschel H, Leite CC, Benatti FB, Bonfá E, Gualano B. Creatine supplementation in fibromyalgia: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Care Res.* 2013;65(9):1449-59.
- Antolic A, Roy BD, Tarnopolsky MA, Zernicke RF, Wohl GR, Shaughnessy SG, et al. Creatine monohydrate increases bone mineral density in young Sprague-Dawley rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39: 816-20.
- Baim S, Wilson CR, Lewiecki EM, Luckey MM, Downs RW, Jr., Lentle BC. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry: position paper of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom.* 2005;8:371-78.
- Blom-Bülow B, Jonson B, Bauer K. Factors limiting exercise performance in progressive systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 1983 ;13:174-81.
- Bode RK, Klein-Gitelman MS, Miller ML, Lechman TS, Pachman LM. Disease activity score for children with juvenile dermatomyositis: reliability and validity evidence. *Arthritis Rheum* 2003; 49: 7-15.

Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975; 292:403-407.

Borg G, Hassmen P, Lagerström M. Perceived exertion related to heart rate and blood lactate during arm and leg exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1987;56(6):679-85.

Bourgeois JM, Nagel K, Pearce E, Wright M, Barr RD, Tarnopolsky MA. Creatine monohydrate attenuates body fat accumulation in children with acute lymphoblastic leukemia during maintenance chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51:183-87.

Caproni M, Torchia D, Cardinali C, Volpi W, Del Bianco E, D'Agata A, Fabbri P. Infiltrating cells, related cytokines and chemokine receptors in lesional skin of patients with dermatomyositis. *Br J Dermatol*. 2004;151:784-91.

Carter DR, Bouxsein ML, Marcus R. New approaches for interpreting projected bone densitometry data. *J Bone Miner Res*. 1992;7:137-45.

Chung Y, Alexanderson H, Pipitone N, Morrison C, Dastmalchi M, Ståhl-Hallengren C et al. Creatine supplements in patients with idiopathic inflammatory myopathies who are clinically weak after conventional pharmacologic treatment: six-month, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* 2007; 57: 694-702.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3:131-9.

Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Second Edition. New York: Lawrence Erlbaum Associates; 1988.

Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16:31-41.

Deldicque L, Louis M, Theisen D, Nielens H, Dehoux M, Thissen JP, Rennie MJ, Francaux M: Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc*. 2005;37:731-36.

Deldicque L, Theisen D, Bertrand L, Hespel P, Hue L, Francaux M. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293:1263-71.

Deldicque L, Atherton P, Patel R, Theisen D, Nielens H, Rennie MJ, Francaux M. Effects of resistance exercise with and without creatine supplementation on gene expression and cell signaling in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2008;104(2):371-8.

Deminice R, Rosa FT, Franco GS, Jordao AA, de Freitas EC. Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. *Nutrition.* 2013 ;29(9):1127-32.

Feldman BM, Rider LG, Reed AM, Pachman LM. Juvenile dermatomyositis and other idiopathic inflammatory myopathies of childhood. *Lancet.* 2008; 28;371(9631):2201-12.

Fernandes JL, Viana SL, Rocha AL, Ribeiro MC, Castro LC. Biphosphonate-induced radiographic changes in two pediatric patients with rheumatic diseases. *Skeletal Radiol.* 2004;33(12):732-6.

Fitch CD, Moody LG. Creatine metabolism in skeletal muscle. V. An intracellular abnormality of creatine trapping in dystrophic muscle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1969;132:219-22.

Funanage VL, Carango P, Shapiro IM, Tokuoka T, Tuan RS. Creatine kinase activity is required for mineral deposition and matrix synthesis in endochondral growth cartilage. *Bone Miner.* 1992; 17: 228-36.

Gerber I, Gwynn I, Alini M, Wallimann T. Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. *Eur Cell Mater.* 2005; 10: 8-22.

Gualano B, Ugrinowitsch C, Novaes RB, Artioli GG, Shimizu MH, Seguro AC, Harris RC, Lancha AH Jr. Effects of creatine supplementation on renal function: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Appl Physiol.* 2008;103 (1):33-40.

Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR, Lancha Junior AH. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids*. 2009a; 38: 31-44.

Gualano B, Coelho DF, Seguro AC, Sapienza MT, Lancha Junior AH. Effect of short-term, high-dose creatine supplementation on measured GFR in a young man with a single kidney. *Am J Kidney Dis*. 2009b.

Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR, Lancha Junior AH. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids*. 2010;38(1):31-44.

Gualano B, de Salles Painneli V, Roschel H, Artioli GG, Junior MN, Lucia de Sa Pinto A, Rossi da Silva ME, Cunha MR, Otaduy MC, da Costa Leite C, Ferreira JC, Pereira RM, Brum PC, Bonfá E, Lancha AH Jr. Creatine in Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(5):770-8.

Gualano B, Roschel H, Lancha-Jr AH, Brightbill CE, Rawson ES. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids*. 2012;43:519-29.

Gualano B, Macedo AR, Alves CR, Roschel H, Benatti FB, Takayama L, de Sá Pinto AL, Lima FR, Pereira RM. Creatine supplementation and resistance training in vulnerable older women: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Exp Gerontol*. 2014;53:7-15.

Harris RC, Söderlund K, Hultman E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond)* 1992; 83:367-74.

Harris RC, Lowe JA, Warnes K, Orme CE: The concentration of creatine in meat, offal and commercial dog food. *Res Vet Sci* 1997, 62(1):58-62.

Hayashi AP, Solis MY, Roschel H, Sapienza MT, Otaduy MCG, Pinto ALdS, Silva CA, Sallum AME, Pereira RMR *et al*: Efficacy and safety of creatine supplementation in childhood-onset systemic lupus erythematosus: a randomized double-blind placebo-controlled cross-over trial. *Lupus* (in press).

Hicks JE, Drinkard B, Summers RM, Rider LG. Decreased aerobic capacity in children with juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr 15;47(2):118-23.

Hoffman JR, Stout JR, Falvo MJ, Kang J, Ratamess NA. Effect of low-dose, short-duration creatine supplementation on anaerobic exercise performance. *J Strength Cond Res.* 2005;19(2):260-64.

Hultman E, Soderlund K, Timmons JA, Cederblad G, Greenhaff PL. Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol* 1996;81:232-37.

Josefson A, Romanus E, Carlsson J.A functional index in myositis. *J Rheumatol.* 1996; 23(8):1380-4.

Karpati G, Carpenter S. Pathology of the inflammatory myopathies. *Baillieres Clin Neurol.* 1993; 2(3): 527-56.

Klatchoian DA, Len CA, Terreri MT, Silva M, Itamoto C, Ciconelli RM, et al. Quality of life of children and adolescents from Sao Paulo: reliability and validity of the Brazilian version of the Pediatric Quality of Life Inventory version 4.0 Generic Core Scales. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84:308-315.

Kley RA, Tarnopolsky MA, Vorgerd M. Creatine treatment in muscle disorders: a meta-analysis of randomised controlled trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79:366-67.

Kley RA, Tarnopolsky MA, Vorgerd M. Creatine for treating muscle disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;6:4760-4763.

Kornblum C, Schröder R, Müller K, Vorgerd M, Eggers J, Bogdanow M, Papassotiropoulos A, Fabian K, Klockgether T, Zange J. Creatine has no beneficial effect on skeletal muscle energy metabolism in patients with single mitochondrial DNA deletions: a placebo-controlled, double-blind 31P-MRS crossover study. *Eur J Neurol.* 2005;12(4):300-9.

Kreider RB, Melton C, Rasmussen CJ, Greenwood M, Lancaster S, Cantler EC, Milnor P, Almada AL. Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes. *Mol Cell Biochem.* 2003 Feb;244 (1-2):95-104.

Kuehl K, Goldberg L, Elliot D. Renal insufficiency after creatine supplementation in a college football athlete. *Med and Sci in Sports and Exerc.* 1998; 30: S235.

Lazarevic D, Pistorio A, Palmisani E, Miettunen P, Ravelli A, Pilkington C, et al. The PRINTO criteria for clinically inactive disease in juvenile dermatomyositis. *Ann Rheum Dis.* 2012;72:686-693.

Leblanc CM, Ma J, Scuccimarra R, Cabral DA, Dent PB, Ellsworth JE, Houghton K, Huber AM, Jurencak R, Lang BA, Larche M, Lentle B, Matzinger MA, Miettunen PM, Oen K, Roth J, Saint-Cyr C, Shenouda N, Taljaard M, Ward LM. A154: glucocorticoid therapy and the risk of incident vertebral fracture in children with rheumatic disorders. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 11:S199-200.

Levy DM e Kamphuis S. Systemic lupus erythematosus in children and adolescents. *Pediatr Clin North Am.* 2012;59(2):345–64.

Lilleby V, Haugen M, Morkrid L, Frey Froslie K, Holven KB, Forre O. Body composition, lipid and lipoprotein levels in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2007;36:40-47.

Louis M, Lebacq J, Poortmans JR, Belpaire-Dethiou MC, Devogelaer JP, Van Hecke P, Goubel F, Francaux M. Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve* 2003;27:604-10.

Lovell DJ, Lindsley CB, Rennebohm RM, Ballinger SH, Bowyer SL, Giannini, Hicks JE, Levinson JE, Mier R, Pachman LM, Passo MH, Perez MD, Reed AM, Schikler KN, Smith M, Zemel LS, Rider LG. Development of validated disease activity and damage indices for the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. II. The Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS): a quantitative tool for the evaluation of muscle function. The Juvenile Dermatomyositis Disease Activity Collaborative Study Group. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2213-9.

Lugaresi R, Leme M, de Salles Painelli V, Murai IH, Roschel H, Sapienza MT, Lancha Junior AH, Gualano B. Does long-term creatine supplementation impair kidney function in resistance-trained individuals consuming a high-protein diet? *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10:26.

Machado CS, Ruperto N, Silva CH, Ferriani VP, Roscoe I, Campos LM, Oliveira SK, Kiss MH, Bica BE, Sztajnbok F, Len CA, Melo-Gomes JA; Paediatric Rheumatology International Trials Organisation. Paediatric Rheumatology International Trials Organization. The Brazilian version of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) and the Child Health Questionnaire (CHQ). *Clin Exp Rheumatol*. 2001;19:S25-9.

