

Determinação de um método de extração de coenzima Q₁₀ em plasma humano: otimização do uso de surfactantes e outras variáveis

Determination of a method for extraction of coenzyme Q₁₀ in human plasma: optimization of the use of surfactantes and others variables

Claudia Cristina Ferreiro-Barros¹, Eduardo Kinio Sugawara², Livia Rentas Sanches²

RESUMO

Objetivo: Estabelecer uma rotina de extração dos níveis totais de CoQ₁₀ em plasma humano por meio da análise por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC). **Métodos:** foram testados dois protocolos de extração: a) metanol:hexano e b) 1-propanol. Os seguintes parâmetros foram analisados: temperatura de extração (19°C e 4°C), tubos de extração (vidro e polipropileno), surfactantes (SDS, Triton X-100, Tween-20) em diferentes concentrações 1%, 3%, 5% e 10%. **Resultados:** Os resultados mostraram que o método de extração de CoQ₁₀ em amostra de plasma humano, a 4°C, utilizando-se os solventes metanol:hexano (85:15, v/v) na presença do surfactante Tween-20 a 3% e tubos de polipropileno apresentou melhor eficiência e reprodutibilidade quando comparado ao método com 1-propanol. **Conclusão:** A adição do surfactante Tween-20 no processo de preparação de amostra promoveu um aumento na recuperação da CoQ₁₀ pelo método de extração metanol:hexano observada pela boa reprodutibilidade das precatas, pelo baixo coeficiente de variação e alta sensibilidade uma vez que a CoQ₁₀ foi detectada em amostras de plasma de um indivíduo controle utilizando-se um detector do tipo UV. Além disso, a utilização de um equipamento de UHPLC proporcionou a obtenção de uma análise com tempo total de corrida de 3,5 minutos, o que viabiliza a obtenção rápida de resultados, considerado mandatório para rotinas laboratoriais.

Descritores: Coenzimas; Surfactantes; Cromatografia Líquida

ABSTRACT

Objective: To establish a routine for the extraction of the total levels of CoQ₁₀ in human plasma through the Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). **Methods:** Two extraction protocols

were tested: a) methanol: hexane and b) 1-propanol. The following parameters were analyzed: extraction temperature (19°C and 4°C), extraction tubes (glass and polypropylene), and surfactants (SDS, Triton X-100, Tween-20) at different concentrations, i.e., 1%, 3%, 5% and 10%. **Results:** The results showed that the method of extraction of CoQ₁₀ in a sample of human plasma at 4°C, using solvents methanol: hexane (85:15, v/v) in the presence of surfactant Tween-20 at 3% and polypropylene tubes showed better efficiency and reproducibility when compared to the method with 1-propanol. **Conclusion:** By the analyses performed, it was possible to observe that the addition of the surfactant Tween-20 promoted an increase in the recovery of CoQ₁₀ by the methanol:hexane extraction method. This method showed good reproducibility, with a low coefficient of variation and high sensitivity, since CoQ₁₀ was detected in samples of plasma of a control individual using a UV-type detector. The use of UHPLC equipment allowed a total analysis with total run time of 3.5 minutes, enabling the rapid achievement of results, considered mandatory for laboratory routines.

Keywords: Coenzymes; Surfactants; Chromatography, liquid

INTRODUÇÃO

Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀), também conhecida como ubiquinona, é uma molécula lipídica essencial para os organismos aeróbicos. Participa da produção de ATP pela fosforilação oxidativa transferindo elétrons dos complexos respiratórios I e II para o complexo III na membrana interna mitocondrial. Além disso, a CoQ₁₀ participa de muitas outras funções vitais dentro da célula: atua

Trabalho realizado no Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

¹ Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

² Laboratório Clínico/ Química Especial, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Claudia Cristina Ferreiro-Barros – Avenida Albert Einstein, 627 – Morumbi – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP) – Brasil – E-mail: claudiacfb@einstein.br

Data de submissão: 5/9/2011 – Data de aceite: 28/5/2012

Conflitos de interesse: não há.

como antioxidante de lipoproteínas e membranas celulares; sua participação é necessária na biossíntese de pirimidinas, afetando assim os processos de replicação e reparo de DNA; modula o processo de apoptose por meio da regulação dos poros de transição da membrana e auxilia na manutenção da temperatura corpórea decorrente de sua função em proteínas desacopladoras⁽¹⁾.

