

**RAFAEL DE PAIVA LUCIANO**

Associação do Polimorfismo da Enzima  
Conversora de Angiotensina I e Escoliose  
Idiopática do Adolescente

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo, para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências.**

**SÃO PAULO**

**2014**

**RAFAEL DE PAIVA LUCIANO**

Associação do Polimorfismo da Enzima  
Conversora de Angiotensina I e Escoliose  
Idiopática do Adolescente

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo, para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências.**

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. FLÁVIO FALOPPA  
**COORIENTADORES:** Prof. Dr. EDUARDO BARROS PUERTAS  
Prof. Dr. RONALDO CARVALHO ARAÚJO

**SÃO PAULO**

**2014**

Luciano, Rafael de Paiva

**Associação do polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina I e Escoliose Idiopática do Adolescente** / Rafael de Paiva Luciano – São Paulo, 2014.

xvi, 89 folhas.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Titulo em inglês: Association of the Angiotensin I Converting Enzyme Polymorphism and Adolescent Idiopathic Scoliosis.

1. Escoliose Idiopática do Adolescente. 2. Enzima Conversora de Angiotensina I. 3. Polimorfismo. 4. Etiologia.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIRURGIA TRANSLACIONAL**

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Marco Antonio Luciano e Thais Helena de Paiva,**

*por priorizarem e valorizarem a educação, e por não medirem esforços para que seus filhos a recebessem de maneira plena.*

À minha esposa, **Mariana,** e ao meu filho, **Leonardo,**

*por serem a força motriz que me impulsiona a superar obstáculos e barreiras que, sem eles, seriam intransponíveis.*

## **AGRADECIMENTOS**

Toda pesquisa científica envolve direta e indiretamente incontáveis parcerias que fazem com que um projeto de pesquisa se concretize. Por isso, agradeço à instituição Universidade Federal de São Paulo por ter me proporcionado o ambiente necessário para a realização desta tese.

Ao **Prof. Dr. FLÁVIO FALOPPA**, PROFESSOR TITULAR DO DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, pelas discussões, orientações e pelo compartilhamento de sua sabedoria.

Ao **Prof. Dr. EDUARDO BARROS PUERTAS**, PROFESSOR ASSOCIADO, LIVRE DOCENTE e CHEFE DO GRUPO DE COLUNA VERTEBRAL DA DISCIPLINA DE ORTOPEDIA DO DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, pelo apoio em todas as etapas da minha especialização e pós-graduação. Por dividir a cultura e o conhecimento dos quais é detentor e, mais do que isso, por ser referência de ética, respeito e caráter.

Ao **Prof. Dr. RONALDO DE CARVALHO ARAÚJO**, PROFESSOR ADJUNTO E CHEFE DO LABORATÓRIO DE PESQUISA GENÉTICA DO EXERCÍCIO E METABOLISMO DO DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, por ter me aberto as portas do seu laboratório, que é uma fonte inesgotável de

conhecimento. A seriedade com que encara a pesquisa científica e o respeito pelo próximo são algumas das qualidades que destaco do meu coorientador e amigo.

Ao **Dr. SANDRO SOARES ALMEIDA**, PÓS-DOCTORANDO DO LABORATÓRIO DE PESQUISA GENÉTICA DO EXERCÍCIO E METABOLISMO DA UNIFESP, por todos os seus ensinamentos, desde o funcionamento do laboratório até nas mais profundas discussões científicas. A um amigo que nunca me faltou quando precisei.

Ao **Dr. MARCELO WAJCHENBERG**, PROFESSOR AFILIADO E DOUTOR EM CIÊNCIAS DO DEPARTAMENTO DE ORTOPIEDIA E TRAUMATOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, por ter semeado no seu aluno a vontade de ser pesquisador. Agradeço por ter depositado sua confiança e pela ajuda indispensável na elaboração e realização deste projeto.

À toda equipe do LABORATÓRIO DE PESQUISA GENÉTICA DO EXERCÍCIO E METABOLISMO DA UNIFESP, que me acolheu com muito respeito e amizade. Os anos de convivência com essa equipe me convenceram de que todo esforço foi recompensado pelas brilhantes pessoas que conheci neste trajeto.

Aos integrantes do GRUPO DE COLUNA VERTEBRAL DA DISCIPLINA DE ORTOPIEDIA DO DEPARTAMENTO DE ORTOPIEDIA E TRAUMATOLOGIA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, **DR.**

**DAVID DEL CURTO, DR. DELIO E. MARTINS FILHO E DR. RENATO UETA**, por proporcionarem momentos de alegria e companheirismo. São colegas nos quais me inspiro pela força de vontade e caráter como conduzem suas carreiras.

À secretária da Pós-Graduação do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo, **ROSELI PASCHOA**, que me norteou em todos os passos da realização desta tese.

Aos **PACIENTES E VOLUNTÁRIOS DO ESTUDO**, que acreditaram na seriedade desta pesquisa científica e contribuíram para a realização do projeto.

À **FAPESP – FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO**, pelo fomento concedido para a realização deste projeto (Auxílio Regular à Pesquisa – processo 2012/00636-0, Outorgado: Prof. Dr. Eduardo Barros Puertas).

À **CAPES – COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESQUISA DE ENSINO SUPERIOR**, pelo apoio financeiro como bolsista de mestrado.



## SUMÁRIO

Dedicatórias .....	v
Agradecimentos .....	vi
Sumário .....	ix
Listas .....	x
Resumo .....	xvi
1. Introdução .....	1
2. Objetivos.....	7
3. Literatura .....	10
4. Métodos .....	22
5. Resultados .....	39
6. Discussão .....	47
7. Conclusões .....	64
8. Referências .....	66
Normas Adotadas.....	80
Abstract .....	81
Anexos .....	82
Fontes consultadas .....	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estatística utilizada para cálculo amostra.	23
Figura 2.	Representação radiográfica da mensuração das curvas pela técnica de Cobb.....	25
Figura 3.	Sequência amplificada do gene da ECA.....	32
Figura 4.	Eletroforese em gel de agarose 2% .....	35
Figura 5.	Gel de agarose 2% com iniciador interno.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupo de pacientes com escoliose idiopática do adolescente .....	26
Tabela 2	Resultados das variáveis avaliadas no Grupo 1 .....	40
Tabela 3	Resultados da genotipagem da ECA e cálculo do <i>oddsratio</i> .....	43

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Distribuição genotípica do polimorfismo I/D da ECA no grupo controle e no grupo com escoliose do adolescente; II – homizigoto para inserção; ID – heterozigoto; DD – homozigoto para deleção. 41
- Gráfico 2 Distribuição dos alelos do gene da ECA no grupo controle e no grupo com escoliose idiopático do adolescente. ECA – Enzima conversora do angitensina; EIA – Escoliose idiopática do adolescente; I – Inserção; D – Deleção. .... 42
- Gráfico 3 Distribuição de frequência de genótipos no grupo controle, nas curvas menores que 50° e nas curvas graves (>50° ). EIA – Escoliose idiopática do adolescente; II – homozigoto para inserção; ID – heterozigoto; DD – homozigoto para deleção ..... 44
- Gráfico 4 Distribuição dos alelos do gene da ECA no grupo controle e no grupo com escoliose menor que 50° e maior que 50° ECA – Enzima conversora de Angiotensina; EIA – Escoliose idiopática do adolescente; I – Inserção; D – Deleção. .... 44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACTN -3	Alfa actinina 3
B	Branco
B2	Receptor B2 de cininas
C7	Sétima vértebra cervical
°C	Grau Celsius
CALM1	Calmodulina 1
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COL1A1	Gene do colágeno do tipo 1
COL1A2	Gene do colágeno do tipo 1
D	Alelo D da ECA
DD	Genótipo homozigoto <i>DD</i> da ECA
DNA	Acidodesoxidoribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos fosfatados
DPP9	Dipeptil peptidase 9
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EIA	Escoliose idiopática do adolescente
EI	Escoliose idiopática
Elastin	Elastina
EMG	Eletromiográfica
EPM	Escola Paulista de Medicina
ESR	Receptores de estrogênio
<i>et al.</i>	E colaboradores
FBN1	Gene da fibrilina 1

GHR	Receptor do hormônio do crescimento
GPÉR	Receptores de estrógenos acoplados a proteína G
H <sub>2</sub> O	Água
I	Alelo inserção da ECA
IBGE	Instituição Brasileira de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
ID	Genótipo heterozigoto de Inserção e Deleção da ECA
IGF-1	Fator de crescimento <i>insulina-like</i>
IL-6	Interleucina 6
II	Genótipo homozigoto de Inserção da ECA
Kb	Kilo bases
L3	Terceira vértebra lombar
LBX1	Gene <i>Ladybirdhomeobox 1</i>
M	Marcador de massa molecular 100pb
<	Menor que
>	Maior que
MATN1	Matrilina 1
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
Min	Minuto
MMP-3	<i>Matrix metalloproteinase 3</i>
μL	Microlitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
N	Normal
OR	<i>OddsRatio</i>
p	Nível de significância
pb	Pares de base

PCR	<i>Polymerasechainreaction</i> (reação em cadeia de polimerase)
pH	Potencial hidrogênionico
PvuII	Polimorfismo do gene do receptor de estrógeno
®	Marca registrada
s	Segundos
SNP	<i>Single nucleotidepolymorphism</i> (polimorfismo de nucleotídeo único)
SRA	Sistema renina angiotensina
T4	Quarta vértebra torácica
T9	Nona vértebra torácica
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TIMP	Inibidores das metaloproteinases
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
Xbal	Polimorfismo do gene do receptor de estrógeno
VDR	Gene receptor da vitamina D





## RESUMO

**Introdução:** A escoliose idiopática é a deformidade mais frequente na coluna vertebral de crianças e adolescentes, no entanto, sua etiologia permanece desconhecida. Os fatores genéticos e a teoria etiológica do desequilíbrio muscular influenciaram na escolha da avaliação do polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina I nas pacientes com escoliose idiopática do adolescente. **Objetivo:** Avaliar a relação entre o polimorfismo genético da enzima conversora de angiotensina I e a presença da escoliose idiopática do adolescente. **Métodos:** Foram avaliadas 97 pacientes com escoliose idiopática do adolescente e 137 indivíduos saudáveis, do gênero feminino, com idades semelhantes. Após coleta e isolamento do DNA genômico, os participantes foram genotipados para o polimorfismo Inserção/Deleção do gene da enzima conversora de angiotensina I. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste qui-quadrado e estimado o OddsRatio, adotando-se um nível de significância de 5%. **Resultados:** As pacientes com escoliose apresentaram a seguinte distribuição genotípica: DD – 46,4%, ID – 45,4% e II – 8,2%. No grupo controle: DD - 40,1%, ID - 48% ID e II - 16,1%. A diferença encontrada entre os dois grupos, não obteve significância estatística ( $p = 0,197$ ). A porcentagem total do alelo deleção (D) encontrada nos pacientes com escoliose foi 69,1%, enquanto, no grupo-controle foi de 62% ( $p = 0,116$ ). **Conclusão:** Não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina I e a presença de escoliose idiopática do adolescente.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

A escoliose idiopática (EI) é a deformidade mais frequente na coluna vertebral de crianças e adolescentes, havendo relatos de sua incidência na população mundial de 0,3% a 15,3% (LONSTEIN, 1994). É definida como um desvio lateral estruturado na coluna vertebral associado ao desvio rotacional, em indivíduos que não apresentam distúrbios neurológicos, musculares ou outras doenças conhecidas causadoras de escoliose. A EI pode ocorrer na criança saudável em qualquer estágio do crescimento, no entanto, na maioria dos casos (84% a 89%), a deformidade inicia-se próximo ao período puberal (WYNNE-DAVIES, 1968; LONSTEIN, 1994).

A etiologia da EI permanece desconhecida, apesar dos inúmeros trabalhos científicos publicados sobre a etiopatogenia dessa doença. Diversas teorias foram sugeridas como causais da escoliose idiopática do adolescente (EIA). A etiologia genética, o desvio do padrão do crescimento, alterações no disco intervertebral e nos ligamentos espinhais e alterações nas forças biomecânicas da manutenção da postura ereta, figuram como alguns dos principais fatores intrínsecos relacionados à doença. Entre os fatores extrínsecos identificados na literatura destacamos a teoria da assimetria corporal, disfunção do sistema nervoso, alterações na musculatura paravertebral, anomalias nas costelas e caixa torácica, osteoporose, anormalidade na morfologia e função das plaquetas e alterações hormonais (DE GEORGE, FISHER, 1967; CHAGAS, PUERTAS, LAREDO FILHO, 1993; GORMAN, JULIEN, MOREAU, 2012).

Desde o século XIX foi estabelecido que o desenvolvimento e a progressão da escoliose dependeriam primariamente da insuficiência da musculatura paravertebral (Adams, 1882). Estudos histoquímicos e de atividade eletromiográfica associaram uma disfunção primária da musculatura paraespinal com a presença da EIA (FIDLER, JOWETT, 1976; FORD *et al.*, 1984; CHAGAS, PUERTAS, LAREDO FILHO, 1993; MEIER *et al.*, 1997; CHEUNG *et al.*, 2005). Além disso, já é amplamente conhecida a associação entre doenças neuromusculares e o desenvolvimento de escoliose secundária (KOUWENHOVEN *et al.*, 2006).

A EI é uma doença marcada por uma complexidade fenotípica que envolve variações na magnitude e morfologia da curva, idade de início da doença e índice de progressão. Apresenta um prognóstico não menos complexo, que varia desde um rápido aumento da magnitude da curva até a observação de casos nos quais a doença não progride (GORMAN, JULIEN, MOREAU, 2012).

O entendimento do código genético destes pacientes é peça-chave na compreensão das diferentes manifestações fenotípicas dessa doença. Além disso, pode ajudar a identificar as pessoas que possuem uma maior predisposição e risco de progressão das curvas, portanto, prevenir sua evolução (WYNNE-DAVIES, 1968; CZEIZEL *et al.*, 1978; LONSTEIN, 1994; WISE *et al.*, 2000; WAJCHENBERG *et al.*, 2010; GORMAN, JULIEN, MOREAU, 2012).

Algumas regiões cromossômicas já foram relacionadas à escoliose EI, entre elas, o braço curto do cromossomo 6 e nos braços longos dos cromossomos 10 e 18 (WISE *et al.*, 2000), 19p13.3 (CHAN *et al.*, 2002),

Xq23-26.1 (JUSTICE *et al.*, 2003), 12p (RAGGIO *et al.*, 2009) e o cromossomo 17 (SALEHI *et al.*, 2002; OCAKA *et al.*, 2008).

Os estudos de polimorfismos genéticos objetivam correlacionar alterações nas sequências do DNA de determinadas proteínas com a manifestação fenotípica da doença. São estudos indicados para pesquisa de susceptibilidade a doenças multifatoriais. Na escolha do polimorfismo alvo do estudo, a revisão daqueles relacionados ao funcionamento metabólico da fibra muscular foi fundamental para a eleição do polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011).

O polimorfismo genético da ECA está entre as mais de 200 sequências variantes de genes que estão relacionadas aos fenótipos de desempenho físico e de boa condição física (BRAY *et al.*, 2009). A determinação do tipo de fibra muscular é complexa e sua composição inicial é fortemente influenciada pelos polimorfismos genéticos. Há uma conhecida relação entre os polimorfismos do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) e o desempenho de grupamentos musculares específicos (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011).