Maillard SM, Jones R, Owens CM, Pilkington C, Woo PM, Wedderburn LR, Murray KJ. Quantitative Assessments of the effects of a single exercise session on muscles in Juvenile Dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2005;53(4):558-64.

Mastaglia FL, Garlepp MJ, Phillips BA, Zilko, PJ. Inflammatory myopathies: clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Muscle Nerve*. 2003;27:407-25.

McCann LJ, Juggins AD, Maillard SM, et al.; Juvenile Dermatomyositis Research Group. The Juvenile Dermatomyositis National Registry and Repository (UK and Ireland)-clinical characteristics of children recruited within the first 5 yr. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:1255–60.

Mendez EP, Lipton R, Ramsey-Goldman R, Roettcher P, Bowyer S, Dyer A et al. US incidence of juvenile dermatomyositis, 1995-1998: results from the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Registry. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* 2003; 49(3): 300-305.

Menezes LG, Sobreira C, Neder L, Rodrigues-Júnior AL, Martinez JA. Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats. *J Appl Physiol* 2007;102(2):698-703.

Neves M, Jr., Gualano B, Roschel H, Fuller R, Benatti FB, AL DESP, Lima FR, Pereira RM, Lancha AH, Jr., Bonfa E. Beneficial effect of creatine supplementation in knee osteoarthritis. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43:1538-43.

Newcomer KL, Krug HE, Mahowald ML. Validity and reliability of the timed-stands test for patients with rheumatoid arthritis and other chronic diseases. *J Rheumatol*. 1993;20(1):21-7.

Nissen SL, Sharp RL. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. *J Appl Physiol*. 2003;94 (2):651-59.

Ogden CL, Kuczmarski RJ, Flegal KM, Mei Z, Guo S, Wei R, Grummer-Strawn LM, Curtin LR, Roche AF, Johnson CL. Centers for Disease Control and Prevention 2000 growth charts for the United States: improvements to the 1977 National Center for Health Statistics version. *Pediatrics*. 2002;109: 45-60.

Olsen S, Aagaard P, Kadi F, Tufekovic G, Verney J, Olesen JL, Suetta C, Kjaer M. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *J Physiol*. 2006;573:525-34.

Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007;85:660-7.

Park JH, Phothimat P, Oates CT, Hernanz-Schulman M, Olsen NJ. Use of P-31 magnetic resonance spectroscopy to detect metabolic abnormalities in muscles of patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 1998;41(3):406-13.

Park JH, Niermann KJ, Ryder NM, Nelson AE, Das A, Lawton AR, et al. Muscle abnormalities in juvenile dermatomyositis patients: P-31 magnetic resonance spectroscopy studies. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2359-2367.

Pereira RM, Corrente JE, Chahade WH, Yoshinari NH. Evaluation by dual X-ray absorptiometry (DXA) of bone mineral density in children with juvenile chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16(4):495-501.

Perez MD, Abrams SA, Koenning G, Stuff JE, O'Brien KO, Ellis KJ. Mineral metabolism in children with dermatomyositis. *J Rheumatol*. 1994; 21(12):2364-9.

Pluim BM, Ferrauti A, Broekhof F, Deutekom M, Gotzmann A, Kuipers H, Weber K. The effects of creatine supplementation or selected factors of tennis specific training. *Br J Sports Med*. 2006;40:507-12.

Podsiadlo D, Richardson S. The timed "Up & Go": a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *J Am Geriatr Soc*. 1991;39(2):142-8.

Polacow VO, Scagliusi FB, Lancha Jr AH. *Qualitative evaluation of an auxiliary tool for portion sizes estimation among a Brazilian sample.* In: 5th International Conference on Dietary Assessment Methods, 2003a, Chiang Rai. Expanding the Horizon: dietary assessment in a multi-cultural world: Program & Abstracts, 2003. p. C3.12-C3.12.

Polacow VO, Scagliusi FB, Lancha Jr AH. *Validation of a portion-size measurement aid in a brazilian sample.* In: 5th International Conference on Dietary Assessment Methods, 2003b, Chiang Rai. Expanding the Horizon: Dietary Assessment ina Multi-Cultural World: Program & Abstracts, 2003. p. D 1.7-D 1.7.

Poortmans JR, Auquier H, Renaut V, Durussel A, Saugy M, Brisson GR. Effect of short-term creatine supplementation on renal responses in men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1997;76(6):566-7.

Poortmans JR, Francaux M. Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31(8): 1108-10.

Poortmans JR, Francaux M. Adverse effects of creatine supplementation: fact or fiction?. *Sports Med.* 2000;30(3):155-70.

Poortmans JR, Kumps A, Duez P, Fofonka A, Carpentier A, Francaux M. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(10):1717-20.

Pritchard NR, Kalra PA. Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. *Lancet.* 1998; 351: 1252-3.

Ravelli A, Duarte-Salazar C, Buratti S, Reiff A, Bernstein B, Maldonado-Velazquez MR, Beristain-Manterola R, Maeno N, Takei S, Gerloni V, Spencer CH, Pratsidou-Gerts P, Ruperto N, Pistorio A, Martini A. Assessment of damage in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: a multicenter cohort study. *Arthritis Rheum.* 2003;49:501-07.

Ravelli A, Ruperto N, Martini A. Outcome in juvenile onset systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2005; 17: 568-573.

Ravelli A, Trail L, Ferrari C, Ruperto N, Pistorio A, Pilkington C, Maillard S, Oliveira SK, Sztajnbok F, Cuttica R, Beltramelli M, Corona F, Katsicas MM, Russo R, Ferriani V, Burgos-Vargas R, Magni-Manzoni S, Solis-Vallejo E, Bandeira M, Zulian F, Baca V, Cortis E, Falcini F, Alessio M, Alpigiani MG, Gerloni V, Saad-Magalhaes C, Podda R, Silva CA, Lepore L, Felici E, Rossi F, Sala E, Martini A. Long-Term Outcome and Prognostic Factors of Juvenile Dermatomyositis: A Multinational, Multicenter Study of 490 Patients. *Arthritis Care Res.* 2010;62(1):63-72.

Rawson ES, Clarkson PM, Price TB, Miles MP. Differential response of muscle phosphocreatine to creatine supplementation in young and old subjects. *Acta Physiol Scand.* 2002;174:57-65.

Rider LG, Feldman BA, Perez MD, Rennebohm RM, Lindsley CB, Zemel L, Wallace CA, Ballinger SH, Bowyer SL, Reed AM, Passo MH, Katona IM, Miller FW, Lachenbruch PA. Development of validated disease activity and damage indices for the juvenile idiopathic inflammatory myopathies: I. Physician, parent and patient global assessments. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:1976-83.

Robinson TM, Sewell DA, Casey A, Steenge G, Greenhaff PL. Dietary creatine supplementation does not affect some haematological indices, or indices of muscle damage and hepatic and renal function. *Br J Sports Med.* 2000; 34: 284-8.

Roy BD, de Beer J, Harvey D, Tarnopolsky MA. Creatine monohydrate supplementation does not improve functional recovery after total knee arthroplasty. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005; 86: 1293-8.

Safdar A, Nicholas JY, Snow R, Melo S, Tarnopolsky MA. Global and targeted gene expression and protein content in skeletal muscle of young men following short-term creatine monohydrate supplementation. *Physiol Genomics.* 2008; 32(2):219-28.

Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S. Osteoporosis in children and adolescents: diagnosis, risk factors, and prevention. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001; 14(7):833-59.

Sallum AM, Kiss MH, Sachetti S, Resende MB, Moutinho KC, Carvalho Mde S, Silva CA, Marie SK. Juvenile dermatomyositis: clinical, laboratorial, histological, therapeutical and evolutive parameters of 35 patients. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002;60(4):889-99.

Santiago RA, Silva CA, Caparbo VF, Sallum AM, Pereira RM. Bone mineral apparent density in juvenile dermatomyositis: the role of lean body mass and glucocorticoid use. *Scand J Rheumatol* 2008;37:40-47.

Santos RV, Bassit RA, Caperuto EC, Costa Rosa LF. The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30km race. *Life Sci.* 2004 Sep 3;75 (16):1917-24.

Sato JO, Sallum AM, Ferriani VP, Marini R, Sacchetti SB, Okuda EM, Carvalho JF, Pereira RM, Len CA, Terreri MT, Lotufo SA, Romanelli PR, Ramos VC, Hilario MO, Silva CA, Corrente JE, Saad-Magalhães C. A Brazilian registry of juvenile dermatomyositis: onset features and classification of 189 cases. *Clin Exp Rheumatol.* 2009; 27(6):1031-8.

Silva LA, Tromm CB, Da Rosa G, Bom K, Luciano TF, Tuon T, De Souza CT, Pinho RA. Creatine supplementation does not decrease oxidative stress and inflammation in skeletal muscle after eccentric exercise. *J Sports Sci.* 2013;31 (11):1164-76.

Smith CA, Chetlin RD, Gutmann L, Yeater RA, Alway SE. Effects of exercise and creatine on myosin heavy chain isoform composition in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle Nerve.* 2006; 34: 586-94.

Snow RJ, Murphy RM. Factors influencing creatine loading into human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 2003; 31: 154-8.

Spillane M, Schoch R, Cooke M, Harvey T, Greenwood M, Kreider R, Willoughby DS: The effects of creatine ethyl ester supplementation combined with heavy resistance training on body composition, muscle performance, and serum and muscle creatine levels. *J Int Soc Sports Nutr* 2009, 6:6.

Stewart WA, Acott PD, Salisbury SR, Lang BA. Bone mineral density in juvenile dermatomyositis: assessment using dual x-ray absorptiometry. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(8):2294-8.

Symmons DP, Sills JA, Davis SM. The incidence of juvenile dermatomyositis: results from a nation-wide study. *Br J Rheumatol.* 1995;34:732-736.

Takken T, Elst E, Spermon N, Helders PJM, Prakken ABJ, Net J. The physiological and physical determinants of functional ability measures in children with juvenile dermatomyositis. *Rheumatology.* 2003;42:591-595.

Takken T, Net J, Helders PJM. Anaerobic exercise capacity in patients with Juvenile-Onset Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Arthritis Rheum.* 2005;53(2):173-77.