A CoQ₁₀ é composta por um anel de benzoquinona associada a uma cadeia poliprenil derivada da via do mevalonato, a mesma via da síntese do colesterol. O tamanho dessa cadeia poliprenil varia entre os organismos, a espécie humana apresenta 10 repetições (CoQ₁₀), enquanto camundongos apresentam 9 (CoQ₉) e *Saccharomyces cerevisiae* 6 (CoQ₆).

A síntese endógena da CoQ₁₀ ocorre na mitocôndria⁽¹⁾. É expressa em todos os tecidos, porém, em maior concentração no coração, rins, fígado e músculo, pois são órgãos que necessitam de maior quantidade de energia (ATP) para seu funcionamento, ocorrendo diminuição da sua expressão durante o processo de envelhecimento celular⁽²⁾.

Clinicamente, pacientes com deficiência de CoQ₁₀ são muito heterogêneos, com alta variação fenotípica principalmente em relação às manifestações neurológicas⁽³⁾. Entretanto, alguns subtipos de apresentação clínica parecem ser mais comuns: (1) encefalomiopatia, com miopatia mitocondrial e mioglobulinúria recorrente⁽⁴⁾; (2) envolvimento infantil multissistêmico; (3) síndrome de Leigh; (4) forma miopática⁽⁵⁾; (5) forma atáxica, provavelmente a mais comum dentre as cinco formas⁽⁶⁾; (6) síndrome nefrótica resistente a esteroides⁽⁷⁾. Sua associação com outros fenótipos clínicos como convulsões, fraqueza muscular, retardo mental, oftalmoplegia, neuropatia periférica, sinais piramidais e escoliose é bastante frequente. O hipogonadismo hipergonadotrófico parece ser mais comum em pacientes com início tardio da doença⁽⁸⁾.

A deficiência primária da CoQ₁₀ é autossômica recessiva e está inserida no grupo de Doenças Mitocondriais. É causada por um defeito na via biossintética da ubiquinona a qual ainda não está completamente elucidada⁽⁶⁾. Dentre as doenças mitocondriais descritas, a deficiência de CoQ₁₀ é a única, até o momento, que apresenta chances de tratamento efetivo por meio da administração de CoQ₁₀ exógena⁽⁹⁾.

Grande parte do que se conhece sobre a biossíntese de coenzima Q advém de estudos realizados em *Escherichia coli* e *S. cerevisiae*⁽¹⁰⁾. Há pelo menos uma dezena de genes nomeados como *COQ1*, *COQ2*, *COQ3*... *COQ10* em *S. cerevisiae*, necessários para a função respiratória da coenzima Q⁽¹⁰⁻¹³⁾.

Na espécie humana, já foram descritos pacientes com mutações nos genes *COQ2*, *COQ4*, *COQ6*, *COQ8*, *COQ9*, *PDSS1* e *PDSS2*⁽¹⁴⁻²⁰⁾.

A deficiência secundária no metabolismo da CoQ₁₀ tem sido discutida na patofisiologia de miopatia por estatina, toxicidade por antraciclina e doença de Parkinson, porém ainda não se conhece a relativa contribuição da CoQ₁₀ no desencadeamento dessas doenças^(21,22).

No entanto, a suplementação com CoQ₁₀ é amplamente recomendada em altas doses (30mg/kg em crianças e no mínimo 600mg diariamente em adultos) para todos os pacientes com doenças mitocondriais, pois é um suplemento que não tem efeitos colaterais e traz muitos benefícios para o metabolismo celular^(23,24). Por ser lipofílica, a CoQ₁₀ é transportada na circulação por partículas de lipoproteínas e sua concentração no plasma tem sido correlacionada aos níveis totais de colesterol, principalmente aos de LDL, em pacientes que fazem uso de estatinas^(25,26).