O gene ECA está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q23), possui 21 Kilo bases (Kb) e compreende 26 *exons* e 25 *introns*. Um polimorfismo descrito no gene da ECA humana envolve a presença (alelo inserção, I) ou a ausência (alelo deleção, D) de 287-pb da sequência do DNA na região do *intron* 16. Trabalhos prévios verificaram que a atividade da ECA plasmática em portadores do genótipo ID e DD era maior quando comparada à dos indivíduos que possuíam o genótipo II (RIGAT *et al.*, 1990; ALMEIDA *et al.*, 2010). A redução da atividade da ECA, associada ao alelo inserção, tem sido relacionada com a eficiência muscular

das fibras do tipo I, aeróbicas, e conseqüentemente maior capacidade de resistência muscular em indivíduos saudáveis (ZHANG *et al.*, 2003).

Na análise do padrão histoquímico da musculatura paravertebral de indivíduos sadios predominam as fibras do tipo I (57-62%). Esses músculos, assim como o músculo sóleo, tibial anterior, adutor do polegar, diafragma e musculatura extraocular, necessitam de uma maior demanda de energia do que os outros, com metabolismo fundamentalmente aeróbico, relacionado a fibras do tipo 1 (JOHNSON *et al.*, 1973; THORSTENSSON, CARLSON, 1987). No entanto, em pacientes com EIA ocorre uma diminuição da proporção das fibras do tipo 1 na musculatura paravertebral, principalmente no lado côncavo da curva (MEIER *et al.*, 1997).

A avaliação do polimorfismo genético da ECA em pacientes com EIA poderá identificar um possível *locus* cromossômico associado à doença. Além disso, a análise deste polimorfismo, que interfere na capacidade metabólica das fibras musculares, pode auxiliar na compreensão de duas teorias etiológicas da EIA: a teoria do desequilíbrio muscular e a teoria genética.

**OBJETIVO**





## **2. Objetivo**

Avaliar a relação entre o polimorfismo genético da enzima conversora de angiotensina I e a presença da escoliose idiopática do adolescente.

**LITERATURA**



### 3. Literatura

#### 3.1 Escoliose Idiopática do Adolescente e Genética

ADAMS (1882) descreveu detalhadamente a anatomia patológica das curvas escolióticas, destacando, após observações clínicas e revisão de opiniões de outros autores, as prováveis causas dos desvios laterais da coluna vertebral. Além disso, postulou que esta deformidade estava associada não apenas à debilidade muscular, mas também a uma frouxidão dos ligamentos espinhais, alterações estruturais ósseas e na “cartilagem” intervertebral e uma susceptibilidade genética.

DE GEORGE, FISHER (1967) em análise epidemiológica de 446 portadores de escoliose idiopática, 29% dos pacientes masculinos e 17% das meninas com escoliose tinham algum parente afetado. A amostra contava com 14 gêmeos, todos os seis gêmeos monozigóticos e o total de quatro gêmeos dizigóticos de mesmo gênero eram concordantes para a presença da escoliose, entre os quatro gêmeos dizigóticos com gêneros opostos, apenas um par era discordante para a presença de escoliose. Concluíram que o padrão de herança não era dominante e, provavelmente, também não era poligênico. A não ser que estes genes fossem extremamente comuns na população geral, ressaltaram os autores.

WYNNE-DAVIES (1968) estudou as famílias de 114 pacientes com escoliose idiopática (EI) e, aproximadamente, 25% da amostra apresentava algum familiar afetado. Evidenciou em sua amostra a diferença entre as características da curva, de acordo com a sua classificação, em infantil, juvenil e adolescente. Observou que o fator genético é mais influente no grupo de adolescentes, com algumas características de herança dominante,

havendo a necessidade de estudos com maior número de casos para definir o padrão de herança.

CZEIZEL *et al.* (1978) realizaram estudo epidemiológico familiar de 116 pacientes, abrangendo familiares de primeiro, segundo e terceiro graus. Após análise, apoiaram a teoria de hereditariedade poligênica e um modelo etiológico multifatorial. Concluíram que os estudos genéticos podem contribuir para o diagnóstico precoce e prevenção da doença.

CARR *et al.* (1992) investigaram o *locus* COL1A1 (17q) e o *locus* COL1A2 (7q), regiões genéticas responsáveis pela codificação do colágeno do tipo 1, e o gene COL2A1 (12q). Após a análise de segregação de quatro famílias com múltiplos membros afetados, concluíram que não houve a associação entre esses *loci* cromossômicos estudados e a EIA.

INOUE *et al.* (1998) investigaram 21 pares de gêmeos com EI, 13 pares monozigóticos e oito dizigóticos. Houve concordância para a doença em 92,3% dos monozigóticos e 62,5% dos gêmeos dizigóticos. Após análise do tipo e da magnitude da curva entre esses gêmeos, concluíram que o fator genético influenciava na gravidade e no formato da curva.

AXENOVICH *et al.* (1999) estudaram 101 famílias de pacientes com EI, por meio da análise da segregação, levando em consideração a idade e o gênero do paciente. Concluíram que os pacientes com curvas maiores do que 11 graus têm como fator causal um padrão genético de herança dominante com penetrância incompleta. Segundo os autores, mesmo com a presença de alelos mutantes, apenas 30% dos homens e 50% das mulheres manifestariam essa doença.

WISE *et al.* (2000) publicaram um estudo de ligação em famílias com vários membros afetados por EI no qual buscaram mapear os genes envolvidos com a suscetibilidade à doença. Incluíram no estudo apenas as famílias nas quais os probandos apresentavam a magnitude da curva maior que 50 graus. Nestas famílias, encontraram uma possível ligação no braço curto do cromossomo 6 e nos braços longos dos cromossomos 10 e 18.

CHAN *et al.* (2002) analisaram membros de sete famílias chinesas com 25 membros com escoliose idiopática do adolescente (EIA). Por meio de estudo de ligação e utilizando aproximadamente 400 marcadores microssatélites, mapearam um *locus* na região 13.3 do braço curto do cromossomo 19. Destacaram que nesta região existem 71 sequências genéticas possíveis identificadas, que podem estar relacionadas à expressão gênica em condrócitos, osteoclastos, músculos ou tendões. Reconheceram que o sequenciamento destes genes seria necessário para identificar o defeito molecular.

INOUE *et al.* (2002) realizaram as primeiras análises de polimorfismos em pacientes com EI. O objetivo do estudo era determinar se os polimorfismos do gene do receptor de estrógeno correlacionavam-se com a gravidade da curva em 304 meninas com a deformidade. O gene do receptor de estrogênio foi amplificado a partir dos linfócitos do ácido desoxirribonucleico (DNA) através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados sugeriram que o polimorfismo do sítio XbaI estava associado com a gravidade da curva.

SALEHI *et al.* (2002) estudaram três gerações de uma família italiana com 11 indivíduos com EIA de transmissão autossômica

dominante. E identificaram a região 17p11 com possível ligação com a presença da deformidade.

JUSTICE *et al.* (2003) desenharam um estudo para identificar um *locus* no cromossomo X, relacionado à presença da EIA. Participaram deste estudo de ligação genética em escoliose familiar 202 famílias e 1198 indivíduos. Foram avaliados 15 marcadores ligados ao cromossomo X. Os autores estratificaram as famílias de acordo com dois prováveis modelos de herança: um ligado ao X dominante e outro modelo autossômico dominante. E identificaram alguns *locis* de suscetibilidade no cromossomo X. Além disso, destacaram que a identificação de prováveis genes candidatos teria um efeito direto no diagnóstico e controle da escoliose por meio de novas estratégias terapêuticas.

MILLER *et al.* (2005), em desenho de estudo e amostras semelhantes ao publicado por JUSTICE *et al* em 2003, analisaram 391 marcadores genéticos, em 202 famílias, com pelo menos dois parentes afetados pela EIA. Concluíram que as regiões candidatas nos cromossomos 6, 9, 16 e 17 foram consideradas com forte evidência de ligação com a doença.

WU *et al.* (2006), em estudo de caso-controle, investigaram a associação de polimorfismos do gene receptor de estrogênio com EIA. Esse estudo incluiu 202 pacientes com EIA e 174 controles saudáveis. Os dois *loci* polimórficos analisados foram PvuII e XbaI e o polimorfismo do sítio XbaI do gene do receptor de estrogênio foi associado ao risco de desenvolver a escoliose.

AULISA *et al.* (2007) identificaram associação entre os polimorfismos de genes pró-inflamatórios (MMP-3 e IL-6) e a EIA. Concluíram que o polimorfismo do gene MMP-3 e do gene IL-6 estão associados a um maior risco de escoliose com odds ratio, respectivamente, de 3,34 e 10,54.

CHEN *et al.* (2009), em análise de polimorfismos do *locus* genético promotor da matrilina 1 (MATN1), um importante componente da matriz extracelular, identificaram associação com a etiologia e progressão da escoliose idiopática do adolescente. A presença do alelo G neste gene foi identificada com um fator que predispõe à doença. Além disso, esse polimorfismo foi associado à severidade da curva.

OGILVIE (2010), após revisão das publicações sobre a associação genética e EIA, propôs um *score* baseado em marcadores genéticos com o intuito de mapear geneticamente este doente. Esses marcadores fornecem uma base para o cálculo do risco de progressão permitindo, assim, que o tratamento seja individualizado de acordo com o *score* encontrado.

SUH, EUN, LEE (2010) estudaram 198 coreanas do gênero feminino com EIA e compararam os genótipos com 120 controles saudáveis de idade semelhante e gênero feminino. Três polimorfismos do receptor da vitamina D (*BsmI*, *FokI*, *Cdx2*) foram avaliados e aplicado o teste qui-quadrado para análise estatística. Apenas o gene *BsmI*, apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0054$ ) entre os grupos avaliados. No entanto, os autores chamaram a atenção para o fato de que esse resultado deve ser comprovado em amostras maiores.



TAKAHASHI *et al.* (2011), em um estudo genômico de associação e de replicação, analisaram 1.376 mulheres japonesas com escoliose idiopática do adolescente e 11.297 controles do sexo feminino. Foi identificado um *locus* no cromossomo 10q24.31 associado com susceptibilidade à escoliose idiopática do adolescente. O mais significativo SNP (polimorfismo de nucleotídeo único - rs11190870) relacionado ao LBX1, gene expressado no sistema nervoso central e tecido musculoesquelético.

GORMAN, JULIEN, MOREAU (2012), com o objetivo de revisarem de maneira abrangente os estudos genéticos relacionados à EI selecionados nas bases de dados da PubMed e do Genoma Humano. Foram identificados 50 estudos e analisados quanto aos resultados, delineamento experimental e abordagem estatística correspondentes aos nossos critérios. Os autores encontraram genes envolvidos relacionados com estrutura do tecido conjuntivo, formação e metabolismo ósseos, vias de sinalização da melatonina, puberdade e crescimento, e com relação às vias neuronais. Devido à grande variabilidade nos resultados, que sugeriam uma heterogeneidade fenotípica e genética, concluíram que a pesquisa genética sobre a doença apresenta muitas limitações que impossibilitam o esclarecimento da teoria hereditária da EIA.

JIANG *et al.* (2013) investigaram a correlação do polimorfismo do gene LBX1 com a susceptibilidade à EIA, em uma população chinesa de 949 pacientes e 976 controles saudáveis da mesma idade. Um estudo de caso-controle foi realizado e, além disso, os autores elaboraram uma meta-análise dos resultados deste e de outros estudos anteriormente relatados. Houve associação significativa de rs11190870 com EIA e a meta-análise

confirmou a associação positiva deste SNP com EIA na população do Leste Asiático. Concluíram que o SNP rs11190870 (LBX1) está associado tanto com a susceptibilidade quanto com a progressão da curva escoliótica.

MIYAKE *et al.* (2013), por meio de um estudo de associação de duas fases, utilizando um total de 12 mil indivíduos japoneses, identificaram uma variante comum, rs12946942, localizada no cromossomo 17q24.3, associada significativamente à escoliose grave.

### **3.2 Escoliose Idiopática do adolescente e debilidade da musculatura paravertebral**

JOHNSON *et al.* (1973) analisaram amostras do músculo esquelético de 50 locais, em cada um dos seis indivíduos masculinos (17 a 30 anos) sem deformidades submetidos à autópsia. Estratificaram os grupamentos musculares de acordo com a porcentagem dos tipos de fibras presentes na amostra. Os eretores da espinha, em suas camadas profundas e superficiais, apresentaram uma predominância das fibras do tipo 1 com 58,4% e 54,9% respectivamente. Este grupamento muscular, assim como o sóleo e o tibial anterior, tem importante função da manutenção postural. Similarmente, encontraram uma alta taxa de porcentagem do tipo de fibra 1 no músculo adutor do polegar.

FIDLER, JOWETT (1976) estudaram um cadáver e dois pacientes com EI, submetidos ao tratamento cirúrgico, e identificaram um encurtamento do músculo multifídio e uma maior proporção de fibras

musculares lentas no lado convexo do ápice da deformidade. Concluíram que estas alterações estariam relacionadas à etiopatogenia da doença.

ZETTERBERG, ANIANSSON, GRIMBY (1983) também realizaram um estudo histoquímico dos músculos paravertebrais em EI. Nesse estudo demonstraram uma menor proporção de fibras Tipo IIB / IIA no lado convexo associado a um aumento da proporção de fibras do tipo I. A contagem capilar também foi maior no lado convexo, especialmente ao redor das fibras do tipo I. Sugeriram que estas alterações estariam relacionadas a um processo adaptativo secundário.

FORD *et al.* (1984) analisaram amostras de biópsias musculares de sete pacientes com escoliose idiopática. As amostras foram colhidas em ambos os lados do ápice da curva principal e dois níveis vertebrais acima e abaixo. Houve uma percentagem significativamente maior de fibras do tipo I encontrados no músculo multifídio no lado convexo.

THORSTENSSON, CARLSON (1987) analisaram a distribuição do tipo de fibra muscular nos multifídios e longuíssimo da região lombar. Foram biopsiados para a coleta das amostras 16 indivíduos saudáveis entre 20 e 30 anos. Nos músculos multifídios observaram uma predominância das fibras do tipo 1 de 62% em média e, nos longuíssimos, de 57%. Não houve diferença estatística significante entre os dois grupos musculares.

BYLUND *et al.* (1987) biopsiaram 23 pacientes, 16 com EIA e 7 com escoliose secundária. Os músculos coletados para análise foram os multifídios e parte do semi espinhal da região torácica, nos lados côncavo e convexo da curva. Na análise histológica da musculatura do grupo com EIA houve uma maior predominância das fibras do tipo 1 no lado convexo

em relação às amostras colhidas na concavidade. Nos pacientes com escoliose congênita ou de início precoce, também houve maior predominância das fibras do tipo 1 no lado convexo da curva. No entanto, houve uma maior porcentagem de fibras do tipo 1, em ambos os lados, no grupo em causas secundárias a escoliose. Os autores concluíram que o aumento da predominância das fibras do tipo 1 na convexidade da curva, principalmente no grupo com escoliose secundária, é uma alteração considerada como consequência da presença da escoliose. A substituição das fibras do tipo 1 pelo tipo 2 na concavidade da curva configuraram as alterações primárias da musculatura da EIA.

CHAGAS, PUERTAS, LAREDO FILHO (1993) estudaram as alterações dos músculos rotadores do dorso de 32 pacientes com EIA submetidos a tratamento cirúrgico da deformidade, utilizando a biópsia muscular durante o procedimento de correção da curva. Demonstraram que em todos os pacientes os músculos estavam alterados, independentemente do lado. As lesões mais frequentemente observadas foram *typegrouping* e predominância de fibras do tipo 1. Concluíram que havia um padrão de alteração neurogênica na musculatura analisada.

MEIER *et al.* (1997), em estudo semelhante de biópsias da musculatura paravertebral em pacientes com EIA, analisaram as reações musculares em resposta à órtese. Em pacientes que não utilizaram coletes, a mudança na distribuição das fibras (de "lento" para "rápido") foi observada exclusivamente no lado côncavo, acompanhada por um aumento da porcentagem do tipo de fibra intermediário 2C. Em pacientes que usavam colete, a quantidade relativa de fibras Tipo 2C foi aumentada, sem preferência por um local específico. Os autores sugeriram que o tratamento

com colete provoca a transformação da fibra muscular em diferentes níveis ao longo da escoliose. E presumiram que as alterações musculares na região apical são secundárias à deformidade.