Takken T, Net J, Engelbert RHH, Pater S, Helders PJM. Responsiveness of exercise parameters in children with inflammatory myositis. *Arthritis Rheum.* 2008;59(1):59-64.

Tanner JM. *Growth at adolescence.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1962.

Tarnopolsky MA, Parise G. Direct measurement of high-energy phosphate compounds in patients with neuromuscular disease. *Muscle Nerve.* 1999a;22 (9):1228-33.

Tarnopolsky M, Martin J. Creatine monohydrate increases strength in patients with neuromuscular disease. *Neurology.* 1999b;52 (4):854-57.

Tarnopolsky M, Parise G, Fu MH, Brose A, Parshad A, Speer O, Wallimann T. Acute and moderate-term creatine monohydrate supplementation does not affect creatine transporter mRNA or protein content in either young or elderly humans. *Mol Cell Biochem.* 2003;244:159-166.

Tarnopolsky MA, Mahoney DJ, Vajsar J, Rodriguez C, Doherty TJ, Roy BD, Biggar D. Creatine monohydrate enhances strength and body composition in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2004;62:1771-77.

Tarnopolsky MA. Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. *Amino Acids.* 2011; 40: 1397-407.

Terjung RL, Clarkson P, Eichner ER, Greenhaff PL, Hespel PJ, Israel RG Kraemer WJ, Meyer RA, Spiet LL, Tarnopolsky MA, Wagenmakers AJ, Williams MH. American college

of sports medicine roundtable. The physiological and health effects of oral creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(3):706-17.

Teti A. Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep.* 2011; 9 (4):264-73.

Volek JS, Duncan ND, Mazzetti SA, Staron RS, Putukian M, Gómez AL Pearson DR, Fink WJ, Kraemer WJ. Performance and muscle fiber adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31(8):1147-56.

Vorgerd M, Zange J, Kley R, Grehl T, Husing A, Jager M, Muller K, Schroder R, Mortier W, Fabian K, Malin JP, Luttmann A. Effect of high-dose creatine therapy on symptoms of exercise intolerance in McArdle disease: double-blind, placebo-controlled crossover study. *Arch Neurol.* 2002;59:97-101.

Walker JB, Hannan JK. Creatine biosynthesis during embryonic development. False feedback suppression of liver amidinotransferase by n-acetimidoylsarcosine and 1-arboxymethyl-2-iminoimidazolidine (cyclocreatine). *Biochemistry.* 1976;15(12):2519-22.

Walker JB. Creatine: Biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1979;50:177-242.

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids.* 2011;40:1271-96.

Wedderburn LR, Li CK. Paediatric idiopathic inflammatory muscle disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2004; 18(3):345-58.

Wyss M, Kaddurah-daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews.* 2000;80(3):1107-213.

Zange J, Kornblum C, Muller K, Kurtscheid S, Heck H, Schroder R, Grehl T, Vorgerd M. Creatine supplementation results in elevated phosphocreatine/adenosine triphosphate (ATP) ratios in the calf muscle of athletes but not in patients with myopathies. *Ann Neurol.* 2002;52:126-27.

APÊNDICE

SAFETY AND EFFICACY OF CREATINE SUPPLEMENTATION IN JUVENILE DERMATOMYOSITIS: A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND PLACEBO-CONTROLLED CROSS-OVER TRIAL

Marina Yazigi Solis¹, Ana Paula Hayashi¹, Guilherme Giannini Artioli², Hamilton Roschel^{1,2} Marcelo Tatit Sapienza¹, Maria Concepción García Otaduy¹, Ana Lucia de Sá Pinto¹, Clovis Artur Silva¹, Adriana Maluf Elias Sallum¹, Rosa Maria R. Pereira¹, Bruno Gualano^{1,2}

ABSTRACT

Objective: To examine the safety and efficacy of creatine supplementation in Juvenile Dermatomyositis (JDM) patients; **Methods:** JDM patients received placebo or creatine supplementation (0.1 g/kg/d) in a randomized, crossover, double-blind design. Subjects were assessed at baseline and after 12 weeks, with an 8-week washout period. Primary outcome was muscle function. Secondary outcomes included body composition, bone mineral density, biochemical markers of bone remodeling, inflammatory cytokines, aerobic conditioning, health-related quality of life, disease-related parameters, dietary intake and muscle phosphorylcreatine (PCR) content. Safety was assessed by laboratory parameters and kidney function measurements; **Results:** Intramuscular PCR content was not significantly different between creatine and placebo before or after the intervention (Creatine - Pre: 21.4 ± 5.3 , Post: 20.6 ± 2.7 , delta score = -0.3 ± 2.5 mmol/kg wet muscle, ES = -0.15; Placebo - Pre: 20.4 ± 3.7 , Post: 20.7 ± 3.6 , delta score = -0.1 ± 4.2 mmol/kg wet muscle, ES = -0.15; 95% CI for delta score = -2.8 ± 2.4 , p = 0.45 for interaction between intervention). No significant changes between placebo and creatine for muscle function and aerobic conditioning, body composition, bone mineral density, and quality of life were detected, probably due to the lack of change in intramuscular PCR content. Kidney function was not changed after creatine supplementation and no side effects were noticed; **Conclusion:** a 12-week creatine supplementation

protocol is well tolerable and free of adverse effects but did not affect intramuscular PCR, muscle function, body composition, bone mineral density or quality of life in JDM patients.

KEY-WORDS: juvenile dermatomyositis, phosphorylcreatine, physical function, muscle metabolism.

AUTHORS DEPARTMENTS

¹ School of Medicine – University of São Paulo

² School of Physical Education and Sport – University of São Paulo

SOURCE OF SUPPORT

Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2010/18708-1 to BG and 2008/58238-4 to CAS)

AUTHORS

M.Y.S - Marina Yazigi Solis – Phd student; A.P.H - Ana Paula Hayashi – MSc; G.G.A - Guilherme Giannini Artioli – professor, H.R - Hamilton Roschel - professor; M.T.S - Marcelo Tatin Sapienza – doctor; M.C.G.O - Maria Concepción García Otaduy – doctor; A.L.S.P - Ana Lucia de Sá Pinto – doctor; C.A.S. - Clovis Artur Silva – doctor; A.M.E.S - Adriana Maluf Elias Sallum – doctor; R.M.R.P - Rosa Maria R. Pereira – doctor; B.G - Bruno Gualano – professor.

E-MAIL ADDRESSES

Marina Y Solis - solis@usp.br; Ana Paula Hayashi - anapaulahayashi@usp.br; Guilherme G. Artioli – artioli.gg@gmail.com; Hamilton Roschel – hars@usp.br; Marcelo T Sapienza – mtsapienza@hotmail.com; Maria CG Otaduy - mgotaduy@usp.br; Ana Lúcia de Sá-Pinto - analucia@move.med.br; Clovis A Silva - clovisaasilva@gmail.com, Adriana ME Sallum - adriana.sallum@hc.fm.usp.br; Rosa Maria R Pereira - rosamariarp@yahoo.com; Bruno Gualano - gualano@usp.br

CORRESPONDENCE

Bruno Gualano - e-mail: gualano@usp.br

Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo -3º andar – sala 3105 -Divisão de Reumatologia
- Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César, São Paulo, SP – Brazil, Postal code: 01246-903, Phone: +
55 11 3061.7213/ 3061.7490 and FAX: + 55 11 3061.7490

SHORT TITLE: Creatine and juvenile dermatomyositis

INTRODUCTION

Juvenile dermatomyositis (JDM) is an autoimmune disease that affects 3.2 per million children per year (1, 2). It is characterized by skin rashes, insidious loss of muscle mass, symmetrical proximal muscle weakness, decreased physical capacity, and fatigue (3, 4). Notably, most treatments for childhood idiopathic inflammatory myopathies have not been assessed in randomized controlled trials, with the understanding of standard treatment coming from observational studies and clinical experience. JDM patients may experience persistent weakness, loss of bone mass, and skeletal muscle atrophy as a long-term result of drug treatment (i.e., prednisone) and/or disease itself. In this regard, efforts to develop new therapeutic strategies able to attenuate these adverse outcomes have been considered of clinical relevance.

It was demonstrated that dietary supplementation with creatine (methyl-guanidine-acetic acid; an amine compound found in the diet especially from meats and endogenously synthesized from amino acids) was capable of improving functional performance in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies (5). In children with dystrophinopathies (e.g., Becker's disease, Duchenne's disease and myotonic muscular dystrophy), creatine supplementation was shown to improve physical capacity, muscle mass, and bone metabolism (6).

In fact, deficient levels of intramuscular phosphorylcreatine were identified in JDM patients (7). Furthermore, urinary creatine:creatinine ratio correlated to global disease damage in JDM patients, leading to the hypothesis that exacerbated excretion of creatine may be a marker of muscle damage in myositis. Given that creatine/phosphorylcreatine system exerts a pivotal role in energy transferring in excitable tissues, such as skeletal muscle and bone (see Gualano et al., (8); Wallimann et al., (9)), there has been a speculation that low creatine levels might be implicated in the weakness, fatigue, and the physical dysfunction that are commonly observed in patients with idiopathic inflammatory myopathies in childhood (10).

It has been suggested that creatine supplementation could be safe, effective and inexpensive for treating idiopathic inflammatory myopathies (5), but no pediatric study has been conducted so far. Therefore, this is the first study to investigate the safety and efficacy of creatine supplementation in

JDM. It was hypothesized that creatine supplementation would increase intramuscular phosphorylcreatine (PCR), thereby improving physical capacity and body composition, with possible benefits to health-related quality of life (HRQL).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

A 12-week clinical trial was conducted between November 2010 and October 2013 in Sao Paulo (Brazil). This manuscript is reported according to the guidelines of the Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT). This study was registered at clinicaltrials.gov as NCT01217320.

Patients received placebo or creatine supplementation in a randomized fashion using a crossover, double-blind design. Subjects were assessed at baseline (Pre) and after 12 weeks of intervention (Post) in each of the two study arms, interspersed by an 8-week washout period. At Pre (baseline), the patients were characterized in relation to their maturational status (11), physical activity level, disease characteristics, and drug regimen.