Dada essa possibilidade efetiva de tratamento, o interesse em dosar os níveis de CoQ₁₀ em plasma e outros tipos celulares ou tecidos tem sido alvo de vários estudos. O diagnóstico de deficiência de CoQ₁₀ é realizado por meio da análise da atividade enzimática dos complexos mitocondriais I+II e II+III⁽¹⁾ e também da quantificação dos níveis totais da enzima diretamente no músculo ou fibroblastos. Os níveis de CoQ₁₀ dosados no sangue não são utilizados para diagnóstico, pois a CoQ₁₀ está presente em certos alimentos e é absorvida por meio da dieta. Porém, é utilizada para monitoramento terapêutico em pacientes com comprovada deficiência da coenzima.

Há vários métodos para quantificação de CoQ₁₀ em plasma, células e tecidos descritos na literatura científica. O uso de equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa acoplados a detectores do tipo eletroquímico ou ultravioleta (UV) é bastante frequente. Atualmente, a maioria dos métodos envolve preparação de amostra utilizando-se uma etapa única de diluição com 1-propanol, seguida de injeção direta da amostra em sistema de HPLC^(27,28). Porém, esse método é mais comumente utilizado em detectores do tipo eletroquímico, que apresentam maior sensibilidade permitindo a detecção de concentrações mínimas de CoQ₁₀. Devido à menor sensibilidade dos detectores ultravioleta, o seu uso requer preparo de amostra mais elaborado, com etapas de extração utilizando solventes orgânicos como hexano^(29,30), hexano/metanol^(31,32) ou etanol⁽³³⁾, seguido de concentração da amostra para então posterior injeção em HPLC.

Neste trabalho, foram testados dois métodos de extração de CoQ₁₀ em plasma humano: metanol:hexano e 1-propanol, ambos com detecção UV. Na tentativa de aperfeiçoar os métodos de extração da CoQ₁₀ por detecção UV, foi testada a adição de alguns surfactantes

como o SDS (dodecil sulfato de sódio), Triton X-100 e Tween-20 quanto à possibilidade de obter uma melhor recuperação ao final do processo de extração. Outras variáveis que podem influenciar diretamente no resultado da quantificação da CoQ₁₀ também foram estudadas: temperatura (4°C e 19°C) e tipos de tubos (vidro e polipropileno).

OBJETIVO

Estabelecer uma rotina de extração dos níveis totais de CoQ₁₀ em plasma humano por meio da análise por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC).

MÉTODOS ANALÍTICOS

Reagentes e Solventes

Solventes de grau cromatográfico, metanol, hexano e 1-propanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e Sigma-Aldrich (Missouri, EUA), respectivamente. Reagentes como SDS (dodecil sulfato de sódio), Triton X-100 e padrão de CoQ₁₀ (> 98% de pureza) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA) e Tween 20 foi obtido da Amresco (Solon, EUA). Solução de albumina humana 20% (Grifols Brasil Ltda).

Solução padrão

A solução padrão de CoQ₁₀ foi preparada na concentração de 1mg/mL utilizando-se 1-propanol como solvente de diluição, e armazenada a -20°C protegida da luz.

Preparo da amostra

Para estudos iniciais de otimização e padronização do processo de extração da CoQ₁₀, utilizamos uma solução de albumina humana a 4% com o objetivo de simular amostras de plasma, que foi então, adicionada de solução padrão de CoQ₁₀ resultando na concentração final de 1000mg/mL. Após definição do melhor método de extração, seguiu-se com o protocolo de coleta de sangue conforme descrito a seguir.

Amostras de sangue foram coletadas de um mesmo indivíduo controle por meio de punção venosa periférica em tubos de vidro contendo anticoagulante ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose, e mantidas a 4°C. O plasma foi obtido após centrifugação a 894,2g por 10 minutos a 4°C, transferidos para tubos tipo *ependorf* e estocados a -80°C para posterior análise. A coleta da amostra foi realizada após obtenção de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (nº10/1465).