MANNION *et al.* (1998) colheram amostra bilateral dos músculos paravertebrais durante a cirurgia de 14 pacientes femininas portadoras de EIA. Compararam com amostras de biópsia percutânea musculares obtidas a partir de nove voluntárias femininas. Os parâmetros avaliados foram: identificação dos tipos de fibras musculares e o tamanho dessa fibra. Encontraram proporção significativamente menor das fibras do tipo 1 no músculo do lado côncavo da curva escoliótica. A proporção de fibras do tipo 2B foi mais elevada em ambos os lados da curva, em comparação com os controles. O tamanho da fibra não apresentou diferença estatística significativa. Segundo os autores, os resultados desse estudo demonstraram que o lado côncavo do ápice da curva escoliótica apresentou as maiores alterações na distribuição do tipo de fibra. Os músculos do lado convexo tiveram menor diferença quando comparado ao grupo controle, o que pode ser resultado de inatividade muscular.

CHEUNG *et al.* (2005), com o objetivo de estudar a atividade eletromiográfica (EMG) dos músculos paravertebrais e determinar sua relação com a progressão da curva escoliótica, avaliaram a atividade EMG em ambos os lados da coluna vertebral. Concluíram que a diferença da eletroneuromiografia dos músculos paravertebrais no lado côncavo e convexo pode ser de grande valor para a previsão de progressão da escoliose idiopática.

KOUWENHOVEN *et al.* (2006) realizaram um estudo retrospectivo de análise da forma e da direção da curva na escoliose secundária a uma

doença neuromuscular, objetivando determinar se existiam semelhanças entre essas curvas com a escoliose idiopática. Os resultados demonstraram que os padrões de curvas e níveis apicais são semelhantes aos vistos nos tipos mais prevalentes de EIA.

### 3.3 Polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina I

RIGAT *et al.* (1990) realizaram um estudo pioneiro, avaliando um dos polimorfismos, o de inserção/deleção, da enzima conversora de angiotensina I (ECA), em 80 indivíduos saudáveis, cujos níveis séricos da enzima também foram mensurados. Observaram uma diferença marcante nos níveis séricos da ECA em cada uma das três classes genótípicas. O polimorfismo de inserção/deleção deste gene foi o responsável por aproximadamente metade da variação fenotípica total de ECA no soro, demonstrando que o *locus* genético é determinante na concentração da ECA plasmática.

MONTGOMERY *et al.* (1999) investigaram os efeitos metabólicos do sistema renina-angiotensina, avaliando a associação do polimorfismo do gene da ECA e mudanças na composição corporal após 10 semanas de uma série de exercícios. Constataram que os participantes com o genótipo II tiveram maior resposta anabólica. Os autores consideraram que, no genótipo II, como um marcador da baixa atividade da ECA tecidual, deve haver conservação de um equilíbrio positivo de energia, sugerindo um aumento da eficiência metabólica. Esta descoberta estaria relacionada aos benefícios funcionais da terapia com inibidores da ECA.

RENELAND *et al.* (1999) investigaram a relação entre atividade da ECA sérica e tecidual no músculo esquelético com a pressão arterial após longo prazo de uso de anti-hipertensivos. Atividade de ECA foi determinada em amostras de biópsia do músculo esquelético. O estudo observou uma correlação inversamente proporcional entre a ECA muscular e a pressão arterial. Durante o tratamento com atenolol, a atividade ECA muscular tende a aumentar e esse aumento está inversamente correlacionado com as mudanças pressóricas. A relação inversa entre a pressão arterial e os níveis de ECA muscular neste estudo indicam que os níveis da ECA do tecido muscular também são influenciados por fatores hemodinâmicos.

FOLLAND *et al.* (2000), em uma pesquisa envolvendo 33 voluntários saudáveis, examinaram o efeito do genótipo da ECA sobre mudanças na força dos músculos do quadríceps após nove semanas de treinamento de força. Os resultados demonstraram maior ganho de força nos indivíduos com o alelo D e sugerem um novo mecanismo, que envolve o sistema renina-angiotensina, na resposta do músculo esquelético a uma sobrecarga funcional. Os autores ressaltaram que os resultados podem ter implicações nas doenças musculares, repouso prolongado, envelhecimento e reabilitação, quando a fraqueza muscular pode limitar a função.

ZHANG *et al.* (2003) avaliaram a associação do polimorfismo da ECA com o tipo de fibra muscular em biópsias do vasto lateral do quadríceps de 41 indivíduos saudáveis. Os autores encontraram associação entre o genótipo II e maior porcentagem das fibras musculares do tipo 1 de contração lenta (aeróbicas).

ONDER, VEDOVA, PAHOR (2006) descreveram uma revisão sobre a ação direta dos inibidores da ECA sobre o músculo esquelético. Destacaram que esta enzima pode estar envolvida no desempenho físico e na função do músculo esquelético. E concluíram que, se os resultados de estudos observacionais fossem confirmados em ensaios clínicos randomizados, os inibidores da ECA poderiam representar uma intervenção eficaz para a recuperação da massa muscular.

CHARBONNEAU *et al.* (2008) investigaram a associação do genótipo da ECA com fenótipos musculares antes e depois de treinamento de força em homens e mulheres. Participaram do estudo 86 homens e 139 mulheres, com média de idade de 62 anos. Nesse estudo, o genótipo da ECA foi associado a diferenças no volume muscular, mas não foi associado à resposta muscular hipertrófica ao treinamento de força.

BRAY *et al.* (2009) revisaram o mapa genético humano relacionado ao desempenho físico e aos fenótipos de aptidão a atividade física. Todos os genes e marcadores com evidência de associação a um fenótipo de performance foram posicionados neste mapa. Puderam ser localizados 214 genes autossômicos e outros sete genes no cromossomo X. Ressaltaram que a maioria dos estudos revisados não forneciam a evidência necessária para determinar se o gene estudado realmente influenciava na aptidão ao esporte.

ALMEIDA *et al.* (2010) avaliaram o polimorfismo I/D da ECA em 119 indivíduos, com o objetivo de estabelecer uma caracterização bioquímica e funcional deste polimorfismo e correlacionar com a atividade da ECA. Assim, a atividade plasmática da ECA foi avaliada a partir dos domínios catalíticos C e N. Também observaram a força de preensão



manual, pressão arterial, frequência cardíaca e IMC da amostra. A distribuição dos genótipos foi II = 22,7%, ID = 53,8% e DD = 23,5%. Os autores concluíram que o polimorfismo I/D da ECA afetou de forma diferente os C- e N-domínios. Além disso, a atividade total da ECA plasmática de ambos os domínios em indivíduos II foi significativamente menor em comparação com ID e DD. A diferença entre ID e DD foi observada apenas com o substrato específico para o N-domínio. No entanto, a pressão arterial, frequência cardíaca, força de prensão manual e IMC foram semelhantes entre os genótipos.

PUTHUCHEARY *et al.* (2011) revisaram os estudos publicados sobre a influência genética no esporte e na performance física. Observaram que os diversos fenótipos de diferentes fatores (força muscular, estrutura óssea e tendínea, capacidade cardiorrespiratória) alteram o desempenho esportivo. Citaram, na revisão, os estudos de polimorfismos associados à função endócrina e necessários para o crescimento e funcionamento do músculo esquelético normal. Destacaram o polimorfismo no gene receptor da vitamina D e relacionados ao tipo de fibra muscular, por exemplo, da alfa-actinina3. Os autores reconheceram que o polimorfismo da ECA é o mais estudado, por sua influência na aptidão física para determinado tipo de esporte.

VAUGHAN *et al.* (2013), em estudo retrospectivo com 36 homens caucasianos, avaliaram a modificação na resposta adaptativa da energia do músculo extensor do joelho e condicionamento aeróbio ao treinamento de resistência. Sugeriram que a expressão genética da ECA, agindo como regulador do tônus vascular, contribuiu na variação do metabolismo local

mitocondrial, alterando a capacidade de treinamento e performance de resistência entre os sujeitos estudados.

WAJCHENBERG *et al.* (2013) avaliaram a distribuição do polimorfismo da ECA e da alfa actinina (ACTN-3) em uma família com vários membros com escoliose idiopática do adolescente. A amostra consistia em 25 indivíduos da mesma família e, em relação ao polimorfismo da ECA, 76% eram do genótipo DD e 24% heterozigotos ID. A prevalência do alelo D foi de 88% e do alelo I foi de 12%. Em relação ao polimorfismo ACTN3 24% eram homozigotos RR, 44% heterozigotos e 32% homozigotos nulos (XX), proporção semelhante a encontrada em estudos com populações saudáveis. Concluíram que houve uma maior prevalência do alelo D em relação ao alelo I.

## **MÉTODOS**

## 4. Métodos

### 4.1 Desenho da pesquisa

Estudo caso-controle, primário, experimental, observacional e transversal, realizado em centro único e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 1256/10) da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP (Anexo I). A pesquisa foi realizada entre os anos de 2010 a 2014 e todos os participantes ou seus responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II). Realizaram-se os exames de imagem no Departamento de Diagnóstico por Imagens da Escola Paulista de Medicina-EPM da UNIFESP e as análises genéticas no Laboratório de Pesquisa Genética do Exercício e Metabolismo da UNIFESP.

### 4.2 Piloto

Quatro genes relacionados ao desempenho físico chamaram a atenção pela influência direta no metabolismo da musculatura esquelética: o gene da alfa-actinina 3 (ACTN3), do receptor B2 de cinina, do angiotensinogênio, e o gene da ECA. Assim, desenvolveu-se um projeto-piloto, no qual foram avaliados os polimorfismos dos genes descritos em uma família que apresentava alta prevalência de escoliose. Nesse piloto somente o polimorfismo da ECA pareceu relacionar-se com o fenótipo da EIA (Anexo III e IV). Na família estudada,

encontraram-se 19 indivíduos DD (76%) e seis heterozigotos ID (24%). A prevalência do alelo D foi de 88% e do alelo I, de 12%.

No projeto-piloto também foi possível calcular o tamanho da amostra. O cálculo amostral foi realizado sabendo-se que a frequência de genótipo da ECA na população brasileira é de aproximadamente 25% DD, 25% II e 50% ID (Almeida *et al.*, 2010). Para comprovação da hipótese deste estudo, ou seja, o aumento da frequência do genótipo DD na população com EIA, e considerando que este aumento seja entre 10% e até o dobro em relação ao grupo-controle, com poder de 80% e confiança de 95%, supondo teste monocaudal, seriam necessários entre 44 e 257 indivíduos em cada grupo do estudo (Figura 1).

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times (p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2))}{(p_1 - p_2)^2}$$

Figura 1. Fórmula estatística utilizada para cálculo amostral

Onde: \*  $Z_{\alpha/2}$  é o valor da distribuição normal padrão com nível de significância  $\alpha/2$  e a confiança é  $1 - \alpha$ ; \*  $Z_{\beta}$  é o valor da distribuição normal padrão com nível de significância  $\beta$  e o poder é  $1 - \beta$ ; \*  $p_1$  é a proporção esperada de resposta no grupo 1; \*  $p_2$  é a proporção esperada de resposta no grupo 2.

### 4.3 Amostra

Composta por dois grupos de avaliação.

Grupo 1 – Pacientes com escoliose idiopática do adolescente (n=97)

Pacientes do Ambulatório do Grupo de Coluna da UNIFESP com diagnóstico clínico e radiográfico de EIA (Tabela 1).

Para a formação deste grupo utilizamos os seguintes critérios de inclusão, exclusão e não exclusão:

***Critérios de inclusão:***

- Pacientes com escoliose idiopática com início no período puberal com curva maior que 10 graus mensurada pela técnica de Cobb (Cobb, 1948) (Figura 2);
- Idade entre 10 e 35 anos;
- Gênero feminino.

***Critérios de exclusão:***

Pacientes com escoliose idiopática do tipo infantil (início da curva até os três anos) ou juvenil (início da curva entre quatro até o período puberal).

***Critérios de não inclusão:***

- Não foram incluídos no estudo os pacientes com escoliose secundária a doenças causadoras de escoliose, por exemplo, doenças neuromusculares.

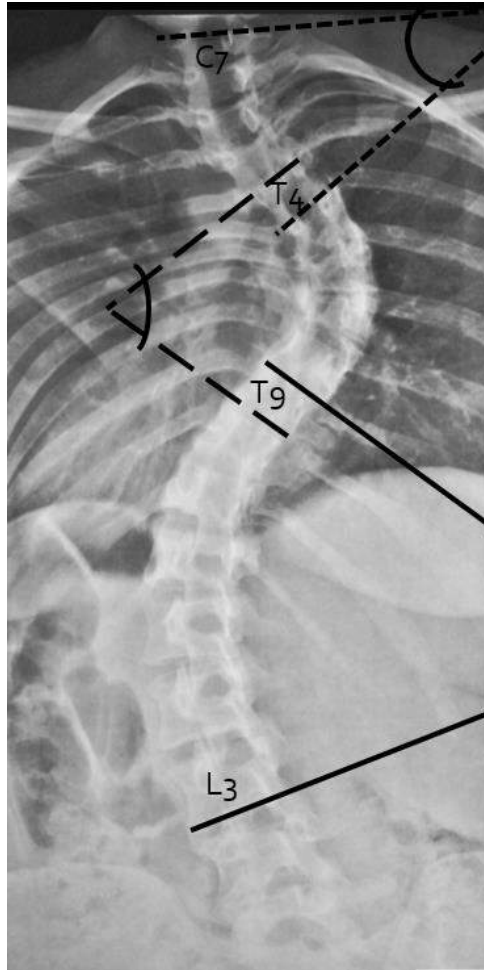


Figura 2. Representação radiográfica da mensuração das curvas pela técnica de Cobb. \*C7 – 7<sup>a</sup> vértebra cervical; T4 – 4<sup>a</sup> vértebra torácica; T9 – 9<sup>a</sup> vértebra torácica; L3 – 3<sup>a</sup> vértebra lombar.

Tabela 1 – Grupo de pacientes com escoliose idiopática do adolescente.

