



PG-LOCOMOTOR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
APLICADAS AO APARELHO LOCOMOTOR



Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Antonio Eulalio Pedrosa Araujo Junior

**Avaliação da influência de polimorfismos nos genes da leptina e seu receptor no
desenvolvimento e prognóstico da escoliose idiopática do adolescente**

Ribeirão Preto - SP

2023

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Antonio Eulalio Pedrosa Araujo Junior

Avaliação da influência de polimorfismos nos genes da leptina e seu receptor no desenvolvimento e prognóstico da escoliose idiopática do adolescente

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

Orientador: Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino
Co-orientadora: Prof. Dra. Jamila Alessandra Perini Machado

Ribeirão Preto - SP
2023

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

Pedrosa , Antonio Eulalio Araujo Junior

Avaliação da influência de polimorfismos nos genes da leptina e seu receptor no desenvolvimento e prognóstico da escoliose idiopática do adolescente,2023. 117p.:il

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao aparelho locomotor) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Defino, Helton Luiz Aparecido;

Co-orientadora: Perini Machado, Jamila Alessandra; Ribeirão Preto,

Versão Original

1. Escoliose idiopática do adolescente. 2. Leptina. 3. Receptor da Leptina 4. Polimorfismos genéticos. 5. Biomarcador genético.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Pedrosa, Antonio Eulalio Araujo Junior

Título: Avaliação da influência de polimorfismos nos genes da leptina e seu receptor no desenvolvimento e prognóstico da escoliose idiopática do adolescente

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Julgamento:

Prof. Dr. Luciano Miller Reis Rodrigues

Instituição: Faculdade de Medicina do ABC

Julgamento:

Profa. Dra. Fabiana Barzotto Kohlrausch

Instituição: Universidade Federal Fluminense – UFF/RJ.

Julgamento:

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha saúde e de todos os participantes preservada, que nos tornou capazes da realização e inspiração deste trabalho científico.

Agradeço a todos os participantes, em especial:

À Professora Doutora Jamila Perini, pelo incentivo e sua enorme dedicação à pesquisa genética, ao companheirismo profissional desde 2018, com excelentes publicações de artigos e em congresso. Exemplo de amor à pesquisa, no qual me orgulho do privilégio de sua orientação e amizade.

Ao Professor Doutor Helton Defino, ícone na cirurgia de coluna vertebral que sempre foi exemplo de um excelente cirurgião e pesquisador, caminho no qual procuro percorrer durante minha vida profissional.

Ao amigo e conselheiro, Dr Deudeth Gomes do Nascimento, exemplo de sucesso não só profissional, mas como ser humano pelo serviço prestado como médico à sociedade brasileira.

A toda Equipe do laboratório pesquisa do INTO, pela participação e ajuda nos experimentos realizados para a conclusão deste trabalho.

Aos pacientes que voluntariamente participaram da pesquisa visando contribuir para ciência, e aos mesmos que me incentivaram a buscar respostas para o diagnóstico de suas enfermidades através da ciência básica.

Aos colegas de trabalho do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia pelo incentivo e ajuda na coleta de dados durante a elaboração desta tese, durante o período de sofrimento e poucos recursos durante a pandemia para humanidade.

Aos meus pais, Antonio Eulalio e Neuza Eliane, que sempre me incentivaram ao caminho dos estudos e ao alcance do sucesso com ética e moral e através do esforço pessoal contínuo.

Aos meus irmãos, Carlos Alberto e Ana Carolina e toda equipe da Coluna Carioca, companheiros profissionais.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao aparelho locomotor - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela assistência e conhecimento passado.

Muito obrigado a todos!

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

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA TABELAS	XI
1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3. JUSTIFICATIVA	40
4. OBJETIVOS	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	44
6. RESULTADOS	55
7. DISCUSSÃO	70
8. CONCLUSÃO	77
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
10. ANEXOS	91

RESUMO

Pedrosa, AEAJ. Avaliação da influência de polimorfismos nos genes da leptina e seu receptor no desenvolvimento e prognóstico da escoliose idiopática do adolescente. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2023.