Métodos de extração de CoQ₁₀

Extração de CoQ₁₀ com metanol:hexano

Utilizou-se o protocolo inicial⁽³⁴⁾, com as seguintes modificações: em tubo de polipropileno e em tubo de vidro foram adicionados 700mL de plasma, 100mL de detergentes (SDS, Triton X-100 e Tween-20) nas concentrações de 1%, 3%, 5% e 10% separadamente, 1400mL de metanol e 1500mL de hexano. As amostras foram submetidas à agitação mecânica por 1 minuto e centrifugadas a 1752,8g por 10 minutos a 10°C. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo e evaporados sem aquecimento sob fluxo de nitrogênio por 20 minutos. Em seguida, os resíduos foram ressuspensos em 60mL de fase móvel metanol:hexano (85:15, v/v), homogeneizados sob agitação mecânica em vórtex por 15 segundos e agitação orbital por 15 minutos. Foram utilizados 20mL para análise cromatográfica. As extrações foram realizadas em triplicatas a 19°C (temperatura controlada) e a 4°C (banho de gelo).

Extração de CoQ₁₀ com 1-propanol

Utilizou-se o protocolo inicial⁽²⁷⁾ com as seguintes modificações: em tubo de polipropileno e em tubo de vidro, foram adicionados 700mL de plasma, 100mL de detergentes (SDS, Triton X-100 e Tween 20) nas concentrações de 1%, 3%, 5% e 10% separadamente, 1400mL de 1-propanol. As amostras foram submetidas à agitação por 1 minuto e centrifugadas a 894,2g por 10 minutos a 10°C, e transferidas para “vial ambar” com o auxílio de unidade filtrante de 0,22mm, 13 mm. A análise cromatográfica foi realizada por meio da injeção de 20mL de amostra. As extrações foram realizadas em triplicatas a 19°C (temperatura controlada) e a 4°C (banho de gelo).

Análise cromatográfica e detecção de CoQ₁₀

Utilizou-se um equipamento para Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) HP1290 (Hewlett-Packard) constituído por amostrador automático, bomba binária e detector UV com comprimento de onda variável. A detecção foi feita em 275nm. Para a separação cromatográfica empregou-se coluna analítica Zorbax Eclips C18® (50 x 2,1mm, 1,8µm), com coluna-guarda equivalente, ambas obtidas da Hewlett-Packard e mantidas a 45°C durante a análise. A CoQ₁₀ apresentou tempo de retenção de 1,5 minutos e o tempo total de análise cromatográfica foi de 3,5 minutos. A fase móvel utilizada foi metanol-hexano (85:15; v/v) com vazão de 0,45mL/min.

Tabela 1. Análise das variáveis interferentes no processo de extração de CoQ₁₀: adição de detergentes, tubos e condição de temperatura

| Variáveis | C V% | Média mUA | Resposta mUA |
|---|------|-----------|--------------|
| Amostras sem adição de detergente, em tubos de polipropileno, 4°C | 14,2 | 8,4 | - |
| Amostras com adição de detergente Triton X-100 a 10%, em tubos polipropileno, 4°C | 5,8 | 11,5 | 3,1 |
| Amostras com adição de detergente Tween-20 a 3%, em tubos polipropileno, 4°C | 4,3 | 12,7 | 4,3 |
| Amostras sem adição de detergente em tubos de polipropileno, 19°C | 3,1 | 7,3 | - |
| Amostras com adição de detergente Triton X-100 a 10%, em tubos de polipropileno, 19°C | 3,3 | 8,1 | 0,8 |
| Amostras com adição de detergente Tween-20 a 3%, em tubos de polipropileno, 19°C | 8,7 | 7,6 | 0,3 |
| Amostras sem adição de detergente em tubos de vidro, 4°C | 4,8 | 7,5 | - |
| Amostras com adição de detergente Triton X-100 a 10%, em tubos vidro, 4°C | 9,9 | 11,2 | 3,7 |
| Amostras com adição de detergente Tween-20 a 3%, em tubos vidro, 4°C | 8,9 | 9,0 | 1,5 |
| Amostras sem adição de detergente, em tubos de vidro, 19°C | 3,6 | 5,6 | - |
| Amostras com adição de detergente Triton X-100 a 10%, em tubos de vidro, 19°C | 3,3 | 8,1 | 2,5 |
| Amostras com adição de detergente Tween-20 a 3%, em tubos de vidro, 19°C | 5,6 | 7,3 | 1,7 |

CV: coeficiente de variação; mUA: unidade de área do pico cromatográfico.