The primary outcome of efficacy was muscle function, assessed by a battery of physical tests, including maximum dynamic strength tests, timed-up-and-go test, timed-stands test, and handgrip test. Secondary outcomes included lean, fat, and bone mass, biochemical markers of bone remodeling, inflammatory cytokines, aerobic conditioning, quality of life, and disease-related parameters. Dietary intake was assessed by three 24-h dietary recalls. Muscle PCR content was measured through phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P-MRS). The safety of the intervention was assessed by laboratory parameters and kidney function was measured by the ^{51}Cr -EDTA clearance. Additionally, self-reported adverse events were recorded throughout the trial.

Patients

Patients were recruited into the study from the outpatient clinics of the Pediatric Rheumatology Unit of Children's Institute and Rheumatology Division, School of Medicine, University of Sao Paulo. The sample consisted of patients aged 7 to 21 years with active ($n = 5$) and

non-active ($n = 10$) disease, according to previously described criteria (12). All patients were diagnosed with definite JDM according to Bohan and Peter's criteria (13), with onset of the disease before 18 years of age.

The inclusion criteria were as follows: *i*) stable dose of medication for at least 8 weeks; *ii*) prednisone dose ≤ 40 mg/d. Exclusion criteria included: *i*) macroalbuminuria; *ii*) glomerular filtration rate < 30 mL/min/1.73m²; *iii*) use of hormonal contraceptives; *iv*) current pregnancy; *v*) diabetes mellitus; *vi*) hypothyroidism. The patients' main characteristics are shown in Table 1.

The study was approved by the Local Ethical Committee and all patients as well as their legal guardians signed the informed consent. The experimental procedures were in accordance with the Helsinki Declaration revised in 2008.

Creatine supplementation protocol and blinding procedure

The patients received a single dose of 0.1 g/kg/d of creatine monohydrate (Probiotica, Sao Paulo, Brazil) or placebo (dextrose) for 12 weeks, interspersed by an 8-week washout period. The supplement packages were coded so that neither the investigators nor the participants were aware of the contents until completion of the analyses. In order to verify the purity of the creatine used, a sample was analyzed by HPLC and purity was established as 99.9%.

Food intake assessment

Food intake was assessed by means of three 24-h dietary recalls undertaken on separate days (two week days and one weekend day) using a visual aid photo album of real foods. Energy and macronutrient intake were analyzed by the software Avanutri (Rio de Janeiro, Brazil). Creatine intake was estimated based on a specific food composition table (14, 15).

Muscle PCR content

Muscle PCR content was assessed *in vivo* by 31P-MRS using a whole body 3.0T MRI scanner (Achieva Intera, Philips, Best, The Netherlands) and a 14 cm diameter 31P surface coil. In brief, the

surface coil was placed centered in the calf muscle of the left leg. The scanner body coil was used to obtain conventional anatomical T1-weighted magnetic resonance images in the three orthogonal planes. ³¹P-MRS was acquired using the image selected in vivo spectroscopy sequence with an echo time and repetition time of 0.62 ms and 4500 ms, respectively. Spectrum bandwidth was 3000 Hz with 2048 data points and 64 repetitions. Spectrum raw data were analyzed with Java Magnetic Resonance User Interface software, and processing steps included apodization to 5Hz, Fourier transform and phase correction. The AMARES algorithm was used for spectrum quantification taking into account the prior knowledge of inorganic phosphate, phosphodiester, and phosphorylcreatine singlets, α -ATP and γ -ATP doublets, and β -ATP triplets. The PCR signal was quantified relative to the γ -ATP signal, assuming a constant γ -ATP concentration of 5.5 mmol/kg.

³¹P-MRS scans were also obtained at baseline from 14 healthy children and adolescents (boys and girls = 8/6; BMI = 20.1 ± 3.8 kg/m²; VO_{2max} = 41.5 ± 6.1 ; age = 14 ± 5 years), who were matched for age to the JDM patients.

Muscle function assessments

The patients underwent two familiarization sessions for strength tests, separated for at least 72 h. Prior to the maximum dynamic strength (assessed by the one-repetition-maximum test (1-RM test), two light warm-up sets interspersed by two minutes were performed. 1-RM tests were conducted for the leg press and bench press exercises. Muscle function was also evaluated by the timed-stands and the timed-up-and-go tests, which have been shown to sensitive to another non-pharmacological therapeutic intervention in JDM patients (16). The timed-stands test assesses the time that a subject requires to rise from a standard arm chair, walk on a 3-meters-long line on the floor, turn, walk back on the line, and sit down again (17). The timed-up-go test evaluates the maximum number of stand-ups that a subject can perform from a standard armless chair for 30 seconds (18).

Aerobic conditioning

The patients underwent a maximum graded treadmill cardiopulmonary test to assess aerobic conditioning, according to a previous description (16, 19). Attainment of $\text{VO}_{2\text{max}}$ was accepted when two of the following three criteria were met: *i*) a plateau in VO_2 ; *ii*) a respiratory exchange ratio > 1.1 ; and/or *iii*) volitional exhaustion. The ventilatory anaerobic threshold (VAT) was determined to occur at the break point between the increase of carbon dioxide output (VCO_2) and VO_2 . The respiratory compensation point (RCP) was determined to occur where the ventilatory equivalent for carbon dioxide (VE/VCO_2 ratio) was the lowest before a systematic increase.

Bone mineral density and body composition

Bone mineral density and body composition (i.e., lean and fat mass) were measured by dual X-ray absorptiometry (DXA) with a pediatric software, using a Hologic QDR 4500A densitometry equipment (Hologic Inc. Bedford, MA, USA, Discovery model). Bone mineral density was determined at the following sites: lumbar spine, total hip, and whole body. The whole body analysis was conducted without considering the head in order to increase the measurement reliability in children (20), and the precision errors were determined based on the standard protocols from The International Society for Clinical Densitometry (ISCD) (21). The least significant change was considered to be 0.033 g/cm^2 , 0.039 g/cm^2 , and 0.010 g/cm^2 for the lumbar spine, the total femur, and the whole body, respectively

Disease activity, functional capacity and health-related quality of life

Parameters of muscle strength and disease activity were assessed by the Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS) (22), Disease Activity Score (DAS), Manual Muscle Testing (MMT) (23), and the Brazilian version of Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) (24). HRQL was evaluated by patients' and parents' subscales from the Brazilian version of Pediatric Quality of Life Inventory (PedsQL) (25). Patients' and physicians' global assessment subscales from the Visual Analogue Scale (VAS) were also assessed.

Serum inflammatory cytokines and bone markers

Serum concentrations of C-telopeptides of type I collagen (CTX) and Procollagen type I N-propeptide (P1NP) were determined (E411, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The serum CTX limit of detection was 10 ng/L and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 2.5% and 3.4%, respectively. Serum P1NP intra-assay and inter-assay CVs were 2.2% and 1.8%, respectively, with a limit of detection of 5 µg/L.

Serum inflammatory cytokines (IL-6, IL-10, IL-17-A, TNF- α , and IFN- γ) were determined by Luminex xMAP Technology (Millipore, MA, USA). The CVs for IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α and IFN- γ were 0.32%, 1.15%, 0.17%, 0.23% and 0.81%, respectively.

⁵¹Cr-EDTA clearance

A single dose of 3.7MBq (100 µCi) of the ⁵¹Cr-EDTA tracer, in a volume of 1 mL was injected intravenously in the right arm. Accurately timed 10-mL blood-samples were drawn into a heparinized tube from the opposite arm at 4 and 6 h after the injection. The plasma disappearance curve was designed using the results of these time-points. To measure the radioisotope activity, the blood samples were centrifuged at 1500 g for 10 min and 3 mL of plasma was measured in a well-calibrated counter (Genesys Genii™, LabLogic Systems Inc, Brandon, Florida, USA) for the energy of chromium-51 (320 keV). Each sample, including 3 mL of standard solution taken as an aliquot from 3.7MBq (100 µCi) ⁵¹Cr-EDTA diluted to 500 mL in saline, was counted for 5 min. Brochner-Mortensen method was used for correcting systematic errors of the slope-intercept technique according to the following equation:

$$Cl_c = 0.9908 \times Cl_{nc} - 0.001218 \times Cl_{nc}^2$$

where Cl_c is the clearance corrected for the first exponential and Cl_{nc} is the non-corrected clearance. ⁵¹Cr-EDTA clearance was corrected for 1.73 m² body surface area. The CV for ⁵¹Cr-EDTA clearance was 9.7%.

Sample size estimation and statistical analysis

The sample size was estimated with the assistance of the G-Power® software (version 3.1.2, Germany). Based on previous data from a study involving young dystrophic patients supplemented with creatine (26), it was estimated that 10 patients would be needed to provide 95% power ($\alpha = 0.05$; estimated effect size of 0.66) for muscle strength, which was a primary outcome in this clinical trial.

Data were tested by mixed models with repeated measures using the software SAS version 9.1. A post-hoc test adjusted by Tukey was used for multicomparison purposes.

Data are expressed as mean \pm standard deviation, delta scores, effect size (ES), difference between delta scores, and 95% confidence interval (95% CI), unless otherwise stated. The significance level was previously set at $p < 0.05$.

Post-hoc sensitivity analysis

To test whether disease activity might have influenced the outcomes in this study, a sub-analysis was conducted comparing active and non-active patients. T-tests were used to compare delta scores (i.e., Post - Pre values) between the sub-groups for all muscle function parameters.

RESULTS

Patients

From the 107 outpatients followed in the two Pediatric Rheumatology services, 18 were selected and 3 withdrew due to personal reasons. Therefore, 15 patients completed the protocol. Ten patients had the drug regimen stable during the trial. Three patients experienced a reduction in prednisone dose (patient #1: 7.5 to 5 mg; patient #8: 5 to 2.5 mg; patient #4: 40 to 20 mg) during the washout period. Two patients had disease flare episodes during the trial (both in the creatine arm), and their medications were modified (i.e., inclusion of therapy with 20 mg and 5 mg of prednisone to patients #10 and #12, respectively). All analyses were carried out with and without these patients and the results remained unchanged, therefore we expressed the data with all the participants.

Food intake

Total energy, macronutrients and creatine intake did not significantly differ within or between conditions ($p > 0.05$) (data not shown).