Número	Paciente	Gênero	Idade	Raça	Familiar Afetado	Menarca	Curva Principal	Ângulo de Cobb	King	Tratamento
1	VSSS	Feminino	29	Branca	Não	11a 3m	Torácica D	70°	II	Cirúrgico
2	TSC	Feminino	21	Branca	Não	11a 5m	Lombar E	40°	I	Conservador
3	APCS	Feminino	17	Parda	Sim (prima)	11a 7m	Torácica D	64°	II	Cirúrgico
4	CMA	Feminino	16	Branca	Sim (irmã)	10a 6m	Lombar E	36°	I	Conservador
5	AMA	Feminino	16	Branca	Sim (irmã)	10a7m	Toracolombar D	32°	III	Conservador
6	CSS	Feminino	17	Preta	Não	13a 2m	Torácica D	70°	II	Cirúrgico
7	NC	Feminino	15	Parda	Não	14a 1m	Toracolombar D	51°	III	Conservador
8	MTL	Feminino	16	Branca	Não	10a 6m	Torácica D	60°	II	Cirúrgico
9	GAA	Feminino	33	Branca	Não	11a 4m	Torácica D	54°	III	Cirúrgico
10	JFP	Feminino	15	Parda	Não	12a 7m	Torácica D	67°	II	Cirúrgico
11	FPG	Feminino	22	Branca	Não	14a 2m	Torácica D	62°	II	Cirúrgico
12	MLS	Feminino	16	Branca	Sim (irmã)	11a 3m	Lombar E	32°	I	Conservador
13	MLS(1)	Feminino	22	Branca	Sim (irmã)	11a 2m	Torácica D	58°	III	Cirúrgico
14	MM	Feminino	17	Branca	Não	11a 2m	Torácica D	18°	III	Conservador
15	JSS	Feminino	25	Branca	Não	10a 7m	Lombar E	80°	I	Cirúrgico
16	JSD	Feminino	15	Branca	Não	14a 3m	Torácica D	128°	III	Cirúrgico
17	LCH	Feminino	18	Branca	Não	13a 4m	Lombar E	77°	I	Conservador
18	PG	Feminino	21	Branca	Não	14a 1m	Torácica D	76°	II	Cirúrgico
19	MFBS	Feminino	18	Branca	Não	14a 2m	Torácica D	46°	II	Conservador
20	LANF	Feminino	12	Branca	Não	11a 3m	Toracolombar E	20°	I	Conservador
21	DOF	Feminino	18	Branca	Não	11a 5m	Torácica D	66°	II	Cirúrgico
22	MCS	Feminino	14	Branca	Não	12a 2m	Torácica D	33°	III	Conservador
23	ESS	Feminino	13	Branca	Não	11a 7m	Torácica D	24°	III	Conservador
24	MSS	Feminino	17	Parda	Não	11a 10m	Torácica D	20°	III	Conservador
25	ES	Feminino	18	Branca	Não	10a 1m	Torácica D	54°	III	Cirúrgico
26	JMM	Feminino	35	Branca	Sim (sobrinha)	12a 5m	Torácica D	45°	III	Conservador



27	DPO	Feminino	23	Branca	Sim (tia)	11a 2m	Lombar E	35°	I	Conservador
28	APOL	Feminino	12	Branca	Não	Não	Torácica D	52°	II	Cirúrgico
29	DMP	Feminino	15	Branca	Não	12a 9m	Torácica D	75°	II	Cirúrgico
30	ACGR	Feminino	15	Branca	Sim (prima)	10a 9m	Lombar E	58°	I	Cirúrgico
31	MMSC	Feminino	21	Branca	Sim (sobrinha)	11a 1m	Lombar E	48°	I	Cirúrgico
32	ACFL	Feminino	12	Branca	Não	12a 3m	Lombar E	64°	I	Cirúrgico
33	KEAM	Feminino	13	Branca	Não	11a 6m	Torácica D	60°	II	Cirúrgico
34	DGS	Feminino	13	Branca	Sim (avô e avó)	14a 1m	Lombar E	83°	I	Cirúrgico
35	MFCO	Feminino	31	Branca	Não	13a 5m	Torácica D	58°	III	Cirúrgico
36	TC	Feminino	16	Branca	Não	12a 10m	Torácica D	56°	III	Cirúrgico
37	JAS	Feminino	15	Branca	Não	13a 1m	Torácica D	63°	II	Cirúrgico
38	NS	Feminino	16	Branca	Não	11a 10m	Torácica D	52°	III	Cirúrgico
39	SM	Feminino	13	Branca	Não	12a 6m	Lombar E	58°	I	Cirúrgico
40	AS	Feminino	18	Branca	Não	10a 9m	Torácica D	72°	II	Cirúrgico
41	ZBB	Feminino	28	Parda	Não	13a 7m	Torácica D	66°	II	Cirúrgico
42	SBF	Feminino	14	Branca	Não	11a 2m	Torácica D	48°	III	Cirúrgico
43	MPSS	Feminino	22	Branca	Não	11a 5m	Torácica D	64°	II	Cirúrgico
44	FGS	Feminino	17	Branca	Não	12a 9m	Torácica D	54°	III	Cirúrgico
45	MC	Feminino	18	Parda	Não	13a 2m	Torácica D	38°	III	Conservador
46	VBCG	Feminino	32	Branca	Não	12a 7m	Torácica D	68°	II	Cirúrgico
47	VS	Feminino	28	Branca	Sim (irmã)	10a 8m	Torácica D	44°	III	Conservador
48	TVL	Feminino	21	Branca	Não	11a 5m	Torácica D	65°	II	Cirúrgico
49	SAMM	Feminino	11	Branca	Não	11a 1m	Torácica D	115°	II	Cirúrgico
50	TTV	Feminino	12	Parda	Não	11a 4m	Torácica D	53°	II	Cirúrgico
51	FGPC	Feminino	28	Branca	(irmã, avó materna e prima)	12a 2m	Torácica D	38°	III	Conservador
52	BRNN	Feminino	13	Amarela	Não	11a 8m	Lombar E	25°	I	Conservador
53	LVS	Feminino	19	Branca	Não	16a 1m	Lombar E	40°	I	Conservador
54	TFMP	Feminino	19	Branca	Não	13a 3m	Torácica D	35°	III	Conservador
55	MSFB	Feminino	13	Branca	Não	12a 7m	Torácica D	42°	III	Conservador

56	GDFR	Feminino	15	Branca	Não	13a 6m	Torácica D	38°	III	Conservador
57	DL	Feminino	18	Branca	Não	12a 9m	Torácica D	55°	II	Cirúrgico
58	DSS	Feminino	14	Branca	Não	11a 8m	Toracolombar D	40°	III	Conservador
59	LSMI	Feminino	15	Branca	Não	10a 9m	Torácica D	25°	III	Conservador
60	NTS	Feminino	14	Branca	Não	11a 7m	Torácica D	38°	III	Conservador
61	JSR	Feminino	16	Branca	Não	12a 3m	Torácica D	74°	II	Cirúrgico
62	SN	Feminino	18	Branca	Não	10a 8m	Lombar E	45°	I	Conservador
63	SS	Feminino	17	Branca	Não	12a 7m	Torácica D	22°	III	Conservador
64	GA	Feminino	15	Branca	Não	11a 2m	Torácica D	32°	III	Conservador
65	JLM	Feminino	16	Branca	Não	10a 9m	Torácica D	62°	II	Conservador
66	TMI	Feminino	13	Branca	Não	11a 7m	Torácica D	78°	II	Cirúrgico
67	FGS	Feminino	12	Branca	Não	10a 7m	Torácica D	42°	III	Cirúrgico
68	MPSC	Feminino	12	Branca	Não	11a 6m	Torácica D	38°	III	Conservador
69	ASC	Feminino	15	Branca	Não	10a 11m	Torácica D	34°	III	Conservador
70	RM	Feminino	17	Branca	Não	11a 4m	Torácica D	34°	III	Conservador
71	ASSA	Feminino	31	Branca	Não	11a 8m	Torácica D	25°	III	Conservador
72	FFS	Feminino	19	Branca	Não	12a 3m	Lombar E	30°	I	Conservador
73	SPS	Feminino	12	Branca	Não	Não	Torácica D	55°	II	Cirúrgico
74	LO	Feminino	12	Branca	Não	Não	Torácica D	38°	III	Conservador
75	LBV	Feminino	13	Branca	Não	10a 3m	Torácica D	57°	II	Conservador
76	SCBL	Feminino	15	Branca	Não	12a 1m	Torácica D	40°	II	Conservador
77	RCA	Feminino	16	Branca	Não	10a 9m	Torácica D	35°	III	Conservador
78	ARP	Feminino	19	Branca	Não	14a 1m	Torácica D	53°	III	Cirúrgico
79	GLO	Feminino	13	Branca	Sim (prima)	11a 4m	Torácica D	42°	III	Conservador
80	SOS	Feminino	10	Branca	Não	Não	Torácica D	60°	III	Cirúrgico
81	STM	Feminino	26	Branca	Sim (prima)	12a 7m	Torácica D	76°	II	Cirúrgico
82	SMS	Feminino	15	Preta	Sim (mãe)	12a 1m	Torácica D	68°	II	Cirúrgico
83	PAG	Feminino	33	Branca	Não	10a 7m	Torácica D	62°	II	Cirúrgico
84	LS	Feminino	32	Parda	Não	12a 6m	Torácica D	56°	III	Cirúrgico

85	CCG	Feminino	30	Branca	Sim (prima)	11a 3m	Torácica D	37°	III	Conservador
86	ACFS	Feminino	20	Branca	Não	12a 4m	Torácica D	77°	II	Cirúrgico
87	ISB	Feminino	24	Branca	Não	13a 3m	Torácica D	51°	II	Cirúrgico
88	KSA	Feminino	21	Branca	Não	12a 2m	Torácica D	60°	III	Cirúrgico
89	APGM	Feminino	31	Branca	Não	11a 11m	Torácica D	65°	II	Cirúrgico
90	IBF	Feminino	31	Branca	Sim (prima e irmã)	10a 10m	Torácica D	71°	II	Cirúrgico
91	TM	Feminino	14	Branca	Não	10a 7m	Torácica D	68°	II	Cirúrgico
92	SS	Feminino	17	Branca	Não	12a 8m	Torácica D	22°	III	Conservador
93	PO	Feminino	15	Branca	Não	13a 3m	Torácica D	33°	III	Conservador
94	AAS	Feminino	17	Branca	Não	10a 11m	Torácica D	57°	II	Cirúrgico
95	EO	Feminino	18	Branca	Não	11a 1m	Torácica D	62°	II	Cirúrgico
96	TS	Feminino	25	Branca	Não	12a 3m	Torácica D	42°	III	Conservador
97	JS	Feminino	14	Branca	Não	11a 5m	Torácica D	68°	II	Cirúrgico

\*D – Direito; \*E – Esquerdo.

## Grupo 2 – Grupo-controle (n = 137)

Composto por doadores saudáveis do banco de sangue do Hemocentro do Hospital São Paulo – Hospital Universitário da UNIFESP e também pelo banco de dados do Laboratório de Pesquisa Genética do Exercício e Metabolismo da UNIFESP. Foram selecionados indivíduos que preencheram os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

### *Critérios de inclusão:*

- Voluntários saudáveis do grupo-controle, avaliados clinicamente no Ambulatório de Patologias de Coluna Vertebral, com o objetivo de excluir o diagnóstico de escoliose;
- Idade entre 10 a 35 anos;
- Gênero feminino.

### *Critérios de exclusão:*

- Indivíduos que apresentaram, no exame clínico, presença de escoliose ou qualquer outra deformidade da coluna.

### *Critérios de não inclusão:*

- Indivíduos com diagnóstico de doença cardiovascular, metabólica e/ou sistêmica.

#### 4.4 Coleta do sangue e extração de DNA

A amostra do sangue foi coletada por um enfermeiro habilitado, no Hospital São Paulo – Hospital Universitário da UNIFESP. Transferida ao Laboratório de Pesquisa Genética do Exercício e Metabolismo da UNIFESP em tubo de hemograma com EDTA, para a extração do DNA e genotipagem.

20µl de sangue periférico foi utilizado para extração de DNA total dos leucócitos, utilizando-se o *ChargeSwitch® gDNABlood Kits (Invitrogen™)* empregado para purificação de DNA genômico de pequenos volumes de sangue humano. Foram seguidos os passos indicados pelo fabricante para a extração do DNA genômico.

#### 4.5 Genotipagem do gene da ECA

Todos os indivíduos foram genotipados para identificar a presença do alelo deleção (D) ou inserção (I) em seu genótipo. A genotipagem dos alelos do polimorfismo de I/D do gene da ECA foi conduzida utilizando-se um sistema de dois iniciadores (*primers*) específicos que localizam a sequência onde ocorre o polimorfismo no gene, com a finalidade de amplificá-los e classificar os indivíduos em homozigotos II ou DD ou em heterozigoto ID. Um terceiro iniciador interno (*primer*) foi utilizado para confirmação dos indivíduos que apresentaram genótipos DD. A sequência dos iniciadores (*primers*), reagentes e suas respectivas quantidades utilizadas para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) estão descritas a seguir. O local do gene da ECA identificado pelos *primers* está demonstrado na Figura 3.

*Primer ECA Sense* 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT- 3'  
*Primer ECA* *Antisense* 5'-  
 GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT- 3'  
*Primer interno ECA* 5'-GTCTCGATCTCCTGACCTCGTG-3'

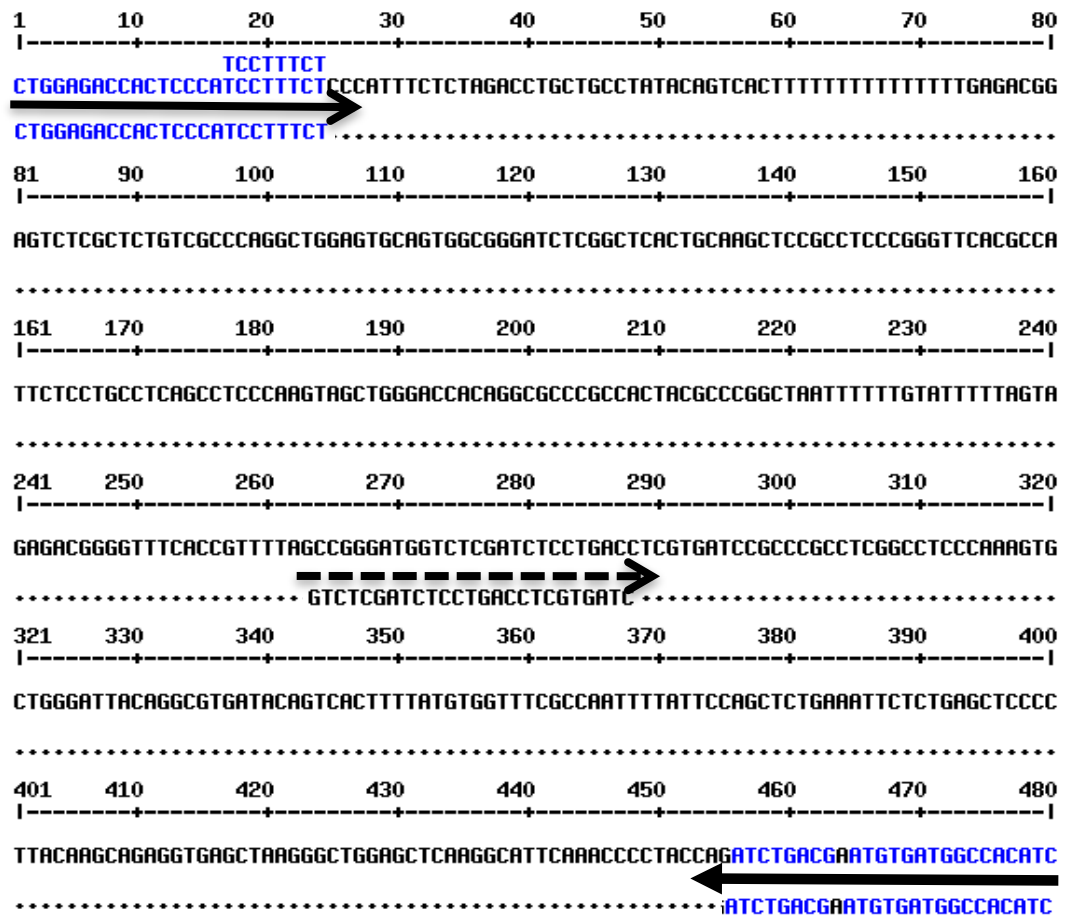


Figura 3 – Sequência amplificada do gene da ECA. Demonstração da sequência do intron 16 na qual os iniciadores (*primers*) *sense* e *antisense* reconhecem sua sequência complementar, demonstradas pelas setas cheias, a seta pontilhada é a sequência do iniciador interno, local onde ocorre deleção.

#### 4.5.1 Reagentes utilizados na primeira PCR para identificação dos genótipos

10  $\mu\text{L}$  do DNA extraído.

5  $\mu\text{L}$  de Tampão de PCR (10x).

2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM).

1,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM).

0,5  $\mu\text{L}$  de *primer ECASense* (50  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ ).

0,5  $\mu\text{L}$  de *primer ECAAntisense* (50  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ ).