RESULTADOS

Estabelecimento do protocolo de extração de CoQ₁₀

Para o estabelecimento do protocolo de extração de CoQ₁₀ foram realizados, inicialmente, testes utilizando-se solução de albumina humana a 4% adicionada de solução de CoQ₁₀ a 1000mg/mL. Os métodos de extração metanol:hexano e 1-propanol foram testados na presença e ausência de surfactantes como SDS (aniônico), Triton X-100 (não iônico) e Tween-20 (não iônico) nas concentrações de 1%, 3%, 5% e 10%, a 4°C e 19°C. Nos primeiros resultados foi possível observar que o método de extração utilizando-se metanol:hexano na presença dos surfactantes Triton X-100 e Tween-20 apresentou melhores taxas de recuperação de CoQ₁₀, enquanto que com uso de SDS, apresentou menor reprodutibilidade e eficiência (dados não mostrados).

O mesmo protocolo de extração utilizado nos testes com albumina adicionada de CoQ₁₀, foi aplicado em

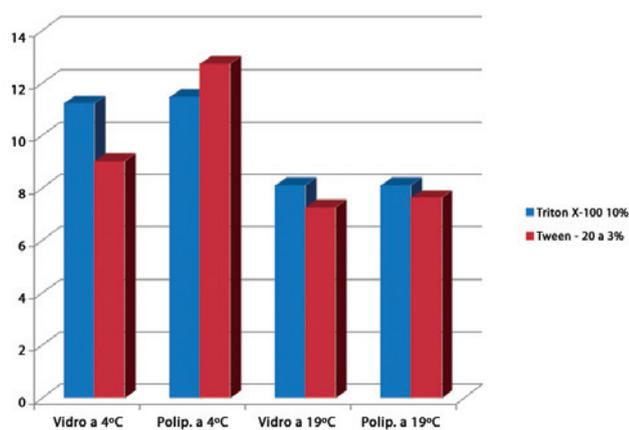


Figura 1. Resultado da extração de CoQ₁₀ em amostras de plasma: comparação da ação do Triton X-100 a 10% e Tween-20 a 3%

amostras de plasma de indivíduos controle sem adição de CoQ₁₀ para verificar a reprodutibilidade do método em amostras reais. As amostras foram analisadas quanto a temperatura de extração (controlada a 19°C e a 4°C, banho de gelo) e quanto a constituição dos tubos utilizados para a extração (polipropileno e vidro), conforme tabela 1.

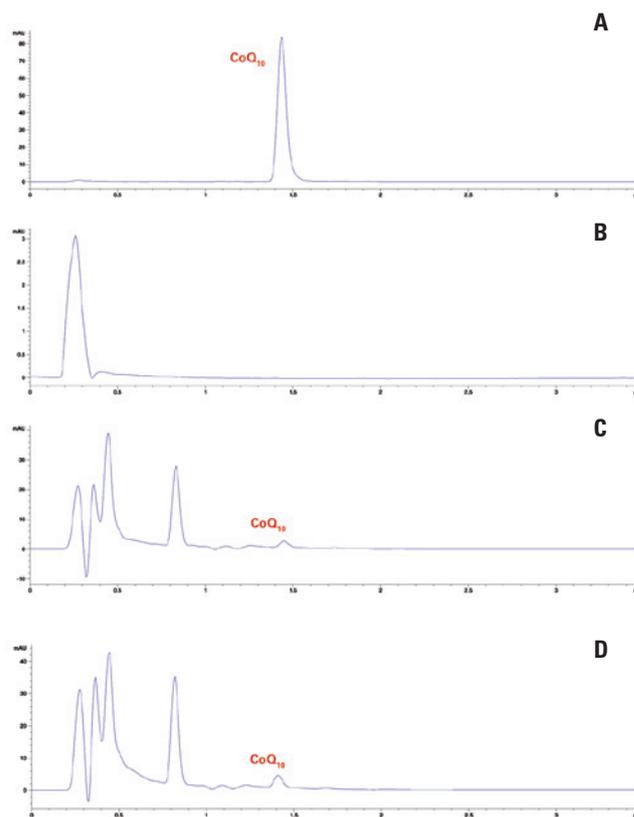


Figura 2. Cromatogramas. (A) solução padrão de CoQ₁₀ na concentração de 1mg/mL; (B) amostra controle de reativos; (C) amostra branco de plasma controle sem adição de detergente; (D) amostra de plasma controle utilizando o detergente Tween-20 a 3%