Muscle PCR content

Figure 1 shows the data regarding muscle PCR content. Intramuscular PCR content was comparable between conditions at baseline ($p = 0.52$). There were no significant changes within or between conditions following the intervention (Creatine - Pre: 21.4 ± 5.3 , Post: 20.6 ± 2.7 , delta score = -0.3 ± 2.5 mmol/kg wet muscle, ES = -0.15; Placebo - Pre: 20.4 ± 3.7 , Post: 20.7 ± 3.6 , delta score = -0.1 ± 4.2 mmol/kg wet muscle, ES = -0.15; 95% CI for delta score = -2.8 ± 2.4 , $p = 0.45$ for interaction between creatine and placebo). Healthy children (18.7 ± 2.1 mmol/kg wet muscle) showed comparable PCR content to that of the JDM patients (20.8 ± 4.0 mmol/kg wet muscle; $p = 0.108$).

Muscle function and aerobic conditioning

Table 2 shows the muscle strength, physical function, and aerobic capacity data. There were no differences between conditions at baseline ($p > 0.05$). Significant time effects were observed for 1-RM leg press, 1-RM bench press, handgrip test, and time-to-exhaustion in the incremental test ($p = 0.005$, $p = 0.01$, $p = 0.03$, $p = 0.01$, respectively). However, there was no interaction effect for any of the muscle function or aerobic conditioning tests ($p > 0.05$).

Body composition, bone mineral density, serum bone markers, and inflammatory cytokines

Significant time effects were also observed for body mass, height, lean mass, BMC, and BMD at L1-L4 and whole body ($p < 0.05$). However, no between-condition differences were observed in body mass, height, lean mass, fat mass, BMC, and BMD in any sites. BMD Z-scores were not significantly different between conditions (data not shown). In addition, neither serum CTX and P1NP concentrations (Table 3) nor serum inflammatory cytokines (data not shown) were changed within or between conditions.

Functional capacity and health-related quality of life parameters

Significant improvements over time, irrespective of treatment (time effects), were observed for CHAQ and CMAS scores ($p < 0.05$), but no changes were seen in PedsQL, VAS, MMT, and DAS scores ($p > 0.05$) (Table 4). There were no changes within or between conditions for any parameter of functional capacity or health-related quality of life.

Laboratory parameters and adverse events

All laboratory parameters remained unchanged throughout the intervention. ^{51}Cr -EDTA clearance did not significantly differ within or between conditions (Table 5). Furthermore, there were no self-reported side effects throughout the study.

Post-hoc sensitivity analyses

In a post-hoc sensitivity analysis, patients were divided into "active disease" 9 ($n = 5$) and "non-active disease" ($n = 10$) sub-groups. As expected, physician VAS, CMAS, DAS, parents' PedsQL, time-to-exhaustion in the incremental test, and all muscle function scores were better in the non-active *versus* active patients at baseline ($p < 0.05$). However, muscle PCR was comparable between the active and non-active patients before the intervention (21.1 ± 5.1 and 20.6 ± 3.6 mmol/kg wet muscle, respectively; $p = 0.83$). Importantly, all the dependent variables were not changed both in the active and non-active subgroups after either creatine or placebo supplementation ($p > 0.05$).

DISCUSSION

To our knowledge, this was the first study to examine the safety and efficacy of creatine supplementation in JDM patients. Creatine supplementation was well tolerable and free of adverse effects, but did not show any therapeutic effects in our population, suggesting that the beneficial effects of this dietary supplement in adults with idiopathic inflammatory myopathies (5) are not reproducible in patients with juvenile myositis.

The "creatine system" plays a critical role in rapid energy provision during muscle contraction involving the transfer of N-phosphoryl group from PCR to adenosine diphosphate (ADP) to regenerate adenosine triphosphate (ATP) through a reversible reaction catalyzed by PCR kinase (CK) (27). In addition to its effects on bioenergetics, creatine has also been suggested to promote gains in skeletal muscle mass by activating satellite cells (28) as well as specific muscle growth factors (e.g., IGF-1, 4EBP-1) (29). Interestingly, it has also been shown that the positive effects of creatine supplementation can be extended to bone tissue, where creatine may contribute to metabolic activity, differentiation, and mineralization of osteoblasts (30).

Due to its pleiotropic effects, creatine supplementation has been successfully used as an adjuvant treatment in a variety of chronic diseases, including myopathies (8). In fact, a recent meta-analysis involving 192 participants from six clinical trials pointed out the beneficial effects of creatine supplementation in muscle function (i.e., improvement of 8.47% on average) in patients with dystrophinopathies (6). In addition, there is evidence that creatine supplementation can also improve body composition in patients with childhood myopathies (31). For instance, it was reported greater muscle mass accumulation in Duchenne's patients after creatine supplementation (31). Moreover, it was showed that creatine supplementation increased bone mineral density by 3% and reduced urinary cross-linked N-telopeptides of type I collagen (NTx) (i.e., a marker of bone resorption) by 30% in children with Duchenne and Becker dystrophy (26).

There are two direct evidences suggesting that creatine supplementation could benefit JDM patients. Firstly, lower levels of intramuscular PCR were observed in JDM patients (7, 32). Secondly, creatine supplementation increased muscle PCR content and physical performance in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies (5). In contrast to our hypothesis, however, creatine supplementation failed to confer any positive effects in the current trial. This is best explained by the lack of increase in intramuscular PCR content after creatine supplementation. This is a rather unexpected data, as even lower doses of creatine supplementation (i.e., < 0.1 g/Kg/d) have been able to increase intramuscular creatine content in several populations, including young healthy individuals (33), patients with type-2 diabetes (34) and older individuals (35). The factors leading to the

inefficacy of creatine supplementation in muscle PCR content in JDM patients remain enigmatic. It was demonstrated that dystrophic muscle may show a reduced creatine transporter protein content (32) or an impaired uptake/release creatine kinetics (36), which would likely have contributed to the reduced ability to respond to creatine supplementation in dystrophinopathies. This observation is in line with the lack of response to creatine supplementation (same dose as in the current study) in patients with Becker's dystrophy (37). Nonetheless, our JDM patients showed compared baseline levels of muscle PCR to those of their healthy peers, suggesting that no abnormalities in creatine metabolism occur in JDM. It is important to note, however, that our patients had no severe disease, despite the fact that a few of them were classified as active disease ($n = 5$). In this regard, it is possible that patients with more severe muscle involvement may show disturbances in creatine metabolism and, consequently, a different response to creatine supplementation. There is strong evidence demonstrating that creatine supplementation is more effective in augmenting the intramuscular creatine/PCR in healthy adults individuals with lower intramuscular creatine/PCR content at baseline (38). Whether JDM patients with severe disease and deficits in tissue creatine levels can respond favorably to creatine supplementation remains to be examined.

Even though creatine supplementation was not shown to be effective in this trial, the supplementation protocol was well tolerated and free of adverse events, adding to a growing body of evidence indicating that this dietary supplement has an excellent safety profile (39-44). Importantly, this is one of the first studies to provide comprehensive safety analyses (including the gold-standard assessment of measured glomerular filtration rate (45)) in a pediatric population, suggesting that this dietary intervention may be safe for children and adolescents.

This study presents limitations. Firstly, it has been suggested that the beneficial effects of creatine supplementation could be more pronounced when resistance training is associated. In support to this notion, it was reported that creatine supplementation was able to improve physical performance in adult patients with myositis who underwent a supervised trained program (5). Therefore, it is possible that creatine supplementation along with an exercise training program may have elicited positive outcomes. This hypothesis needs to be tested in future trials. Secondly, we were unable to add

a healthy control group supplemented with creatine in this trial. Since there is no study to show the typical response to a creatine loading in healthy children, it remains imperative to determine the optimal protocol to elicit significant increments on intramuscular creatine/PCR content in pediatric populations, especially in myositis. Finally, the follow-up period adopted in this study might have been insufficient to detect changes in some parameters, such as bone mass. In fact, BMC tended to be higher after creatine supplementation ($p = 0.07$) in the current study, suggesting that a beneficial effect of chronic creatine intake (e.g., ≥ 1 year) on bone mass cannot be ruled out. Indeed, long-term studies are still needed to provide definitive conclusion on the efficacy of creatine supplementation in JDM.

In conclusion, creatine supplementation at 0.1 g/Kg/d for 12 weeks was safe but not capable to increase intramuscular PCR content, muscle function or clinical parameters in JDM patients with no severe disease.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they do not have conflict of interests.

AUTHOR-‘S CONTRIBUTIONS

Significant manuscript writer – Bruno Gualano, Marina Yazigi Solis

Significant manuscript reviewer/reviser – Ana Lucia de Sá-Pinto, Clovis Artur Silva, Maria Concepción García Otaduy, Hamilton Roschel, Marcelo Tatiti Sapienza, Adriana Malluf Elias Sallum, Ana Paula Hayashi, Guilherme Giannini Artioli

Concept and design – Bruno Gualano, Clovis Artur Silva

Data acquisition – Marina Yazigi Solis, Ana Paula Hayashi, Ana Lucia de Sá Pinto, Maria Concepción García Otaduy, Hamilton Roschel, Marcelo Tatiti Sapienza, Adriana Malluf Elias Sallum, Rosa Maria R. Pereira, Guilherme Giannini Artioli

Data analysis and interpretation – Bruno Gualano, Marina Yazigi Solis, Rosa Maria R. Pereira, Maria Concepción García Otaduy, Hamilton Roschel, Clovis Artur Silva, Adriana Malluf Elias Sallum

Statistical expertise – Bruno Gualano, Marina Yazigi Solis, Hamilton Roschel

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the following public funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 302724/2011-7 to CAS and 300559/2009-7 to RMRP). Federico Foundation to CAS and RMRP; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior to APH; Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2010/18708-1 to BG and 2008/58238-4 to CAS); Núcleo de Apoio à Pesquisa “Saúde da Criança e do Adolescente” da USP (NAP-CriAd) to CAS. In addition, we would like to thank Probiotica for providing the creatine supplements.