0,5  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ).

5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q autoclavada.

25  $\mu\text{L}$  total.

#### 4.5.2 Reagentes utilizados na segunda PCR para confirmação do genótipo DD, com a utilização do primer interno

10  $\mu\text{L}$  do DNA extraído.

5  $\mu\text{L}$  de Tampão de PCR (10x).

2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM).

1,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM).

0,5  $\mu\text{L}$  de *primer ECASenseinterno* (50  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ ).

0,5  $\mu\text{L}$  de *primer ECAAntisense* (50  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ ).

0,5  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ).

5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q autoclavada.

25  $\mu\text{L}$  total.

### 4.5.3 Condições da PCR

As duas PCR foram feitas utilizando as condições abaixo:

- 1 - 95°C por 5 min.
- 2 - 95°C por 45 s.
- 3 - 60°C por 45 s.
- 4 - 72°C por 45 s.
- 5 – Voltar ao passo 2 – 35 vezes.
- 6 - 72°C por 7 min.
- 7 - 4°C tempo indeterminado.

### 4.6 Análise da genotipagem da ECA

Os resultados da PCR, utilizados para identificação do genótipo da ECA, foram visibilizados em gel de eletroforese (gel de agarose a 2%) com *SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™)*. Para indivíduos homozigotos para inserção (I) foram observadas bandas de 490 pares de base nitrogenadas(pb) e, para indivíduos homozigotos para deleção (D), bandas de 190pb. Indivíduos que apresentaram duas bandas, inserção (I) e deleção (D) foram considerados heterozigotos para o polimorfismo do gene da ECA. A Figura 4 é um exemplo de como se apresentam as bandas de DNA genômico amplificado, após a PCR. Todos os dados foram analisados na forma digital.





Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 2%; II - Homozigoto para inserção, ID - Heterozigoto, DD - Homozigoto para deleção; M - Marcador de massa molecular 100pb.

Devido à preferencial amplificação do alelo D, por ser mais curto, todas as amostras da primeira PCR que se apresentaram como genótipo DD, foram submetidas a uma nova e independente amplificação (Shanmugam, Sell e Saha, 1993). Para tal, foi utilizado um iniciador interno juntamente com óligo *antisense*, anteriormente utilizado na primeira reação. O iniciador interno só reconhece a sequência onde ocorre a inserção dos 287 pb, sendo que nenhuma banda é esperada em indivíduos homozigotos para deleção (DD). Os resultados da segunda PCR estão demonstrados na figura 5.

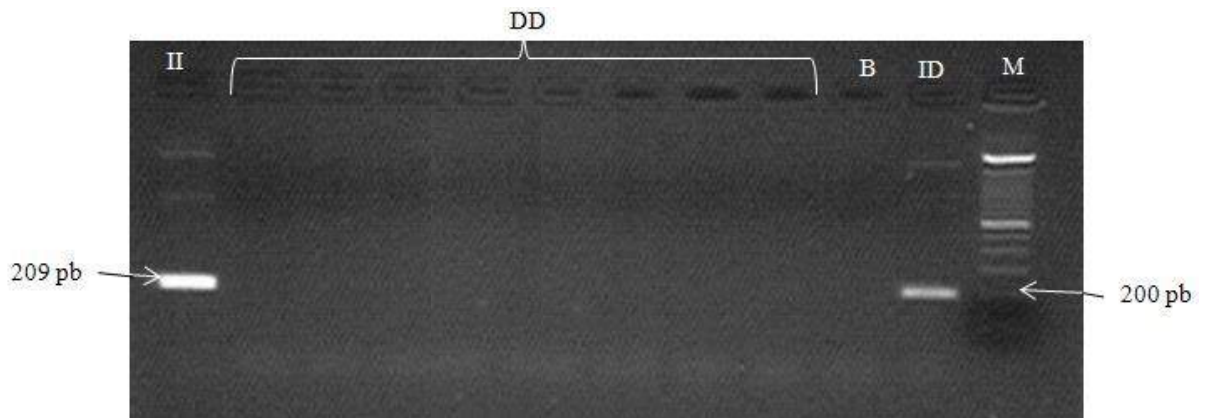


Figura 5 – Gel de agarose 2% com iniciador interno; II – Homozigoto para inserção; ID – Heterozigoto; DD – Homozigoto para deleção; M – Marcador de massa molecular; B – Branco.

#### 4.7 Metodologia Estatística

Todas as variáveis foram analisadas descritivamente. As características quantitativas das pacientes com EIA foram descritas com uso da média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e valores máximos. Para avaliação das variáveis qualitativas, calcularam-se frequências absolutas e relativas.

A genotipagem e os alelos do gene da ECA foram analisados de acordo com os grupos e estimados *OddsRatio* (OR), com intervalos com 95% de confiança, tendo como referência a genotipagem II ou alelo I com uso de regressões logísticas simples e verificada a associação entre os grupos com uso do teste *qui-quadrado*.

A genotipagem dos indivíduos para ECA também foi descrita segundo gravidade da doença e verificada a associação com uso do teste

*qui-quadrado*. Os testes foram realizados com nível de significância de 5% e os resultados, analisados estatisticamente por meio do programa *IBM SPSS®* 17.0 para *Windows®* em português.

|

## **RESULTADOS**

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterização da amostra

A média de idade do grupo de pacientes com escoliose foi de 18,5 anos e a idade da menarca, em média, foi de 12 anos. Do total das pacientes com escoliose, 88,7% eram da cor branca e 17,5% apresentavam familiar afetado. Em 55,7% deste grupo foi realizado o tratamento cirúrgico e 56,7% apresentavam a angulação de Cobb maior que 50 graus (Tabela 2). Na maior parte da amostra, observou-se curva torácica D (80,5%) do tipo III (44,3%) pela classificação de (KING *et al.*, 1983). No grupo controle a média de idade foi de 20,7 anos e variou entre 12 e 35 anos.

Tabela 2 – Resultados das variáveis avaliadas no Grupo 1.

<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Raça</b>		
Branca	86	88,7
Negra	2	2,1
Parda	8	8,2
Amarela	1	1
<b>Familiar Afetado</b>		
Não	80	82,5
Sim	17	17,5
<b>Valor Angular da Curva Principal</b>		
média (DP)		52,4 (19,1)
mediana (mín.; máx.)		54 (18; 128)
<b>Curva Principal</b>		
Torácica D	78	80,4
Lombar E	15	15,5
Toracolombar D	3	3,1
Toracolombar E	1	1,0
<b>King</b>		
I	16	16,5
II	38	39,2
III	43	44,3
<b>Tratamento</b>		
Conservador	43	44,3
Cirúrgico	54	55,7
<b>Idade (anos)</b>		
média (DP)		18,5 (6,1)
mediana (mín.; máx.)		17 (10; 35)
<b>Menarca*</b>		
média (DP)		12 (1,1)
mediana (mín.; máx.)		11,7 (10,1; 16,1)
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>100</b>

\*Algumas pacientes não tiveram menarca ainda

D – Direito; E – Esquerdo; DP – Desvio padrão;

Mín – Mínimo; Máx – Máximo.

## 5.2 Genotipagem da ECA

Na avaliação das frequências dos genótipos da ECA no grupo com EIA, observamos a seguinte distribuição: DD – 46,4%, ID – 45,4% e II – 8,2%. No grupo controle 40,1% eram homozigotos DD, 48% de heterozigotos e 16,1% com genótipo II. Esta diferença de distribuição entre

os dois grupos, com maior frequência do genótipo DD nos pacientes escolióticos, não obteve significância estatística com  $p = 0,197$  (Gráfico 1). Na análise isolada dos alelos, a porcentagem do alelo de deleção (D) em relação à soma dos alelos nos pacientes com EIA foi de 69,1%, enquanto que no grupo-controle o alelo D representou 62% da soma total dos alelos ( $p = 0,116$ ) (Gráfico 2).

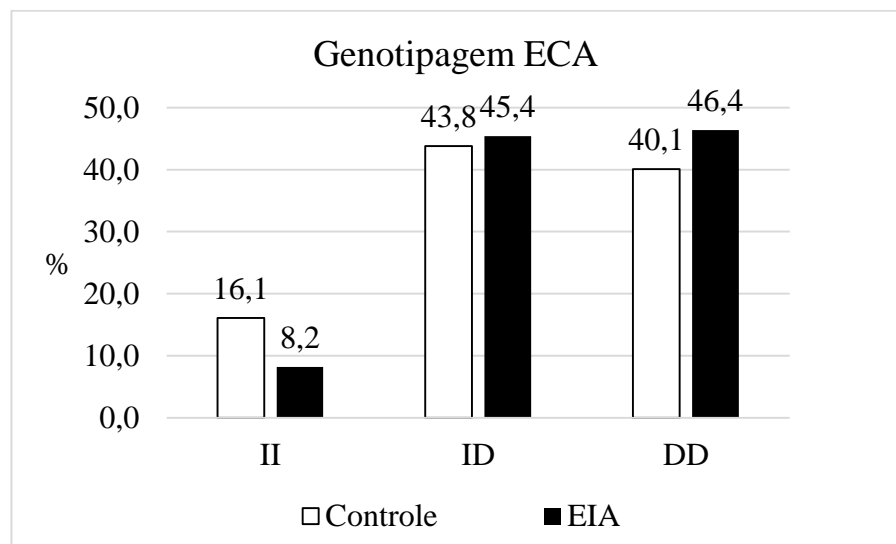


Gráfico 1 - Distribuição genotípica do polimorfismo I/D da enzima conversora de angiotensina (ECA) no grupo controle e no grupo com escoliose idiopática do adolescente (EIA); II – homocigoto para inserção; ID – heterocigoto; DD – homocigoto para deleção.

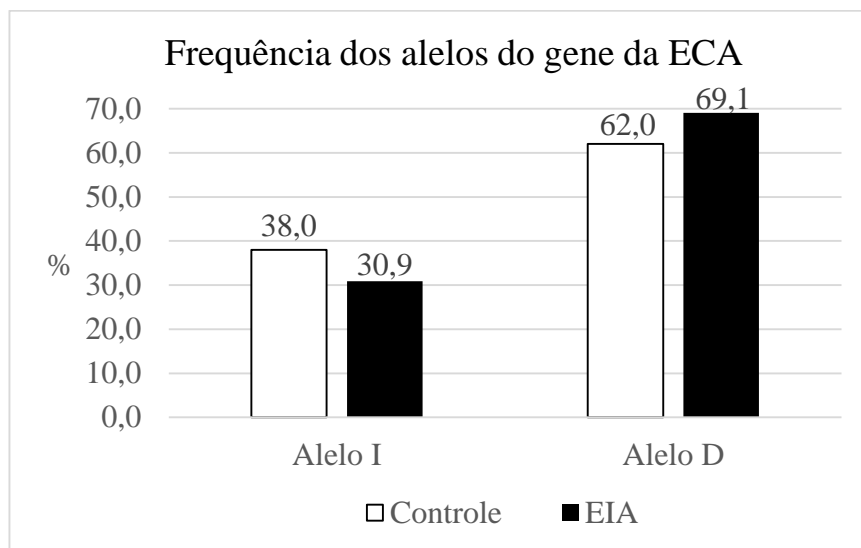


Gráfico 2 - Distribuição dos alelos do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) no grupo controle e no grupo com escoliose idiopática do adolescente (EIA); I – Inserção; D – Deleção.

Na análise do *oddsratio* da amostra, indivíduos com genótipo homozigoto DD tiveram 2,25 vezes mais chance de desenvolver a doença do que os homozigotos II. Enquanto que heterozigotos, pelo estudo, apresentaram o dobro do risco de desenvolverem a doença quando comparados aos homozigotos II. Considerando apenas os alelos, a chance de desenvolver doença foi 37% maior em pessoas com alelo D, no entanto, os testes não apresentaram significância estatística (Tabela 3).



Tabela 3. Resultados da genotipagem da ECA e cálculo do *odds ratio*.

Variável	Grupo				OR	IC (95%)		p
	Controle		EIA			Inferior	Superior	
	n	%	n	%				
<b>Genotipagem ECA</b>								
II	22	16,1	8	8,2	1,00			
ID	60	43,8	44	45,4	2,02	0,82	4,95	0,126
DD	55	40,1	45	46,4	2,25	0,92	5,53	0,077
<b>Alelo</b>								
I	104	38,0	60	30,9	1,00			
D	170	62,0	134	69,1	1,37	0,93	2,02	0,117

Regressão logística bivariada

EIA – escoliose idiopática do adolescente; ECA – enzima conversora de angiotensina; OR – *oddsratio*; IC – intervalo de confiança; N – número absoluto; II – homozigoto para inserção; ID – heterozigoto; DD – homozigoto para deleção.

Na comparação dos genótipos entre o grupo com curvas maiores que 50° e o grupo saudável, verificou-se uma predominância do alelo deleção (D) no primeiro grupo de 69,1%, superior ao do grupo controle (62%). No grupo com mensuração do ângulo de Cobb menor que 50 graus, 69% dos alelos genotipados eram deleção e as diferenças encontradas não foram significantes estatisticamente (Gráficos 3 e 4).

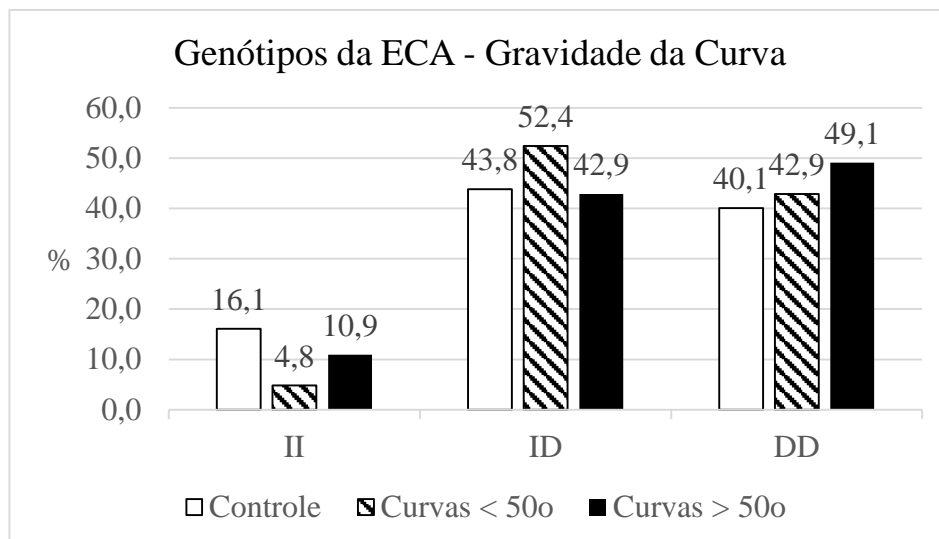


Gráfico 3 – Distribuição de frequência de genótipos no grupo controle, nas curvas menores que 50° e nas curvas graves (>50°). ECA – enzima conversora de angiotensina; II – homocigoto para inserção; ID – heterocigoto; DD – homocigoto para deleção. ( $p = 0,288$ )

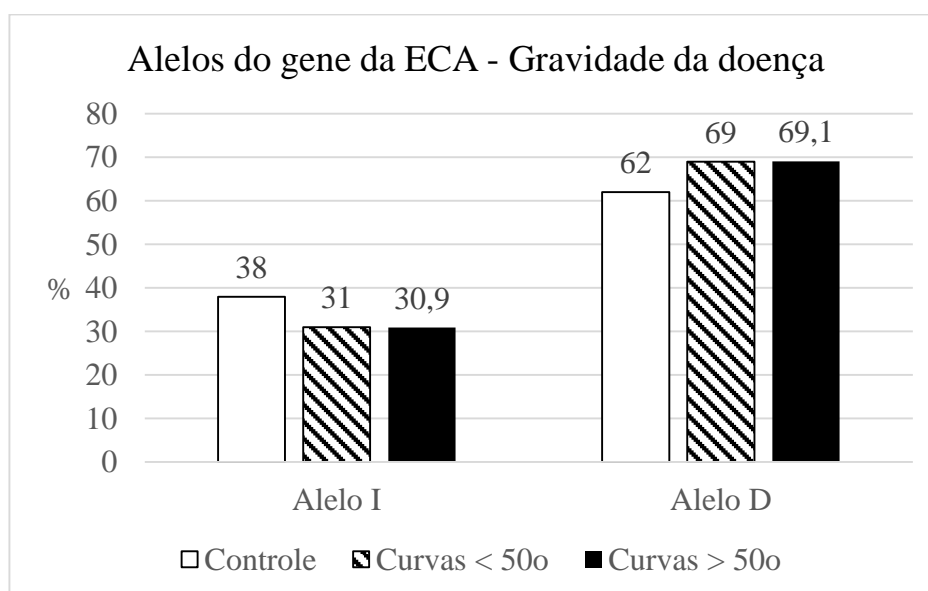


Gráfico 4 - Distribuição dos alelos do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) no grupo controle e no grupo com escoliose menor que 50° e maior que 50°; I – Inserção; D – Deleção. ( $p = 0,292$ ).