Os resultados demonstram que as extrações realizadas em amostras reais de plasma apresentaram resposta similar a encontrada em solução de albumina, sendo que o uso do detergente Tween-20 a 3%, a 4°C utilizando-se metanol:hexano, resultou na melhor resposta obtida para detecção de CoQ₁₀ (Figura 1). Além de apresentar a melhor recuperação, também foi observada boa reprodutibilidade entre as replicatas com coeficiente de variação (CV) de 4,3%. Assim, a opção em fazer uso de surfactante como o Tween-20 resultou em uma melhora de (51,2%) de eficiência.

Os cromatogramas demonstram a qualidade cromatográfica obtida com a fase móvel composta de metanol:hexano (85:15, v/v) com fluxo de 0,45mL/min. (Figura 2). O tempo de retenção de CoQ₁₀ foi de 1,45 minutos e a pureza do pico (99%) foi obtida por meio da análise de seu espectro (ChemStation, Agilent).

DISCUSSÃO

A aplicação de técnicas cromatográficas tem sido muito utilizada em estudos de dosagem enzimática e farmacocinética para monitoramento terapêutico. Recentemente, o interesse em dosar os níveis de CoQ₁₀ em plasma e outros tipos celulares ou tecidos tem sido alvo de vários estudos dada a possibilidade de tratamento efetivo em pacientes neurológicos e doenças metabólicas por meio da sua suplementação via oral⁽³⁵⁾.

A CoQ₁₀ está presente no plasma circulante associada a lipoproteínas, sendo que sua concentração está diretamente relacionada à concentração de colesterol presente no plasma⁽³⁶⁾. Devido a essa ligação característica da CoQ₁₀ a moléculas de caráter lipofílico, optamos por fazer uso de surfactantes como auxiliares no processo de extração com o intuito de promover o rompimento desse tipo de ligação e assim aumentar os níveis de detecção da coenzima. Alguns autores demonstraram que a ação do SDS em plasma aumenta significativamente a recuperação da CoQ₁₀ após processo de extração⁽³⁷⁾. Já a ação do Triton X-100 na solubilização de membranas foi observada tanto em proteínas quanto em lipídeos⁽³⁸⁾. De fato, ao iniciar os primeiros experimentos, baixas taxas de detecção de CoQ₁₀ foram obtidas sem adição de surfactantes durante o processo de extração, observadas pela pequena área do pico cromatográfico (mUA).

Neste trabalho, os melhores resultados foram obtidos com o método de extração metanol:hexano quando comparado a 1-propanol. Alguns autores utilizam o 1-propanol como solvente de precipitação de proteínas devido ao seu maior caráter lipofílico, porém o sucesso do uso dessa técnica ocorre somente quando utilizada em detectores do tipo eletroquímico, uma vez que esse

é mais sensível do que o utilizado neste estudo (UV). Isso ocorre porque essa técnica não permite concentrar a amostra no processo de extração, assim a adição de 1-propanol apenas atua precipitando as proteínas e diluindo a amostra, tornando mais difícil a quantificação da CoQ₁₀ utilizando detectores UV. Observou-se também que a utilização dos surfactantes Triton X-100 e Tween-20 resultaram em melhores taxas de recuperação de CoQ₁₀ enquanto o uso de SDS apresentou menor reprodutibilidade e eficiência. Além disso, mesmo utilizado em baixas concentrações, o SDS promoveu a formação de “ponto de nuvem” que prejudicou a separação das fases orgânica e aquosa.