REFERENCES

1. Mendez EP, Lipton R, Ramsey-Goldman R, Roettcher P, Bowyer S, Dyer A, et al. US incidence of juvenile dermatomyositis, 1995-1998: results from the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Registry. *Arthritis Rheum.* 2003;49:300-305.
2. Symmons DP, Sills JA, Davis SM. The incidence of juvenile dermatomyositis: results from a nation-wide study. *Br J Rheumatol.* 1995;34:732-736.
3. Mastaglia FL, Garlepp MJ, Phillips BA, Zilko PJ. Inflammatory myopathies: clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Muscle Nerve.* 2003;27:407-425.
4. Ravelli A, Trail L, Ferrari C, Ruperto N, Pistorio A, Pilkington C, et al. Long-term outcome and prognostic factors of juvenile dermatomyositis: a multinational, multicenter study of 490 patients. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010;62:63-72.
5. Chung YL, Alexanderson H, Pipitone N, Morrison C, Dastmalchi M, Stahl-Hallengren C, et al. Creatine supplements in patients with idiopathic inflammatory myopathies who are clinically weak after conventional pharmacologic treatment: Six-month, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2007;57:694-702.

6. Kley RA, Tarnopolsky MA, Vorgerd M. Creatine for treating muscle disorders. Cochrane Database Syst Rev. 2013;6:4760-4763.
7. Park JH, Niermann KJ, Ryder NM, Nelson AE, Das A, Lawton AR, et al. Muscle abnormalities in juvenile dermatomyositis patients: P-31 magnetic resonance spectroscopy studies. Arthritis Rheum. 2000;43:2359-2367.
8. Gualano B, Roschel H, Lancha-Jr AH, Brightbill CE, Rawson ES. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. Amino Acids. 2012;43:519-529.
9. Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. Amino Acids. 2011;40:1271-1296.
10. Tarnopolsky MA. Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. Amino Acids. 2011;40:1397-1407.
11. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Arch Dis Child. 1970;45:13-23.
12. Lazarevic D, Pistorio A, Palmisani E, Miettunen P, Ravelli A, Pilkington C, et al. The PRINTO criteria for clinically inactive disease in juvenile dermatomyositis. Ann Rheum Dis. 2012;72:686-693.
13. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). N Engl J Med. 1975;292:344-347.
14. Harris RC, Lowe JA, Warnes K, Orme CE. The concentration of creatine in meat, offal and commercial dog food. Res Vet Sci. 1997;62:58-62.
15. Hulsemann J, Manz F, Wember T, Schoch G. [Administration of creatine and creatinine with breast milk and infant milk preparations]. Klin Padiatr. 1987;199:292-295.
16. Omori CH, Silva CA, Sallum AM, Rodrigues Pereira RM, Luciade Sa Pinto A, Roschel H, et al. Exercise training in juvenile dermatomyositis. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64:1186-1194.
17. Newcomer KL, Krug HE, Mahowald ML. Validity and reliability of the timed-stands test for patients with rheumatoid arthritis and other chronic diseases. J Rheumatol. 1993;20:21-27.

18. Podsiadlo D, Richardson S. The timed "Up & Go": a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *J Am Geriatr Soc.* 1991;39:142-148.
19. Prado DM, Benatti FB, de Sa-Pinto AL, Hayashi AP, Gualano B, Pereira RM, et al. Exercise training in childhood-onset systemic lupus erythematosus: a controlled randomized trial. *Arthritis Res Ther.* 2013;15:46-53.
20. Taylor A, Konrad PT, Norman ME, Harcke HT. Total body bone mineral density in young children: influence of head bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 1997;12:652-655.
21. Baim S, Wilson CR, Lewiecki EM, Luckey MM, Downs RW, Jr., Lentle BC. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry: position paper of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom.* 2005;8:371-378.
22. Lovell DJ. Newer functional outcome measurements in juvenile rheumatoid arthritis: a progress report. *J Rheumatol Suppl.* 1992;33:28-31.
23. Bode RK, Klein-Gitelman MS, Miller ML, Lechman TS, Pachman LM. Disease activity score for children with juvenile dermatomyositis: reliability and validity evidence. *Arthritis Rheum.* 2003;49:7-15.
24. Machado CS, Ruperto N, Silva CH, Ferriani VP, Roscoe I, Campos LM, et al. The Brazilian version of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) and the Child Health Questionnaire (CHQ). *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19:25-9.
25. Klatchoian DA, Len CA, Terreri MT, Silva M, Itamoto C, Ciconelli RM, et al. Quality of life of children and adolescents from Sao Paulo: reliability and validity of the Brazilian version of the Pediatric Quality of Life Inventory version 4.0 Generic Core Scales. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84:308-315.
26. Louis M, Lebacq J, Poortmans JR, Belpaire-Dethiou MC, Devogelaer JP, Van Hecke P, et al. Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve.* 2003;27:604-610.
27. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and

- fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* 1992;281:21-40.
28. Olsen S, Aagaard P, Kadi F, Tufekovic G, Verney J, Olesen JL, et al. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *J Physiol.* 2006;573:525-534.
29. Deldicque L, Louis M, Theisen D, Nielens H, Dehoux M, Thissen JP, et al. Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37:731-736.
30. Gerber I, ap Gwynn I, Alini M, Wallimann T. Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. *Eur Cell Mater.* 2005;10:8-22.
31. Tarnopolsky MA, Mahoney DJ, Vajsar J, Rodriguez C, Doherty TJ, Roy BD, et al. Creatine monohydrate enhances strength and body composition in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2004;62:1771-1777.
32. Tarnopolsky MA, Parise G. Direct measurement of high-energy phosphate compounds in patients with neuromuscular disease. *Muscle Nerve.* 1999 Sep;22(9):1228-33.
33. Hultman E, Soderlund K, Timmons JA, Cederblad G, Greenhaff PL. Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol.* 1996;81:232-237.
34. Gualano B, Salles Painelli V, Roschel H, Artioli GG, Neves M, Jr., De Sa Pinto AL, et al. Creatine in type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;43:770-778.
35. Rawson ES, Clarkson PM, Price TB, Miles MP. Differential response of muscle phosphocreatine to creatine supplementation in young and old subjects. *Acta Physiol Scand.* 2002;174:57-65.
36. Fitch CD, Moody LG. Creatine metabolism in skeletal muscle. V. An intracellular abnormality of creatine trapping in dystrophic muscle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1969;132:219-222.

37. Zange J, Kornblum C, Muller K, Kurtscheid S, Heck H, Schroder R, et al. Creatine supplementation results in elevated phosphocreatine/adenosine triphosphate (ATP) ratios in the calf muscle of athletes but not in patients with myopathies. *Ann Neurol.* 2002;52:126-127.
38. Harris RC, Soderlund K, Hultman E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond).* 1992;83:367-374.
39. Gualano B, Ferreira DC, Sapienza MT, Seguro AC, Lancha AH, Jr. Effect of short-term high-dose creatine supplementation on measured GFR in a young man with a single kidney. *Am J Kidney Dis.* 2010;55:7-9.
40. Gualano B, Ugrinowitsch C, Novaes RB, Artioli GG, Shimizu MH, Seguro AC, et al. Effects of creatine supplementation on renal function: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Appl Physiol.* 2008;103:33-40.
41. Poortmans JR, Auquier H, Renaut V, Durussel A, Saugy M, Brisson GR. Effect of short-term creatine supplementation on renal responses in men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1997;76:566-567.
42. Poortmans JR, Francaux M. Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31:1108-1110.
43. Poortmans JR, Francaux M. Adverse effects of creatine supplementation: fact or fiction? *Sports Med.* 2000;30:155-170.
44. Poortmans JR, Kumps A, Duez P, Fofonka A, Carpentier A, Francaux M. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37:1717-1720.
45. van Hoek I, Vandermeulen E, Duchateau L, Lefebvre HP, Croubels S, Peremans K, et al. Comparison and reproducibility of plasma clearance of exogenous creatinine, exo-iohexol, endo-iohexol, and ⁵¹Cr-EDTA in young adult and aged healthy cats. *J Vet Intern Med.* 2007;21:950-958.

TABLE LEGENDS

Table 1. Abbreviations: G = genital; P = pubic hair; B = breast; IPAQ= International Physical Activity Questionnaire (short-version by (25); MTX = methotrexate; Cyc = Cyclosporine; HCLQ = hydroxychloroquine; CMAS = Childhood Myositis Assessment Scale, MMT = Manual Muscle Testing, PhyVAS = physicians' global assessment subscales from the Visual Analogue Scale and CPK = creatine kinase enzyme. Note: The first 5 patients were considered with active disease according to the criteria by Lazarevic et al., (12).

Table 2. Data expressed as mean (SD), effect size (ES), difference of delta, estimated mean of differences (95% CI), and level of significance for interaction (p) between creatine and placebo (tested by mixed models for repeated measures). Symbols represent main time effects (\ddagger p = 0.005; # p = 0.01; & p = 0.03; § p = 0.01). Abbreviations: Dif. Delta = difference between delta scores; reps = repetitions; VAT = ventilatory anaerobic threshold; RCP = respiratory compensation point; VO₂ = oxygen consumption; VO₂max = maximal oxygen consumption.

Table 3. Data expressed as mean (SD), effect size (ES), difference of delta, estimated mean of differences (95% CI), and level of significance for interaction (p) between creatine and placebo (tested by mixed models for repeated measures). Symbols represent main time effects (\ddagger p = 0.0028; Φ p = 0.0062; § p = 0.0024; + p = 0.001; # p < 0.001; ¶ p = 0.001). Abbreviations: Dif. Delta = difference between delta scores BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; L1-L4 = lumbar spine between L1 to L4; TH = total hip; WB = Whole body; CTX = C-telopeptides of type I collagen; P1NP = Procollagen type I N-propeptide.

Table 4. Data expressed as mean (SD), effect size (ES), difference of delta, estimated mean of differences (95% CI), and level of significance for interaction (p) between creatine and placebo (tested by Mann-Whitney U tests). Symbols represent main time effects (# p < 0.001; \ddagger p = 0.01). Abbreviations: Dif. Delta

= difference between delta scores; PedsQL= pediatric quality of life inventory; CHAQ = childhood health assessment questionnaire; VAS = visual analogue scale; CMAS = Childhood Myositis Assessment Scale; MMT = Manual Muscle Testing; DAS = Disease Activity Score.