**DISCUSSÃO**

## 6. Discussão

No intuito de elucidar a fisiopatologia da escoliose idiopática do adolescente (EIA), os estudos sobre a doença objetivam associá-la a um fator causal. As diversas teorias etiológicas, identificadas na literatura, comprovam que se trata de uma doença multifatorial (Gorman, Julien e Moreau, 2012). Tendo em vista a complexidade dos fatores causais e reconhecendo que, provavelmente, haja uma inter-relação entre eles, desenvolvemos um estudo etiológico no qual abordamos um fator genético que pode influenciar nas alterações da musculatura paravertebral descritas em pacientes com EIA (Chagas, Puertas e Filho, 1993).

A observação dos aspectos epidemiológicos dos pacientes com EIA auxilia na identificação dos prováveis fatores causais da doença. A marcante preponderância do gênero feminino é bem conhecida na literatura. Na caracterização de 446 pacientes, DE GEORGE, FISHER (1967) encontraram uma proporção de sete meninas para cada menino. Esta mesma proporção foi descrita por WYNNE-DAVIES, em 1968, nos pacientes com EIA.

No estudo que identificou a associação da doença com o cromossomo X, JUSTICE *et al.* (2003) relataram uma incidência de 78% de meninas na população escoliótica estudada. Além disso, o gênero feminino é sabidamente mais susceptível a desenvolver a progressão da doença (Suh *et al.*, 2011). Considerando os dados da literatura e com o objetivo de manter os dois grupos do estudo homogêneos, selecionamos apenas o gênero feminino para avaliação.

No grupo das pacientes com EIA, 88,7% eram da cor branca, seguido por 8,2% de pardas e, apenas 2,1% eram da cor preta. De acordo com o último censo brasileiro, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2010, a proporção de cor branca, no estado de São Paulo, era de 63,97%, enquanto pardos correspondiam a 29,1% e apenas 5,5% eram da cor preta (Ibge, 2010).

A predominância da cor branca também foi reportada por ZAVATSKY *et al.* (2013), em sua análise de 403 escolióticos norte-americanos, 54% declararam-se brancos aos pesquisadores e 21% da cor preta. No Brasil, WAJCHENBERG *et al.* (2005) também descreveram sua amostra com maioria das pacientes de origem caucasiana.

A idade da primeira menstruação é uma das principais variáveis estudadas nas pacientes com EIA. Constitui um dos marcadores de maturidade e é um indicativo do potencial de crescimento remanescente da coluna vertebral. É consensual a associação entre o grau de maturidade sexual e a progressão da curva. No entanto, a menarca, mesmo sendo considerada um sinal confiável de que a velocidade de crescimento está diminuindo, é muito variável e de difícil utilização para avaliações mais precisas (Sanders, 2007).

MAO *et al.* (2011) encontraram uma média de idade da primeira menstruação de 2.196 chinesas com EIA de  $12,83 \pm 1,22$  anos, os autores concluíram que as pacientes com a deformidade apresentaram uma menarca tardia nas meninas com EIA em relação ao grupo controle, com uma diferença estatisticamente significativa. CASTILHO *et al.* (2012) avaliaram 750 meninas saudáveis, na mesma macrorregião em que realizamos a coleta da amostra, que apresentaram uma média de idade da

menarca de 12,08 anos, idade semelhante ao encontrado nas pacientes com EIA que avaliamos ( $12,0 \pm 1,1$  anos).

As características radiográficas das curvas escolióticas configuram uma gama de apresentações fenotípicas da doença. Tanto a diversidade da magnitude, direção e classificação da curva, quanto a observação de um padrão razoavelmente uniforme das curvas denominadas “típicas” da EIA, nos fazem pensar em uma doença de caráter poligênico. A média do valor angular da curva principal, aferido pela técnica de Cobb, foi de  $52,36^\circ$  e variou entre  $18^\circ$  e  $128^\circ$ . Em mais da metade da amostra o tratamento realizado foi o cirúrgico e 56,7% das pacientes tinham uma curva maior que  $50^\circ$ , caracterizando um grupo com a forma grave da doença.

SUH *et al.* (2011) coordenaram um amplo estudo de *screening* de escoliose na população coreana. Após identificação dos doentes, analisaram inúmeros aspectos epidemiológicos da deformidade e as características da curva. Quanto ao padrão de curva, as curvas torácicas foram, na população coreana, a mais comum (47,59%), seguido por curvas toracolombares/lombares (40,10%), dupla curva verdadeira (9,09%) e dupla curva torácica (3,22%). No presente estudo, o padrão mais encontrado também foi o de curva torácica principal (80,5%), seguido pela curva lombar (15,5%) e toracolombar (4%). Os tipos II e III, pela classificação de KING *et al.* (1983), corresponderam a 83,5% das curvas avaliadas.

A semelhança epidemiológica dos indivíduos com EIA em diferentes regiões, demonstrada na comparação da nossa amostra com a literatura, indica a existência do fator genético delineando as apresentações fenotípicas da doença. Entretanto, o fator primordial para corroborar com a

etiologia genética da deformidade é a incidência aumentada da doença nos parentes dos portadores da deformidade. Observamos que 17,5% do grupo com deformidade apresentava algum familiar com EIA.

De GEORGE, FISHER (1967), WINNE-DAVIES (1968) e CZEIZEL *et al.* (1978) também descreveram porcentagens semelhantes (17%, 12% e 11,18%, respectivamente) de portadores de EIA que apresentavam algum parente com a doença. No Brasil, WAJCHENBERG, PUERTAS, ZATZ (2005), em estudo de prevalência, destacaram que 33% dos pacientes com a deformidade tinham familiar afetado.

A partir da observação do aumento da prevalência do número de casos nas famílias de pacientes com EIA, sucederam-se publicações que objetivavam estudar a taxa de concordância entre gêmeos mono e dizigóticos (De GEORGE, FISHER, 1967; INOUE *et al.*, 1998). O primeiro destes relatos foram de De GEORGE, FISHER (1967), que analisaram os 14 pares de gêmeos e relataram que todos os seis pares monozigóticos eram concordantes na presença de escoliose

Apesar da comprovação da natureza familiar da EIA, o modo de herança ainda é desconhecido. O estudo genealógico, com identificação dos probandos e caracterização de seus familiares, foi um dos desenhos de estudo idealizado para descrever o padrão de herança envolvido na etiologia da EIA. ROBIN e COHEN (1975) colheram informações de 52 membros de uma família com múltiplos membros afetados por cinco gerações (14 casos de EIA) e sugeriram uma transmissão autossômica dominante, com penetrância incompleta. No entanto, não descartaram a possibilidade de tratar-se de uma doença multifatorial com padrão de herança poligênica sugerida por WYNNE-DAVIES (1968). CARR *et al.*



(1992), acreditando em um padrão de herança dominante, estudaram, nos cromossomos 7º, 12º e 17º, as regiões genéticas responsáveis pela codificação do colágeno. No entanto, concluíram que não houve a associação entre esses *loci* cromossômicos estudados e a EIA.

Em 2000, WISE *et al.* refletiram sobre a dificuldade em mapear as alterações no DNA pelos estudos de ligação em doenças poligênicas. Os autores concordaram que estes estudos genéticos se aplicam a doenças raras e que tenham um padrão de herança autossômico dominante. No entanto, mantiveram o mesmo desenho de estudo e mapearam diversos cromossomos nas famílias de um probando com EIA. Concluíram que as posições dos cromossomos 6, 10q e 18q poderiam ser locais de mutação da doença que, provavelmente, têm um caráter poligênico.

Diversos estudos de ligação foram publicados associando algum *locus* cromossômico à presença da EIA. MILLER *et al.* (2005) revisaram regiões cromossômicas que, trabalhos da época, relacionavam à doença e destacaram regiões dos cromossomos 6, 9, 16 e 17 como candidatas primárias à presença da EIA. Além disso, CHAN *et al.* (2002) identificaram relação da doença com *locus* no cromossomo 2 e SALEHI *et al.* (2002) relacionaram o cromossomo 17 à EIA. JUSTICE *et al.* (2003) também desenharam um estudo de ligação e, ao estratificarem as famílias de acordo com o padrão de herança, sugeriram que regiões do cromossomo X estariam ligados à expressão da EIA familiar.

Com o sequenciamento do genoma humano, a partir do século XXI, houve um avanço na compreensão do código genético e das áreas de codificações de determinadas proteínas. Em 2010, MAROSY *et al.*, observando as áreas cromossômicas previamente identificadas no código

genético dos indivíduos com EIA familiar, avançaram na avaliação genética, genotipando sequenciamentos de pequenos fragmentos genéticos localizados nos cromossomos 6 e 10. Assim, os autores concordaram que a modificação de uma única área genética não seria suficiente para explicar a causa da doença, mas sim a avaliação de pequenos fragmentos do DNA que estariam relacionados ao caráter poligênico e multifatorial da doença.

Considerando que estudos familiares são mais eficientes para testar hipóteses relacionadas às doenças raras, como as mutações genéticas, os estudos de ligação têm um baixo poder para detectar doenças complexas e multifatoriais. Estas são melhor avaliadas por meio do desenho de estudo do tipo caso-controle, que visa identificar variantes comuns de sequências de DNA, denominados polimorfismos (Gorman, Julien e Moreau, 2012). Os polimorfismos candidatos para análise na EIA são escolhidos por uma hipotética relação entre a alteração sistêmica ou local que o polimorfismo irá acarretar com as teorias etiológicas de EI. A associação entre estes “candidatos genéticos” e a doença caracteriza um perfil genético do indivíduo suscetível a desenvolver a patologia.

Já existem descritos polimorfismos relacionados à EIA. Entre eles, estão aqueles envolvidos na codificação de proteínas estruturais da matrix extracelular: matrilina-1 (Chen *et al.*, 2009), metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) (Aulisa *et al.*, 2007) e dipeptidase (DPP9) (Qiu *et al.*, 2008). E àqueles relacionados à formação e ao metabolismo ósseo: a calmodulina (CALM1) (Zhao *et al.*, 2009) e o gene receptor da vitamina D (VDR) (Suh, Eun e Lee, 2010).

Recentemente, os polimorfismos do eixo somatotrófico e androgênico foram considerados potenciais candidatos à etiopatogenia da

EIA. Entre eles, destacamos: os receptores de estrogênio (ESR1, ESR2) e seus codificadores genéticos (PvuII e XbaI) (Inoue, Minami, Nakata, Kitahara, *et al.*, 2002); (Wu *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009), os marcadores genéticos dos receptores de estrógenos acoplados à proteína G (GPER) e o fator de crescimento da insulina-like (IGF-1) (Yang *et al.*, 2009) e o gene para o receptor do hormônio de crescimento (GHR) (Yang *et al.*, 2009).

TAKAHASHI *et al.* (2011) conduziram um amplo estudo de associação genômica na população japonesa, no qual puderam avaliar os resultados de 455.121 SNPs genotipados em 1033 pacientes com EIA e 1473 controles. Observaram que, no cromossomo 10q24.31, três SNPs pareceram estar associados à doença. Estes SNPs, então, foram novamente genotipados em uma amostra de 326 japonesas com EIA e 9.823 controles com evidências da associação com a doença. Estes polimorfismos genéticos estão localizados na região que contém o gene LBX1, expresso no sistema nervoso central e na musculatura esquelética. Esta associação foi confirmada em estudo subsequente, do tipo caso-controle, em outra amostra populacional (Jiang *et al.*, 2013).

Seguindo modelo genético de investigação da relação do sequenciamento do DNA com a suscetibilidade do indivíduo em desenvolver a doença, elegemos a teoria do desequilíbrio muscular como fator primordial da fisiopatologia da EIA e observamos que ainda não havia estudos na literatura que relacionassem os genes envolvidos nas características da fibra muscular com a EIA.

As fibras musculares paravertebrais apresentam importante função da manutenção da postura ereta. Em 1973, JOHNSON *et al.*, por meio de análise de autópsias da musculatura de indivíduos jovens, observaram que

os eretores da espinha, em suas camadas profundas e superficiais, apresentaram uma predominância das fibras do tipo 1, assim como os adutores do polegar, o sóleo e tibial anterior. Estas fibras são resistentes a fadigas e têm um metabolismo predominantemente aeróbico, por isso, são mais prevalentes nos grupamentos musculares importantes para a manutenção da postura ereta (Thorstensson e Carlson, 1987).

THORSTENSSON e CARLSON (1987), com o objetivo de padronizar a frequência dos tipos de fibras na musculatura paravertebral, avaliaram a biópsia de 16 voluntários saudáveis. Nos músculos multifídios, 62%, em média, das fibras avaliadas eram do tipo 1, enquanto no músculo longuíssimo houve uma predominância de 57% de fibras do tipo 1. Os autores destacaram que a padronização normal dos tipos de fibras presentes na musculatura paravertebral seria de grande importância para comparação com indivíduos com deformidades da coluna vertebral.

Em 1976, SPENCER e ZORAB avaliaram histologicamente biópsias de 35 pacientes com EIA e compararam com quatro controles saudáveis. Observaram que nenhum dos pacientes apresentou biópsias normais e postularam uma evidência de um processo neuropático da musculatura paravertebral. Esses mesmos autores, em estudo com animais, não verificaram diferenças no padrão do tipo de fibra muscular entre os coelhos em que haviam provocado a escoliose e nos coelhos controles. Concluíram que as alterações da proporção do tipo de fibra encontradas em estudos prévios em humanos, provavelmente, são de origem primária e não seriam a consequência da deformidade.

A diminuição da predominância do tipo 1 de fibra muscular, no lado côncavo da curva escoliótica, é uma das principais alterações encontradas

na literatura (MEIER *et al.*, 1997 e MANNION *et al.*, 1998). Além disso, trabalhos publicados sobre o tema já referiram “*type Grouping*” das fibras do tipo 1, atrofia e presenças de *CORE* nesta musculatura e não deixam dúvidas de que esta musculatura não apresenta sua distribuição igual à de indivíduos saudáveis (Fidler e Jowett, 1976; Bylund *et al.*, 1987; Chagas, Puertas e Filho, 1993). No entanto, ainda existe discordância na literatura se essas alterações são causa ou efeito da deformidade (MEIER *et al.*, 1997 e MANNION *et al.*, 1998).

Devido à influência dos polimorfismos do SRA no metabolismo do tipo de fibra muscular, WAJCHENBERG *et al.* (2013) analisaram alguns destes polimorfismos em uma família com múltiplos membros afetados pela EIA. Na avaliação do gene da ECA, observaram alta frequência de indivíduos homozigotos de deleção, o que corroborou para a atual investigação deste gene em indivíduos com EIA.