Quando o protocolo estabelecido utilizando-se solução de albumina humana foi aplicado para extração de CoQ₁₀ em amostras reais de plasma, observou-se resposta similar com o uso do surfactante Tween 20 a 3%, a 4°C em metanol:hexano, resultando em melhor recuperação, boa reprodutibilidade entre as replicatas, CV de 4,3% e um aumento de 51,2% de eficiência no processo de extração.

A temperatura também é um parâmetro relevante a ser avaliado quando a substância estudada é uma enzima, que por ser termolábil, pode facilmente sofrer desnaturação a temperaturas mais elevadas.

Os melhores resultados deste trabalho mostraram que o controle da temperatura (4°C) é de primordial importância durante o processo de extração. Observou-se também que houve uma melhor separação das fases orgânica e aquosa quando utilizados tubos de polipropileno contribuindo, de fato, para uma melhora na eficiência de extração.

CONCLUSÃO

Pelas análises realizadas foi possível observar que a adição do surfactante Tween-20 promoveu um aumento na recuperação da CoQ₁₀ pelo método de extração metanol:hexano. Este método mostrou boa reprodutibilidade, apresentando um CV baixo e sensibilidade alta, uma vez que a CoQ₁₀ foi detectada em amostras de plasma de um indivíduo controle utilizando-se um detector do tipo UV.

A utilização de um equipamento de UHPLC proporcionou a obtenção de uma análise com tempo total de corrida de 3,5 minutos, o que viabiliza a obtenção rápida de resultados, considerado mandatório para rotinas laboratoriais.

Terminada esta etapa de otimização do método, este protocolo de extração está em fase de validação o que possibilitará sua aplicabilidade para futuros exames clínicos com garantia de resultados confiáveis.

AGRADECIMENTOS

Ao pesquisador Lionel F. Gamarra, Instituto do Cérebro, pelo auxílio no início do trabalho, à Marta J. Diniz pelo apoio técnico laboratorial, à Dra. Anna Carla Goldberg por permitir o desenvolvimento deste trabalho no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital Israelita Albert Einstein. Ao Dr. Edson Amaro Júnior pela confiança depositada para o desenvolvimento deste trabalho. À FAPESP pelo apoio financeiro (10/51924-0).