Table 5. Data expressed as mean (SD). effect size (ES). difference of delta. estimated mean of differences (95% CI). and level of significance for interaction (p between creatine and placebo (tested by mixed models for repeated measures). Abbreviations: Dif. Delta = difference between delta scores; CPK = creatine phosphokinase; LDH = lactate dehydrogenase; CRP = C-reactive protein; AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; ESR = erythrocyte sedimentation rate.

Table 1. Patients' demographic characteristics, drug regime and disease activity parameters before the supplementation intervention in JDM patients.

| Patient | Sex | Age | Tanner Stage | IPAQ | Disease duration (years) | Current | | Current use of other | | | |
|---------------------------|-----|------------|--------------|----------|--------------------------|---|-----------------|---------------------------------------|--------------|--------------|----------------|
| | | | | | | (mg/d)/ cumulative dose of prednisone (g) | | Immunosuppressant/ antimalarial drugs | CMAS | MMT | PhyVAS |
| <i>Active disease</i> | | | | | | | | | | | |
| 1 | F | 14 | B4P4 | Moderate | 7 | 7.5 / 19 | MTX; Cyc / HCLQ | 45 | 80 | 3.0 | 143 |
| 2 | M | 17 | G3P3 | Moderate | 5 | 0 / 25.9 | MTX; Cyc / HCLQ | 41 | 79 | 1.0 | 130 |
| 3 | F | 13 | B5P4 | Low | 13 | 0 / 57.4 | MTX / - | 44 | 80 | 2.0 | 70 |
| 4 | M | 13 | G3P4 | Low | 2 | 40 / 38.2 | MTX; Cyc / HCLQ | 46 | 80 | 1.0 | 162 |
| 5 | F | 7 | B1P1 | Moderate | 2 | 5 / 19.8 | MTX / HCLQ | 44 | 80 | 2.0 | 80 |
| <i>Non active disease</i> | | | | | | | | | | | |
| 6 | F | 9 | B2P1 | Moderate | 8 | 0 / 6.6 | - | 52 | 79 | 0.0 | 160 |
| 7 | F | 7 | B1P1 | Low | 5 | 0 / 11.6 | MTX / - | 49 | 80 | 0.0 | 98 |
| 8 | F | 21 | B5P5 | Moderate | 6 | 5 / 57.9 | MTX; Ciclo / - | 52 | 80 | 0.0 | 287 |
| 9 | M | 15 | G3P3 | Moderate | 9 | 0 / 17.8 | - | 52 | 80 | 0.0 | 584 |
| 10 | F | 11 | B4P4 | Low | 8 | 0 / 13.0 | MTX / - | 52 | 80 | 3.0 | 98 |
| 11 | F | 15 | B5P4 | High | 10 | 0 / 27.5 | - | 51 | 80 | 0.0 | 65 |
| 12 | F | 11 | B3P3 | Low | 11 | 3 / 17.3 | MTX / HCLQ | 51 | 80 | 0.0 | 165 |
| 13 | M | 21 | G4P4 | Moderate | 7 | 0 / 14.6 | MTX / HCLQ | 51 | 80 | 0.0 | 77 |
| 14 | M | 14 | G3P3 | High | 9 | 0 / 19.5 | - | 52 | 80 | 2.0 | 75 |
| 15 | F | 13 | B3P3 | Moderate | 8 | 0 / 19.2 | MTX / - | 52 | 80 | 0.0 | 81 |
| Mean | | 13 | | | 7 | 4(10) / | | 48.9 | 79.9 | 0.9 | 151.7 |
| (SD) | | (4) | | | (3) | 24.4(15.4) | | (3.8) | (0.4) | (1.2) | (133.0) |

Abbreviations: G = genital; P = pubic hair; B = breast; IPAQ= International Physical Activity Questionnaire (short-version by [25]); MTX = methotrexate; Cyc = Cyclosporine; HCLQ = hydroxychloroquine; CMAS = Childhood Myositis Assessment Scale, MMT = Manual Muscle Testing, PhyVAS = physicians' global assessment subscales from the Visual Analogue Scale and CPK = creatine kinase enzyme. Note: The first 5 patients were considered with active disease according to the criteria by Lazarevic et al., [12].

Table 2. Muscle function and aerobic conditioning before and after creatine and placebo supplementation in JDM patients.

| Variable | Placebo | | | | Creatine | | | | Creatine vs. Placebo | | |
|--|------------------------|------------------------|--------------------|-------|------------------------|------------------------|--------------------|-------|----------------------|---------------|------|
| | Pre | Post | Delta | ES | Pre | Post | Delta | ES | Dif. Delta | 95% CI | p |
| 1-RM leg press (kg) £ | 36.6 (13.2) | 37.7 (13.6) | 1.1 (3.5) | 0.08 | 34.7 (12.9) | 36.9 (14.2) | 2.2 (5) | -0.09 | -1.1 | -4.3 to 2.3 | 0.48 |
| 1-RM bench press (kg) # | 15.7 (10.5) | 16.8 (10.4) | 1.1 (2.1) | 0.10 | 16.1 (10.4) | 16.6 (10.8) | 0.6 (1.5) | 0.17 | -0.5 | -0.8 to 1.8 | 0.43 |
| Handgrip (kg) & | 20.2 (11.4) | 21.4 (10.9) | 1.2 (2.9) | 0.11 | 20.5 (10.1) | 21.5 (10.7) | 1.0 (2.5) | 0.10 | -0.2 | -1.8 to 2.2 | 0.84 |
| Timed-stands (reps) | 17.1 (3.3) | 17.3 (3.9) | 0.3 (1.1) | 0.06 | 16.5 (3.7) | 17.5 (3.5) | 1.1 (1.3) | 0.27 | -0.8 | -1.7 to 0.1 | 0.08 |
| Timed-up-and-go (s) | 5.8 (0.8) (0.3) | 5.4 (0.7) (0.3) | -0.0 (-0.3) | -0.50 | 5.6 (0.7) (0.3) | 5.4 (0.7) (0.3) | -0.2 (-0.3) | -0.29 | -0.1 | -0.0 to 0.4 | 0.17 |
| VO₂ at VAT (mL/kg/min) | 15.5 (3.8) | 14.5 (3.1) | -1.7 (3.9) | -0.28 | 16.2 (4.6) | 15.3 (3.9) | -0.9 (4.4) | -0.19 | 1.7 | -3.9 to 1.8 | 0.90 |
| VO₂ at RCP (mL/kg/min) | 26.4 (8.6) | 26.4 (8.0) | -0.0 (3.1) | 0.00 | 25.5 (5.6) | 24.5 (6.6) | -1.1 (4.5) | -0.19 | -0.0 | -3.9 to 1.8 | 0.46 |
| VO₂ max (mL/kg/min) | 31.3 (9.6) | 32.2 (9.4) | 0.9 (2.6) | 0.10 | 31.5 (8.5) | 31.4 (9.1) | -0.1 (4.8) | -0.02 | -0.9 | -2.9 to 3.4 | 0.45 |
| Time-to-exhaustion (s) § | 738 (224) | 780 (254) | 42.0 (64.8) | 0.19 | 716 (181) | 764 (191) | 48.0 (106.3) | 0.26 | -42.0 | -60.6 to 72.7 | 0.85 |

Data expressed as mean (SD), effect size (ES), difference of delta, estimated mean of differences (95% CI), and level of significance for interaction (p) between creatine and placebo (tested by mixed models for repeated measures). Symbols represent main time effects (£ p = 0.005; # p = 0.01; & p = 0.03; § p = 0.01). Abbreviations: Dif. Delta = difference between delta scores; reps = repetitions; VAT = ventilatory anaerobic threshold; RCP = respiratory compensation point; VO₂ = oxygen consumption; VO₂max = maximal oxygen consumption.

Table 3. Anthropometric data, body composition, bone mineral density, and serum bone markers before and after creatine and placebo supplementation.

| Variable | Placebo | | | | Creatine | | | | Creatine vs. Placebo | | |
|---------------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-------|------------------|------------------|------------------|-------|----------------------|-------------------|------|
| | Pre | Post | Delta | ES | Pre | Post | Delta | ES | Dif. Delta | 95% IC | p |
| Body mass (kg) £ | 50.6 (17.7) | 52.9 (19.6) | 1.8 (3.2) | 0.10 | 51.4 (19.1) | 52.6 (19.4) | 1.6 (1.5) | 0.06 | -1.7 | -2.5 to 1,2 | 0.47 |
| Height (cm) φ | 153.4 (15.4) | 154.3 (15.3) | 0.9 (1.3) | 0.06 | 153.2 (16.4) | 153.8 (16.6) | 0.6 (1.5) | 0.04 | -0.9 | -1.3 to 0,8 | 0.61 |
| Lean mass (kg) § | 32.9 (10.9) | 34.0 (11.5) | 0.9 (1.2) | 0.09 | 33.3 (11.2) | 33.9 (11.5) | 0.4 (0.9) | 0.05 | 0.5 | -1.3 to 0,3 | 0.46 |
| Fat mass (kg) | 16.2 (9.9) | 17.4 (11.0) | 0.9 (2.1) | 0.13 | 16.9 (10.5) | 17.2 (10.7) | 0.3 (0.9) | 0.02 | 0.6 | -1.9 to 0,8 | 0.34 |
| Body fat (%) | 30.3 (9.7) | 30.9 (9.8) | 0.2 (2.1) | 0.06 | 31.1 (9.7) | 31.2 (10.7) | 0.0 (1.4) | 0.00 | 0.1 | -1.5 to 1,2 | 0.73 |
| BMC Total (g) + | 1553 (485) | 1592 (570) | 34.50 (48.4) | 0.08 | 1535 (501) | 1593 (495) | 40.59 (40.32) | 0.12 | -6.07 | -27.2 to 39,4 | 0.07 |
| BMD LI-L4 (g/cm²) # | 0.78 (0.14) | 0.80 (0.15) | 0.01 (0.02) | 0.16 | 0.79 (0.16) | 0.81 (0.16) | 0.01 (0.06) | 0.16 | 0.00 | -0.04 to 0,03 | 0.23 |
| BMD TH (g/cm²) | 0.76 (0.17) | 0.79 (0.19) | 0.01 (0.02) | 0.06 | 0.77 (0.17) | 0.78 (0.17) | -0.00 (0.04) | 0.06 | 0.01 | -0.01 to 0,05 | 0.97 |
| BMD WB (g/cm²) ¥ | 0.90 (0.12) | 0.91 (0.13) | 0.01 (0.02) | 0.09 | 0.90 (0.12) | 0.92 (0.12) | 0.03 (0.07) | 0.09 | -0.00 | -0.01 to 0,01 | 0.72 |
| CTX (ng/mL) | 1.37 (0.43) | 1.49 (0.55) | 0.12 (0.45) | -0.22 | 1.36 (0.73) | 1.42 (0.65) | 0.06 (0.58) | -0.09 | -0.06 | -0.45 to 0,33 | 0.75 |
| P1NP (ng/mL) | 440.7 (296.1) | 409.6 (285.5) | -31.0 (93.0) | 0.11 | 454.6 (343.7) | 400.2 (309.3) | -54.4 (163.9) | 0.18 | -23.39 | -123.1 to 76.3 | 0.63 |