A ECA, ou cininase II, é uma metalo-peptidase amplamente distribuída na superfície da membrana de células endoteliais e epiteliais em vários tecidos, tais como: miocárdio, tecido adiposo, músculo esquelético e também, em fluidos corporais (Linderman e Greene, 2001). Ela possui um papel importante na homeostase circulatória na hidrólise da angiotensina I em angiotensina II, um peptídeo vasoconstritor. Além disso, a ECA degrada abradicinina, um peptídeo vasodilatador, aumentando o “estado” de vasoconstrição sistêmica (Murphey, Kumar e Brown, 2000).

De acordo com RENELAND *et al* (1999), o envolvimento do polimorfismo I/D não é limitado somente às concentrações da ECA plasmática, mas também determina as concentrações da ECA tecidual aonde existe um sistema local de renina-angiotensina na musculatura

esquelética. A interação entre o sistema local e sérico da renina-angiotensina, regulado pela ECA, permite uma adaptação metabólica do tipo de fibra muscular, de acordo com o genótipo do indivíduo.

Existe uma maior sustentação de energia induzida pelo genótipo II do gene da ECA, promovendo no organismo uma eficiência metabólica otimizada na função contrátil do músculo esquelético, pela maximização do uso dos ácidos graxos livres (Montgomery *et al.*, 1999). ZHANG *et al.*(2003) associaram a eficiência muscular com a presença da fibra do tipo 1, por influência do alelo inserção, enquanto o genótipo de deleção estaria relacionado à presença de fibras do tipo 2, proporcionando força máxima nos músculos que tenham a predominância deste tipo de fibra.

Na análise das frequências dos genótipos encontrados no nosso estudo, a maior proporção do genótipo de deleção e do alelo D no grupo com EIA concordou com a encontrada por WAJCHENBERG *et al.*(2013) em família com múltiplos membros afetados pela EIA. Também observamos que a porcentagem de incidência de indivíduos saudáveis homozigotos II foi o dobro da encontrada nas pacientes com EIA.

Sabidamente, os homozigotos de deleção apresentam maiores níveis séricos da ECA, favorecendo o metabolismo anaeróbico das fibras musculares do tipo II (Rigat *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2010). É esperado que a musculatura paravertebral, predominantemente de fibras aeróbicas do tipo I, tenha uma eficiência metabólica menor nestes indivíduos homozigotos de deleção. Da mesma maneira, esta musculatura teria o seu metabolismo aeróbico favorecido pela presença do alelo de inserção, que se comportaria como um fator de proteção e, talvez por isso, teve sua maior frequência encontrada no grupo saudável.

Nos estudos histológicos da musculatura paravertebral a maior incidência do tipo 2 de fibra muscular nesta região nos pacientes com EIA (Meier *et al.*, 1997; Mannion *et al.*, 1998) estaria relacionada à maior proporção de indivíduos doentes que carregam o alelo D, demonstrado nesta amostra. Assim, pela influência direta no metabolismo destas fibras e na sua transformação nos pacientes com deformidades, o polimorfismo do gene da ECA também poderia estar relacionado à progressão da curva, ou seja, a uma maior progressão nos homozigotos DD. Na nossa amostra, para avaliar essa possível associação, dividimos os pacientes com escoliose em dois grupos: com curvaturas graves ou com curvas menores que 50 graus. Nota-se um aumento retilíneo na frequência dos genótipos homozigotos de deleção ao compararmos, respectivamente, o grupo saudável, os pacientes com escoliose menor que 50 graus e os pacientes com escoliose grave.

Na análise do *OddsRatio* desta amostra os indivíduos genotipados como homozigotos de deleção possuem 2,25 vezes mais chance de desenvolverem a doença. No entanto, esta análise isolada da frequência do genótipo da ECA não contempla os outros inúmeros fatores que fazem desta doença uma condição multifatorial. Portanto, a interpretação do risco de chance de desenvolver a doença deve ser cautelosa, considerando o caráter poligênico da EIA, os fatores genéticos e epigenéticos que podem alterar o risco do desenvolvimento da deformidade.

A distribuição genotípica do polimorfismo da ECA em indivíduos saudáveis é variável na literatura. RIGAT *et al.* (1990), em sua casuística com 38 homens e 42 mulheres saudáveis observou a seguinte distribuição: II – 17,5%, ID – 46,2% e DD – 36,3%. Avaliando 119 homens saudáveis, ALMEIDA *et al.* (2010) descreveram que 23% eram homozigotos de

inserção, heterozigotos corresponderam a 54% e 23% homozigotos de deleção. Estudos semelhantes encontraram uma proporção de genótipos de deleção variando entre 19% a 49% da população saudável (Montgomery *et al.*, 1999; Charbonneau *et al.*, 2008). Observamos em nossa casuística que 40,1% eram homozigotos de deleção. A maior frequência do aparecimento do alelo deleção no grupo saudável em relação a maioria dos estudos encontrados na literatura, interferiu na significância estatística encontrada na análise da diferença dos resultados dos genótipos entre o grupo controle e o grupo com escoliose.

De acordo com a genotipagem do grupo controle (maior frequência de genótipos II) infere-se que este grupo tem um perfil de atividade sérica da ECA diminuído em relação ao grupo de pacientes doentes. Este perfil sérico com menor atividade sérica pode ser mimetizado com a utilização de inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) (Onder, Vedova e Pahor, 2006). A continuidade dos estudos do sistema renina-angiotensina e entendimento da sua relação com a musculatura paravertebral nos pacientes com EIA poderia oferecer maiores subsídios para extrapolarmos estes resultados para um possível tratamento medicamentoso, visando estabelecer uma condição favorável para o metabolismo aeróbico das fibras musculares paravertebrais.

É importante ressaltarmos que o poder dos resultados deste estudo é limitado. A principal limitação da análise está na dificuldade de ampliarmos o número de doentes participantes do estudo. Foram necessários quatro anos para formarmos o grupo doente, por isso, a realização de estudos multicêntricos se faz necessária para a comprovação ou não da relação encontrada nesta pesquisa. O resultado desta avaliação



genética também necessita de uma validação para outras populações do mundo, já que as conclusões encontradas são referentes ao grupo étnico-racial da macrorregião estudada.

Por fim, o estudo da expressão genética dos componentes do sistema renina-angiotensina na musculatura paravertebral das pacientes com escoliose idiopática podem contribuir no entendimento dos processos adaptativos que ocorrem nesta região. Além disso, a avaliação dos níveis séricos da atividade da ECA nos pacientes com EIA ajudará na identificação da real influência do SRA na fisiopatologia desta deformidade.

**CONCLUSÃO**

## **7. Conclusão**

Não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina I e a presença de escoliose idiopática do adolescente.

## **REFERÊNCIAS**

## 8. Referências

Adams W. Lectures on the pathology and treatment of lateral and other forms of curvature of the spine. Second. London, England: Churchill, 1882. 369p.

Almeida SS, Barros CC, Moraes MR, Russo FJ, Haro AS, Rosa TS, Alves MF, Pesquero JB, Carmona AK, Bacurau RF, Araujo RC. Plasma kallikrein and angiotensin I-converting enzyme N- and C-terminal domain activities are modulated by the insertion/deletion polymorphism. *Neuropeptides*, 44(2):139–43, 2010.

Aulisa L, Papaleo P, Pola E, Angelini F, Aulisa AG, Tamburrelli FC, et al. Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. *Spine (Phila Pa 1976)*, 32(24):2700–02, 2007.

Axenovich TI, Zaidman AM, Zorkoltseva IV, Tregubova IL, Borodin PM. Segregation analysis of idiopathic scoliosis: demonstration of a major gene effect. *Am J Med Genet*, 86(4):389-94,1999.

Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B, Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. *Med Sci Sports Exerc*, 41:35–73,2009.

Bylund P, Jansson E, Dahlberg E, Eriksson E. Muscle fiber types in thoracic erector spinae muscles. Fiber types in idiopathic and other forms of scoliosis. *ClinOrthopRelat Res*, 214:222–8,1987.

Carr AJ, Ogilvie DJ, Wordsworth BP, et al. Segregation of structural collagen genes in adolescent idiopathic scoliosis. *ClinOrthopRelat Res*, 274:305–10, 1992.

Castilho SD, Pinheiro CD, Bento CA, Barros-Filho AA, Cocetti M. Tendência secular da idade da menarca avaliada em relação ao índice de massa corpórea. *ArqBrasEndocrinolMetab*,56(3):195-200, 2012.

Chagas JCM, Puertas EB, Laredo-Filho J. Histochemical study of back rotator muscle of adolescent patient with idiopathic scoliosis. *Rev. bras. ortop*,28(3):125-8, 1993.

Chan V, Fong GC, Luk KD, Yip B, Lee MK, Wong MS, et al. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet*, 71:401–6, 2002.

Charbonneau DE, Hanson ED, Ludlow AT, et al. ACE genotype and the muscle hypertrophic and strength responses to strength training. *Med Sci Sports Exerc*, 40:677–83, 2008.

Chen Z, Tang NL, Cao X, Qiao D, Yi L, et al. Promoter polymorphism of matrilin-1 gene predisposes to adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese population, *Eur J Hum Genet*, 17: 525–32, 2009.

Cheung J, Halbertsma JP, Veldhuizen AG, Sluiter WJ, Maurits NM, Cool JC. A preliminary study on electromyographic analysis of the paraspinal musculature in idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*, 14:130–7, 2005.

Cobb J. Outline for the study of scoliosis. *American Academy of Orthopaedic Surgeons Instructional Course Lectures*. 5:261-5p. 1948.



Inoue M, Minami S, Nakata Y, Kitahara H, Otsuka Y, Isobe K, Takaso M, Tokunaga M, Nishikawa S, Moruta T, Moriya H. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 27(21):2357-62, Nov 2002.

Jiang H, Qiu X, Dai J, Yan H, Zhu Z, Qian B, Qiu Y. Association of rs11190870 near LBX1 with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in a Han Chinese population. *Eur Spine J*, 22(2):282-6, Feb 2013.

Johnson MA, Polgar J, Weightman D, Appleton D. Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *Journal of the Neurological Sciences*, 18(1):111–29, 1973.

Justice CM, Miller NH, Marosy B, Zhang J, Wilson AF. Familial idiopathic scoliosis: Evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine*, 28:589–94, 2003.

King HA, Moe JH, Bradford DS, Winter RB. The selection of fusion levels in thoracic idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg[Am]*, 65(9):1302-13, 1983.

Kouwenhoven JW, Ommeren PM, Pruijs HE, Castelein RM. Spinal decompensation in neuromuscular disease. *Spine*, 31(7):E188–E191, 2006.

Linderman JR, Greene AS.. Distribution of angiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. *Microcirculation*, 8(4):275-81, Aug 2001.

Lonstein JE. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet*, 344(8934):1407-12, Nov 1994.



Mannion A, Meier M, Grob D, Muntener M. Paraspinal muscle fibre type alterations associated with scoliosis: an old problem revisited with new evidence. *Eur Spine J*, 7:289–93, 1998.

Mao, SH, Jiang J, Sun X, Zhao Q, Qian BP, Liu Z, Shu H, Qiu Y. Timing of menarche in Chinese girls with and without adolescent idiopathic scoliosis: current results and review of the literature. *Eur Spine J*, 20(2):260-5, Feb 2011.

Marosy B, Justice CM, Vu C, Zorn A, Nzeqwu N, Wilson AF, Miller NH. Identification of susceptibility loci for scoliosis in FIS families with triple curves. *Am J Med Genet [A]*, 152(4):846-55, Apr 2010.

Meier MP, Klein MP, Krebs D, Grob D, Müntener M. Fiber transformations in multifidus muscle of young patients with idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 22(20):2357-64, Oct 1997.

Miller NH, Justice CM, Marosy B, Doheny KF, Pugh E, Zhang J, Dietz HC 3<sup>rd</sup>, Wilson AF. Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 30(10):1181-7, May 2005.

Miyake A, Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Ogura Y, Dai J, Qiu X, Takahashi A, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Kubo M, Tsunoda T, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Qiu Y, Matsumoto M, Ikegawa S. Identification of a susceptibility locus for severe adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 17q24.3. *PLoS One*, 8(9):e72802, 2013.

Montgomery H, Clarkson P, Barnard M, Bell J, Brynes A, Dollery C, Hajnal J, Hemingway H, Mercer D, Jarman P, Marshall R, Prasad K, Rayson M, Saeed N, Taimud P, Thomas L, Jubb M, World M, Humphries S. Angiotensin-converting-enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training. *Lancet*, 353(9152):541-5, Feb 1999.

Murphey LJ, Kumar S, Brown NJ. Endogenous bradykinin and the renin and pressor responses to furosemide in humans. *J PharmacolExpTher*, 295(2):644-8, Nov 2000.

Ocaka L, Zhao C, Reed JA, Ebenezer ND, Brice G, Morley T, Mehta M, O'Dowd J, Weber JL, Hardcastle AJ, Child AH. Assignment of two loci for autosomal dominant adolescent idiopathic scoliosis to chromosomes 9q31.2-q34.2 and 17q25.3-qtel. *J Med Genet*, 45(2):87-92, Feb 2008.

Ogilvie J. Adolescent idiopathic scoliosis and genetic testing. *CurrOpinPediatr*, 22(1):67-70, Feb 2010.

Onder G, Vedova CD, Pahor M. Effects of ACE inhibitors on skeletal muscle. *Curr Pharm Des*, 12(16):2057-64, 2006.

Puthuchery Z, Skipworth JR, Rawal J, Loosemore M, Van Someren K, Montgomery HE. Genetic influences in sport and physical performance. *Sports Med*, 41(10):845-59, Oct 2011.

Qiu XS, Tang NL, Yeung HY, Qiu Y, Cheng JC. Association study between adolescent idiopathic scoliosis and the DPP9 gene which is located in the candidate region identified by linkage analysis. *Postgrad Med J*, 84(995):498-501, Sep 2008.

Raggio CL, Giampietro PF, Dobrin S, Zhao C, Dorshorst D, Ghebranious N, Weber JL, Blank RD. A novel locus for adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 12p. *J Orthop Res*,27(10):1366-72, Oct 2009.

Reneland R, Haenni A, Andersson PE, Andrén B, Lithell H. Skeletal muscle angiotensin-converting enzyme and its relationship to blood pressure in primary hypertension and healthy elderly men. *Blood Press*, 8(1):16-22, 1999.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Gambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 86(4):1343-6, Oct 1990.

Robin GC, Cohen T. Familial scoliosis. A clinical report. *J Bone Joint Surg Br*, 57(2):146-8, May 1975.

Salehi LB, Mangino M, De Serio S, De Cicco D, Capon F, Semprini S, Pizzuti A, Novelli G, Dallapiccola B. Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet*, 111(4-5):401-4, Oct 2002.

Sanders JO. Maturity indicators in spinal deformity. *J Bone Joint Surg[Am]*, 89(Suppl 1):14-20, Feb 2007.

Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl*, 3(2):120-1, Oct 1993.

Spencer GS, Zorab PA. Spinal muscle in scoliosis. Part 1. Histology and histochemistry. *J Neurol Sci*, 30(1):137-42, Nov 1976.

Spencer GS, Zorab PA. Spinal muscle in scoliosis. Comparison of normal and scoliotic rabbits. *J Neurol Sci*, 30(2-3):405-10, Dec 1976.

Suh KT, Eun IS, Lee JS. Polymorphism in vitamin D receptor is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*, 19(9):1545-50, Sep 2010.

Suh SW, Modi HN, Yang JH, Hong JY. Idiopathic scoliosis in Korean schoolchildren: a prospective screening study of over 1 million children. *Eur Spine J*, 20(7):1087-94, Jul 2011.