REFERÊNCIAS

- Rahman S, Clarke C., Hirano M. 176th ENMC International Workshop: Diagnosis and treatment of coenzyme Q10 deficiency. *Neuromus Disord.* 2012; 22(1):76-86.
- Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1660(1-2):171-99. Review.
- Quinzii CM, DiMauro S, Hirano M. Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochem Res.* 2007;32(4-5):723-7.
- Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(7):2379-82.
- Musumeci O, Naini A, Slonim AE, Skavin N, Hadjigeorgiou GL, Krawiecki N, ET al. Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology.* 2001;56(7):849-55.
- Montero R, Pineda M, Aracil A, Vilaseca MA, Briones P, Sánchez-Alcázar JA, ET al. Clinical, biochemical and molecular aspects of cerebellar ataxia and Coenzyme Q10 deficiency. *Cerebellum.* 2007;6(2):118-22.
- Salviati L, Sacconi S, Murer L, Zacchello G, Franceschini L, Laverda AM, et al. Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology.* 2005;65(4):606-8.
- Gironi M, Lamperti C, Nemni R, Moggio M, Comi G, Guerini FR, et al. Late-onset cerebellar ataxia with hypogonadism and muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology.* 2004;62(5):818-20.
- Lagier-Tourenne C, Tazir M, López LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, et al. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet.* 2008;82(3):661-72.
- Gin P, Clarke CF. Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase. *J Biol Chem.* 2005;280(4):2676-81.
- Tzagoloff A, Dieckmann CL. PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 1990;54(3):211-25.
- Johnson A, Gin P, Marbois BN, Hsieh EJ, Wu M, Barros MH, et al. COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31397-404.
- Barros MH, Johnson A, Gin P, Marbois BN, Clarke CF, Tzagoloff A. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *Biol Chem.* 2005;280(52):42627-35.
- Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, Dimauro S, et al. A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet.* 2006;78(2):345-9.
- Salviati L, Trevisson E, Rodriguez Hernandez MA, Casarin A, Pertegato V, Doimo M, et al. Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *J Med Genet.* 2012;49(3):187-91.
- Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, et al. COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest.* 2011;121(5):2013-24.
- Mollet J, Delahodde A, Serre V, Chretien D, Schlemmer D, Lombes A, et al. CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet.* 2008;82(3):623-30.
- Duncan AJ, Bitner-Glindzic M, Meunier B, Costello H, Hargreaves IP, López LC, et al. A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am J Hum Genet.* 2009;84(5):558-66.
- Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, Dallner G, Chretien D, Delahodde A, et al. Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest.* 2007;117(3):765-72.
- López LC, Schuelke M, Quinzii CM, Kanki T, Rodenburg RJ, Naini A, et al. Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet.* 2006; 79(6):1125-9.
- Lamperti C, Naini AB, Lucchini V, Prella A, Bresolin N, Moggio M, et al. Muscle coenzyme Q10 level in statin-related myopathy. *Arch Neurol.* 2005; 62(11):1709-12.
- Molyneux SL, Young JM, Florkowski CM, Lever M, George PM. Coenzyme q10: is there a clinical role and a case for measurement? *Clin Biochem Rev.* 2008;29(2):71-82.
- Ernster, L., Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1271(1):195-204.
- Dimauro S, Rustin P. A critical approach to the therapy of mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(12):1159-67.
- Kaikkonen J, Nyyssönen K, Salonen JT. Measurement and stability of plasma reduced, oxidized and total coenzyme Q10 in humans. *Scand J Clin Lab Invest.* 1999;59(6):457-66.
- Edlund PO. Determination of coenzyme Q10, alpha-tocopherol and cholesterol in biological samples by coupled-column liquid chromatography with coulometric and ultraviolet detection. *J Chromatogr.* 1988;425(1):87-97.
- Tang PH, Miles MV, DeGrauw A, Hershey A, Pesce A. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q(10) in human plasma. *Clin Chem.* 2001;47(2):256-65.
- Littarru GP, Mosca F, Fattorini D, Bompadre S, Battino M. Assay of coenzyme Q10 in plasma by a single dilution step. *Methods Enzymol.* 2004;378:170-6. Review.
- Okamoto T, Fukunaga Y, Ida Y, Kishi T. Determination of reduced and total ubiquinones in biological materials by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr.* 1988;430(1):11-9.
- Kommuru TR, Khan MA, Ashraf M, Kattenacker R, Reddy IK. A simplified chromatographic method for quantitative determination of coenzyme Q10 in dog plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;16(6):1037-40.
- Takada M, Ikenoya S, Yuzuriha T, Katayama K. Simultaneous determination of reduced and oxidized coenzyme Q10 in human plasma. *Methods Enzymol.* 1984;105:147-55.
- Yamashita S, Yamamoto Y. Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative stress. *Anal Biochem.* 1997;250(1):66-73.
- Wang Q, Lee BL, Ong CN. Automated high-performance liquid chromatographic method with precolumn reduction for the determination of ubiquinol and ubiquinone in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;726(1-2):297-302.
- Karpińska J, Mikoluc B, Motkowski R, Piotrowska-Jastrzebska J. HPLC method for simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;42(2):232-6.
- Alleva R, Tomasetti M, Bompadre S, Littarru GP. Oxidation of LDL and their subfractions: kinetic aspects and CoQ10 content. *Mol Aspects Med.* 1997;18 Suppl:S105-12.
- Menke T, Niklowitz P, de Sousa G, Reinehr T, Andler W. Comparison of coenzyme Q10 plasma levels in obese and normal weight children. *Clin Chim Acta.* 2004;349(1-2):121-7.
- Hirota K, Kawase M, Kishie T. Effect of sodium dodecyl sulphate on the extraction of ubiquinone-10 in the determination of plasma samples. *J Chromatogr.* 1984;310(1):204-7.
- González-Mañas JM, Virto MD, Gurtubay JI, Goñi FM. The interaction of Triton X-100 with purple membranes. Detergent binding, spectral changes and membrane solubilization. *Eur J Biochem.* 1990;188(3):673-8.