Data expressed as mean (SD), effect size (ES), difference of delta, estimated mean of differences (95% CI), and level of significance for interaction (p) between creatine and placebo (tested by mixed models for repeated measures). Symbols represent main time effects (£ p = 0.0028; φ p = 0.0062; § p = 0.0024; + p = 0.001; # p <0.001; ¥ p = 0.001). Abbreviations: Dif. Delta = difference between delta scores BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; L1-L4 = lumbar spine between L1 to L4; TH = total hip; WB = Whole body; CTX = C-telopeptides of type I collagen; P1NP = Procollagen type I N-propeptide

Table 4. Functional capacity, health-related quality of life and global assessment parameters before and after creatine and placebo supplementation in JDM patients.

| Variable (range) | Placebo | | | | Creatine | | | | Creatine vs. Placebo | | |
|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------|------------------|------------------|-----------------|-------|----------------------|--------------------|------|
| | Pré | Post | Delta | ES | Pre | Post | Delta | ES | Dif. Delta | 95% IC | P |
| PedsQL patient (0-100) | 82.03 (10.35) | 84.43 (8.66) | 2.41 (8.90) | 0.23 | 80.03 (14.08) | 82.20 (11.39) | 2.17 (12.31) | 0.15 | -0.24 | -8.3 to 7.8 | 0.95 |
| PedsQL parents (0-100) | 81.93 (12.83) | 81.84 (12.70) | -0.09 (12.06)) | -0.01 | 78.05 (14.17) | 83.09 (11.92) | 5.04 (9.91) | 0.36 | 5.13 | -3.1 to 13.4 | 0.21 |
| CHAQ (0-3) # | 0.21 (0.39) | 0.13 (0.32) | -0.07 (0.14) | -0.18 | 0.15 (0.34) | 0.10 (0.25) | -0.05 (0.12) | -0.16 | 0.02 | -0.1 to 0.1 | 0.74 |
| VAS physician (0-10) | 0.73 (1.09) | 0.93 (0.93) | 0.20 (0.86) | 0.18 | 1.0 (1.25) | 0.46 (0.74) | -0.53 (0.99) | -0.43 | -0.73 | -1.4 to -0.0 | 0.51 |
| VAS patient (0-10) | 1.23 (1.42) | 1.10 (1.13) | -0.13 (0.88) | -0.09 | 1.23 (1.14) | 1.33 (1.44) | 0.10 (1.07) | 0.09 | 0.23 | -0.5 to 0.9 | 0.03 |
| CMAS (0-52) £ | 49.13 (4.42) | 50.33 (2.71) | 1.20 (2.96) | 0.27 | 49.47 (2.92) | 50.40 (2.19) | 0.93 (1.44) | 0.32 | -0.27 | -2.0 to 1.5 | 0.75 |
| MMT (0-80) | 79.73 (0.59) | 80.00 (0.0) | 0.27 (0.59) | 0.45 | 79.73 (0.59) | 79.87 (0.51) | 0.13 (0.83) | 0.22 | -0.13 | -0.7 to 0.4 | 0.61 |
| DAS (0-20) | 2.73 (3.61) | 2.20 (2.93) | -0.53 (2.26) | -0.15 | 2.13 (2.03) | 1.53 (1.84) | -0.60 (1.99) | -0.30 | -0.07 | -1.7 to 1.5 | 0.93 |

Data expressed as mean (SD), effect size (ES), difference of delta, estimated mean of differences (95% CI), and level of significance for interaction (p) between creatine and placebo (tested by Mann-Whitney U tests). Symbols represent main time effects (# p < 0.001; £ p = 0.01).

Abbreviations: Dif. Delta = difference between delta scores; PedsQL= pediatric quality of life inventory; CHAQ = childhood health assessment questionnaire; VAS = visual analogue scale; CMAS = Childhood Myositis Assessment Scale; MMT = Manual Muscle Testing; DAS = Disease Activity Score.

Table 5. Laboratory parameters before and after creatine and placebo supplementation in JDM patients.

| Variable | Placebo | | | | Creatine | | | | Creatine vs. Placebo | | |
|--|----------------|----------------|-----------------|-------|----------------|----------------|-----------------|-------|----------------------|-------------------|------|
| | Pré | Post | Delta | ES | Pre | Post | Delta | ES | Dif. Delta | 95% IC | P |
| CPK (U/L) | 161 (133) | 167 (123) | 6 (63) | 0.05 | 160 (131) | 196 (218) | 36 (106) | 0.28 | 32.0 | -35.2 to 96.6 | 0.35 |
| LDH (U/L) | 338 (118) | 318 (128) | -19.9 (130) | -0.17 | 385 (150) | 351 (118) | -33 (117) | -0.22 | 14.0 | -106.5 to 78.9 | 0.35 |
| Aldolase (U/L) | 4.3 (1.4) | 4.5 (1.8) | 0.1 (1.6) | 0.10 | 5.1 (2.1) | 4.9 (1.9) | -0.2 (1.7) | -0.10 | -0.4 | -1.6 to 0.8 | 0.54 |
| CRP (mg/L) | 2.7 (3.7) | 2.2 (4.1) | -0.5 (3.7) | -0.14 | 2.3 (4.9) | 2.0 (3.5) | -0.3 (6.1) | -0.06 | 0.2 | -3.6 to 4.0 | 0.91 |
| AST (U/L) | 24.2 (4.1) | 22.2 (4.1) | -2.0 (4.6) | -0.48 | 23.6 (9.0) | 22.8 (5.8) | -0.7 (9.9) | -0.08 | 1.3 | -4.5 to 7.0 | 0.65 |
| ALT (U/L) | 30.0 (12.2) | 19.4 (8.5) | -1.4 (7.0) | -0.11 | 21.9 (16.6) | 19.8 (6.9) | -2.1 (17.6) | -0.13 | -0.7 | -10.8 to 9.3 | 0.88 |
| ESR (mm/Hg) | 10.6 (9.0) | 11.8 (11.4) | 0.7 (7.7) | 0.13 | 9.6 (6.7) | 10.2 (9.0) | 0.6 (7.1) | 0.09 | -0.9 | -5.6 to 5.4 | 0.93 |
| Serum potassium (mEq/L) | 4.36 (0.22) | 4.38 (0.29) | 0.02 (0.27) | 0.12 | 4.41 (0.22) | 4.46 (0.29) | 0.06 (0.36) | 0.25 | 0.03 | -0.2 to 0.3 | 0.79 |
| Serum sodium (mEq/L) | 139.6 (3.9) | 139.9 (1.7) | 0.6 (3.4) | 0.10 | 140.3 (2.4) | 140.1 (2.5) | -0.2 (2.5) | -0.08 | -0.87 | -3.1 to 1.4 | 0.58 |
| Urinary urea (mg/24h) | 17.9 (9.2) | 17.1 (6.6) | 0.8 (11.6) | -0.08 | 14.4 (6.9) | 17.1 (10.2) | 0.7 (3.9) | 0.39 | 1.57 | -5.5 to 8.6 | 0.45 |
| Serum urea (mg/dL) | 26.2 (10.6) | 27.2 (11.6) | 1.0 (6.4) | 0.09 | 27.9 (11.8) | 27.7 (10.2) | -0.85 (10.1) | -0.02 | -1.85 | -8.2 to 4.5 | 0.65 |
| Urinary creatinine (g/24h) | 0.78 (0.39) | 0.91 (0.47) | 0.06 (0.36) | 0.31 | 0.83 (0.49) | 0.99 (0.75) | 0.13 (0.52) | 0.32 | 0.02 | -0.4 to 0.4 | 0.89 |
| Serum creatinine (mg/dL) | 0.57 (0.23) | 0.59 (0.21) | 0.01 (0.09) | 0.05 | 0.63 (0.23) | 0.65 (0.24) | 0.01 (0.08) | 0.09 | -0.00 | -0.1 to 0.1 | 0.96 |
| Proteinuria (g/24h) | 0.11 (0.07) | 0.09 (0.02) | -0.02 (0.08) | -0.23 | 0.10 (0.06) | 0.13 (0.16) | 0.03 (0.19) | 0.51 | 0.05 | -0.1 to 0.2 | 0.63 |
| Albuminuria (mg/L) | 7.9 (4.9) | 6.8 (4.2) | -1.4 (5.1) | -0.33 | 6.4 (2.8) | 9.1 (4.6) | 2.9 (5.6) | 0.94 | 4.34 | 0.3 to 8.4 | 0.09 |
| ⁵¹Cr-EDTA (mL/min/1.73m²) | 121 (17) | 110 (23) | -6.4 (17.7) | -0.63 | 107 (19) | 115 (20) | 7.5 (20.7) | 0.38 | 13.8 | -0.4 to 28.0 | 0.43 |

Data expressed as mean (SD). effect size (ES). difference of delta. estimated mean of differences (95% CI). and level of significance for interaction (p between creatine and placebo (tested by mixed models for repeated measures). Abbreviations: Dif. Delta = difference between delta scores; CPK = creatine phosphokinase; LDH = lactate dehydrogenase; CRP = C-reactive protein; AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; ESR = erythrocyte sedimentation rate.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Individual data for intramuscular phosphorylcreatine (PCr) content before and after either creatine or placebo supplementation. A) Absolute values and B) Delta score.