Takahashi Y, Kou I, Takahashi A, Johnson TA, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Chiba K, Hosono N, Kamatani N, Tsunoda T, Toyama Y, Kubo M, Matsumoto M, Ikegawa S. A genome-wide association study identifies common variants near *LBX1* associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet*, 43(12):1237-40, Dec 2011.

Thorstensson A, Carlson H. Fibre types in human lumbar back muscles. *ActaPhysiolScand*, 131(2):195-202, Oct 1987.

Vaughan D, Huber-Abel FA, Graber F, Hoppeler H, Fiüch M. The angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism alters the response of muscle energy supply lines to exercise. *Eur J ApplPhysiol*, 113(7):1719-29, Jul 2013.

Wajchenberg M, Lazar M, Cavaçana N, Martins DE, Licinio L, Puertas EB, Landim E, Zatz M, Ishida A. Genetic aspects of adolescent idiopathic scoliosis in a family with multiple affected members: a research article. *Scoliosis*, 5:7, 2010.

Wajchenberg M, Luciano R de P, Araujo RC, Martins DE, Puertas EB, Almeida SS. Polymorphism of the ace gene and the  $\alpha$ -actinin-3 gene in adolescent idiopathic scoliosis. *ActaOrtop Bras*, 21(3):170-4, May 2013.

Wajchenberg M, Puertas EB, Zatz. Family prevalence of adolescent idiopathic scoliosis in brazilians patients *Coluna/Columna*, 4(3):113-68, 2005.

Wise CA, Barnes R, Gillum J, Hering JA, Bowcock AM, Lovett. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 25(18):2372-80, Sep 2000.

Wu, J, Qiu Y, Zhang L, Sun Q, Qiu X, He Y. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31(10):1131-6, May 2006.

Wynne-Davies R. Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey. *J Bone Joint Surg Br*, 50(1):24-30, Feb 1968.

Yang Y, Wu Z, Zhao T, Wang H, Zhao D, Zhang J, Wang Y, Ding Y, Qiu G. Adolescent idiopathic scoliosis and the single-nucleotide polymorphism of the growth hormone receptor and IGF-1 genes. *Orthopedics*, 32(6):411, Jun 2009.

Zavatsky JM, Peters AJ, Nahvi FA, Bharucha NJ, Trobisch PD, Kean KE, Richard S, Bucello Y, Valdevit A, Lonner BS. Disease severity and treatment in adolescent idiopathic scoliosis: the impact of race and economic status. *Spine J*, Oct 2013.

Zetterberg C, Aniansson A, Grimby G. Morphology of the paravertebral muscles in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 8(5): 457-62, Jul-Aug 1983.

Zhang B, Tanaka H, Shono N, Miura S, Kiyonaga A, Shindo M, Saku K. The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slow-twitch type I fibers in human skeletal muscle. *Clin Genet*, 63(2):139-44, Feb 2003.

Zhao D, Qiu GX, Wang YP, Zhang JG, Shen JX, Wu ZH. Association between adolescent idiopathic scoliosis with double curve and polymorphisms of calmodulin1 gene/estrogen receptor- $\alpha$  gene. *OrthopSurg*, 1(3):222-30, Aug 2009.



**NORMAS ADOTADAS**

Consulta ao DeCS- Descritores em Ciências da Saúde. Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira LM (coordenador), Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB (organizadores). Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. Guia prático. LMP Editora: 1ª. edição. 2008; 84p.

ICMJE – International Committee of Medical of medical Journals Editors. NIH – US National Library Medicine. International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals: Sample References. Disponível em:

[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)<http://www.icjme.org/>

International Committee of Weights and Measures. The international system of units [Internet]. Disponível no endereço eletrônico: [http://www.bipm.org/utis/common/pdf/si\\_brochure\\_8.pdf](http://www.bipm.org/utis/common/pdf/si_brochure_8.pdf)

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo; Manole; 2001.248p.



**ABSTRACT**

**Introduction:** Idiopathic scoliosis is the most common spinal deformity in children and adolescents, however, its etiology remains unknown. Genetic factors and the etiologic theory of muscle imbalance, influenced the choice of the evaluation of polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene in patients with adolescent idiopathic scoliosis. **Objective:** Evaluate the relationship between polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene and the presence of adolescent idiopathic scoliosis. **Methods:** 97 patients with adolescent idiopathic scoliosis and 137 healthy subjects, females, with similar ages were evaluated. After collection and isolation of genomic DNA, participants were genotyped for the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene. For statistical analysis the chi-square test was used and the estimated OddsRatio, adopting a level of significance of 5%. **Results:** Patients with scoliosis showed the following genotype distribution: DD - 46.4%, ID - 45.4% and II - 8.2%. In the control group: DD - 40.1%, ID - 48% and II - 16.1%. The difference between the two groups did not reach statistical significance ( $p = 0.197$ ). The total percentage of the deletion allele (D), found in patients with scoliosis, was 69.1%, while the control group was 62% ( $p = 0.116$ ). **Conclusion:** There was no statistically significant association between the polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene and the presence of adolescent idiopathic scoliosis.

## ANEXO I



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 3 de Setembro de 2010. **CEP 1256/10**

Ilmo(a). Sr(a). Pesquisador(a) RAFAEL DE PAIVA LUCIANO

Co-Investigadores: Eduardo Barros Puertas, Ronaldo de Carvalho Araújo e Flavio Faloppa

Disciplina/Departamento: Ortopedia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo Patrocinador: Recursos Próprios. **PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL** Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Estudo da associação do polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) e escoliose idiopática do adolescente”**. CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo genético. RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue. OBJETIVOS: Estudar o polimorfismo (I/D) da enzima conversora de angiotensina em pacientes com escoliose idiopática do adolescente. OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado. ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **29/08/11** e **28/08/12**. O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1256/10

## ANEXO II

### Termo de consentimento livre esclarecido

Eu, portador do RG n°....., ~~estou sendo convidado a participar~~ de um estudo denominado “**Estudo da associação do polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) e escoliose idiopática do adolescente**”, cujo objetivo e justificativa é estudar o polimorfismo (I/D) da enzima conversora de angiotensina (ECA) em pacientes com escoliose idiopática do adolescente.

A minha participação no referido estudo será no sentido de permitir a coleta da minha amostra sanguínea para extração do DNA e avaliação do polimorfismo da ECA

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese da possível associação da influência genética na etiologia da escoliose idiopática do adolescente. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença desta influência. Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Estou ciente que em qualquer etapa do estudo, terei acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Rafael de Paiva Luciano, que pode ser encontrado no endereço: R. Borges Lagoa N° 783 Vila Mariana – São Paulo, Edifício dos Médicos, 5° andar. Telefone: 11 55716621. Posso ainda, se achar necessário, caso haja alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1° andar – cj 14, 5571-1062, FAX:5539-7162–E-mail:[cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br)

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a

todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá o devido ressarcimento. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

São Paulo, ... de ... .....de 2010.

---

**Assinatura do paciente/representante legal**

---

**Assinatura da testemunha**

---

**Assinatura do responsável pelo estudo**



**Anexo III**

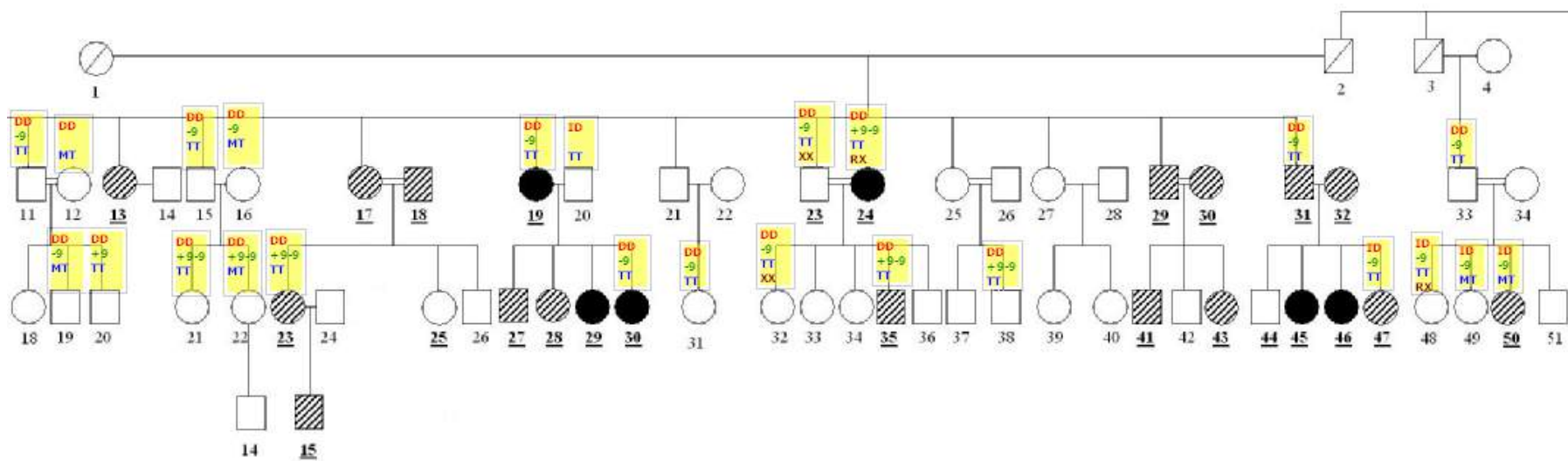
Projeto piloto –Heredograma de família com múltiplos membros afetados

ECA – II, ID, DD;

Angiotensinogênio – MM, MT, TT;

Receptor B2 - -9, +9-9, +9;

Actinina3 (ACTN3) – XX, RX, RR;





## ANEXO IV

ARTIGO ORIGINAL

## POLIMORFISMO DO GENE DA ECA E DA $\alpha$ -ACTININA 3 NA ESCOLIOSE IDIOPÁTICA DO ADOLESCENTE

POLYMORPHISM OF THE ACE GENE AND THE  $\alpha$ -ACTININ-3 GENE IN ADOLESCENT IDIOPATHIC SCOLIOSIS

MARCELO WAJCHENBERG<sup>1</sup>, RAFAEL DE PAIVA LUCIANO<sup>1</sup>, RONALDO CARVALHO ARAÚJO<sup>2</sup>, DÉLIO EULÁLIO MARTINS<sup>1</sup>, EDUARDO BARROS PUERTAS<sup>1</sup>, SANDRO SOARES ALMEIDA<sup>2</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** O polimorfismo da enzima conversora de angiotensina (ECA) I/D e da  $\alpha$ -actinina 3 (ACTN3) R577X está relacionado a variações na função do musculoesquelético. O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição destes polimorfismos em uma família com múltiplos membros com escoliose idiopática do adolescente. **Métodos:** Avaliação de 25 indivíduos de uma família, com múltiplos membros com escoliose idiopática, por meio da coleta de 10 ml de sangue para extração de DNA. A genotipagem do polimorfismo I/D do gene da ECA e R577X do gene da ACTN3 foi realizada utilizando sistema de 2 iniciadores ("primers") específicos, para classificar os indivíduos em homocigotos ou heterocigotos. **Resultados:** Em relação ao polimorfismo da ECA encontrou-se 19 indivíduos DD (76%) e 6 ID (24%). A prevalência do alelo D foi de 88% e do alelo I foi de 12%. Quanto ao polimorfismo da ACTN3 observou-se seis indivíduos RR (24%), 11 RX (44%) e 8 XX (32%). A prevalência do alelo R foi 23 (46%) e do alelo X foi 27 (54%). **Conclusão:** Observou-se diferença entre a distribuição do polimorfismo da ECA e da ACTN3 na família estudada. Ao avaliar o polimorfismo da ECA notou-se maior prevalência do alelo D em relação ao alelo I. **Nível de Evidência III, Estudo Clínico, Transversal.**

**Descritores:** Escoliose. Polimorfismo genético. Coluna vertebral.

## ABSTRACT

**Objective:** The I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme (ACE) and R577X of the  $\alpha$ -actinin-3 (ACTN3) is related to changes in skeletal muscle function. The aim of this study was to evaluate the distribution of these polymorphisms in a family with multiple members with adolescent idiopathic scoliosis (AIS). **Methods:** Evaluated 25 subjects from a family with multiple members with AIS, by collecting 10mL of blood for DNA isolation. The genotyping of the I/D polymorphism of the ACE gene and the R577X of the ACTN3 gene was performed using two specific primers to classify individuals as homozygous or heterozygous. **Results:** Regarding the ACE polymorphism it was found that 19 (76%) subjects were DD and 6 (24%) ID. The prevalence of the D allele was 88% and the I allele was 12%. Regarding the ACTN3 polymorphism there were 6 subjects RR (24%), 11 RX (44%) and 8 XX (32%). The prevalence of the R allele was 23 (46%) and the X allele was 27 (54%). **Conclusion:** There was a difference between the distribution of the polymorphism of ACE and ACTN3 in the family studied. When assessing the ACE polymorphism a higher prevalence of the D allele was observed as compared with the I allele. **Level of Evidence III, Cross-sectional, Clinical Trial.**

**Keywords:** Scoliosis, Polymorphism, genetic, Spine.

**Citação:** Wajchenberg M, Luciano RP, Araújo RC, Martins DE, Puertas EB, Almeida SS. Polimorfismo do gene da ECA e da  $\alpha$ -actinina 3 na escoliose idiopática do adolescente. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(3):170-4. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

**Citation:** Wajchenberg M, Luciano RP, Araújo RC, Martins DE, Puertas EB, Almeida SS. Polymorphism of the ACE gene and the  $\alpha$ -actinin-3 gene in adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(3):170-4. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

## INTRODUÇÃO

A escoliose idiopática é uma das mais frequentes doenças da coluna vertebral, havendo relatos de sua incidência na população mundial de 0,5% a 10%.<sup>1</sup> É definida como desvio lateral na coluna vertebral, associado à rotação, sem que haja causa conhecida, em indivíduos que não apresentam distúrbios neurológicos, musculares ou outras doenças.<sup>2</sup> O estudo radiográfico não demonstra alterações vertebrais e apresenta curvas com mais de 10 graus, mensuradas pelo método de Cobb.<sup>3</sup> A deformidade progride durante a fase de crescimento, podendo ser classificada em três

categorias, de acordo com a idade em que a deformidade é notada: infantil antes dos três anos, juvenil entre três e dez anos (ou início da puberdade) e do adolescente quando aparece após os dez anos ou após a puberdade.<sup>4,5</sup> A prevalência da escoliose idiopática em estudos radiográficos, com populações escolares variou entre 0,3% a 15,3%, porém quando se consideraram apenas curvas maiores do que dez graus, as taxas caíram para valores entre 1,5% e 3%. Em curvas maiores do que 20 graus Cobb, a prevalência está entre 0,3% e 0,5% e em curvas maiores do que 30 graus a taxa é de 0,2% a 0,3%.<sup>5</sup>

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1. Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo UNIFESP/EPM, São Paulo, SP, Brasil.  
2. Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo UNIFESP/EPM, São Paulo, SP, Brasil.

Trabalho realizado no Grupo de Coluna Vertebral do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.  
Correspondência: Rua Borges Lagoa 783, 5º andar, Vila Clementino, São Paulo, SP, Brasil. 04038-002. marcelow@einstein.br

Artigo recebido em 27/08/2012, aprovado em 04/12/2012.



## FONTES CONSULTADAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Apresentação de citações em documentos: NBR-10520. Rio de Janeiro; 1988.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Referencias bibliográficas: NBR-6023. Rio de Janeiro; 2000.

KIRKWOOD, B. R. and STERNE, J. A. C (2006). Essential medical statistics. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. p.502.

HOSMER, D. W. e LEMESHOW, S. (2000) Applied Logistic Regression. 2a. ed. New York: Wiley. 320p.