A escoliose idiopática do adolescente (EIA) é a mais frequente (90% dos casos), podendo afetar até 5% da população. É uma doença multifatorial, já tendo sido apresentada diversas teorias que tentam explicar o surgimento da doença, incluindo erros metabólicos, alterações do crescimento ósseo e fatores genéticos. O nível alterado de leptina (LEP) e seu receptor (LEPR), ou a deficiência da via de sinalização LEP-LEPR podem resultar em um distúrbio do crescimento esquelético, já que a via atua no metabolismo ósseo. Polimorfismos nos genes que codificam *LEP* e *LEPR* podem influenciar na expressão e/ou função das respectivas proteínas. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi determinar a frequência dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 em indivíduos brasileiros e avaliar a influência desses polimorfismos no desenvolvimento da EIA e no índice de massa corporal (IMC) desses pacientes. Foi realizado um estudo observacional analítico do tipo caso-controle, envolvendo 202 casos com diagnóstico de EIA e 555 controles, sem doença na coluna vertebral. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. As diferenças entre as frequências dos polimorfismos foram avaliadas pelo teste Chi-quadrado (χ^2), e as associações com o desenvolvimento da doença e com o IMC pelas razões de chance (OR) com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%). A maioria dos casos de EIA (n=189, 93,6%) é do sexo feminino (14,5:1), 74,3% (n=150) abaixo dos 18 anos (16,7±5,4 anos), 87,6% (n=177) com baixo peso ou na faixa normal (20,6±4,4 kg/m²), 69,3% (n=140) com grau de maturidade esquelética (Risser IV-V) e 58,9% (n=119) apresentaram curvas com Cobb acima de 45° (49,1±16,3°). A frequência do alelo variante *LEPR* rs2767485 C foi significativamente diferente entre casos de EIA e controles (18,3% e 24,4%, P=0,01), sendo que o genótipo homocigoto variante *LEPR* rs2767485 CC foi encontrado apenas no grupo controle. Assim, tanto o alelo *LEPR* rs2767485 T quanto os genótipos TC + TT foram associados com o risco de desenvolvimento de EIA (OR=1.44; IC95%=1,1-1.9 e OR=1.38; IC95%=1.3-1.4, respectivamente). Além disso, foi observado um predomínio de pacientes com EIA com genótipo selvagem *LEPR* rs2767485 TT no grupo de baixo ou peso normal ($\leq 24,9\text{kg/m}^2$) em comparação ao grupo de EIA com alto IMC ($\geq 25\text{kg/m}^2$) (P=0,03; OR=2,48; IC95%=1,1-5,8). Considerando o polimorfismo *LEP* rs2167270 não foi observada associação com a suscetibilidade genética da EIA (OR=0,95 e IC95%=0,75-1,2), sendo a frequência do alelo variante rs2167270 A de 35,9% nos casos e 37% nos controles (P = 0,68). A distribuição de frequência do polimorfismo *LEP* rs2167270 também não foi significativamente diferente entre os casos de EIA de acordo com o IMC (P = 0,60). O polimorfismo *LEPR* rs2767485 C>T do gene que codifica o principal receptor da leptina (sOB-R) foi associado com o risco de desenvolvimento da EIA e com baixo IMC, o que representa um avanço na compreensão da etiologia da doença. Esses dados irão contribuir para a identificação de biomarcadores genéticos, que podem ser utilizados no aprimoramento do diagnóstico, identificando indivíduos em risco, permitindo um planejamento de tratamento individualizado e, conseqüentemente, melhorando a qualidade de vida do paciente.

Palavras-chave: Escoliose idiopática do adolescente. Leptina Receptor da leptina. Polimorfismo genético. Biomarcador genético.

ABSTRACT

Pedrosa, AEAJ. Evaluation of the influence of polymorphisms in leptin genes and its receptor in the development and prognosis of adolescent idiopathic scoliosis. [Thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto; 2023.

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is the most frequent (90% of cases) and may affect up to 5% of the population. It is a multifactorial disease, and several theories have been presented that try to explain the onset of the disease, including metabolic errors, changes in bone growth and genetic factors. The altered level of leptin (LEP) and its receptor (LEPR), or the deficiency of the LEP-LEPR signaling pathway can result in a skeletal growth disorder, since the pathway acts on bone metabolism. Polymorphisms in the genes that encode LEP and LEPR can influence the expression and/or function of the respective proteins. In this context, the objective of this study was to determine the frequency of the LEP rs2167270 and LEPR rs2767485 polymorphisms in Brazilian individuals and to evaluate the influence of these polymorphisms on the development of AIS and on the body mass index (BMI) of these patients. A case-control analytical observational study was carried out, involving 202 cases diagnosed with AIS and 555 controls without spinal disease. Genotyping of polymorphisms was performed by real-time PCR using the TaqMan system. Differences between the frequencies of polymorphisms were assessed using the Chi-square test (χ^2), and associations with disease development and BMI by odds ratios (OR) with a 95% confidence interval (95% CI). Most AIS cases (n=189, 93.6%) are female (14.5:1), 74.3% (n=150) under 18 years of age (16.7±5.4 years), 87.6% (n=177) with low weight or in the normal range (20.6±4.4 kg/m²), 69.3% (n=140) with degree of skeletal maturity (IV-V) and 58.9% (n=119) had curves with Cobb above 45° (49.1±16.3°). The frequency of the variant LEPR rs2767485 C allele was significantly different between AIS cases and controls (18.3% and 24.4%, P=0.01), and the homozygous variant LEPR rs2767485 CC genotype was found only in the control group. Thus, both the LEPR rs2767485 T allele and the TC + TT genotypes were associated with the risk of developing EIA (OR=1.44; 95%CI=1.1-1.9 and OR=1.38; 95%CI=1.3-1.4, respectively). In addition, a predominance of EIA patients with the wild-type LEPR rs2767485 TT genotype was observed in the low or normal weight group ($\leq 24.9\text{kg/m}^2$) compared to the high BMI AIS group ($\geq 25\text{kg/m}^2$) (P= 0.03; OR=2.48; 95%CI=1.1-5.8). Considering the LEP rs2167270 polymorphism, no association was observed with the genetic susceptibility of AIS (OR=0.95 and 95%CI=0.75-1.2), with the frequency of the variant rs2167270 A allele being 35.9% in cases and 37% in controls (P = 0.68). The frequency distribution of the LEP rs2167270 polymorphism was also not significantly different among AIS cases according to BMI (P = 0.60). The LEPR rs2767485 C>T polymorphism of the gene that encodes the main leptin receptor (sOB-R) was associated with the risk of developing AIS and with low BMI, which represents a breakthrough in understanding the etiology of the disease. These data will contribute to the identification of genetic biomarkers, which can be used to improve the diagnosis, identifying individuals at risk, allowing for individualized treatment planning and, consequently, improving the patient's quality of life.

Key-words: Adolescent idiopathic scoliosis. Leptin. Leptin receptor. Genetic polymorphism. Genetic biomarker.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Anteroposterior
BMD	<i>Bone mineral density</i> (Índice de densidade mineral óssea)
C7PL	Linha de prumo de C7
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CDH13	<i>Cadherin 13</i>
CSVL	Linha centro sacral vertical
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EIA	Escoliose idiopática do Adolescente
EV	<i>End vertebra</i> (Vértebra final da curva)
FBN1	fibrilina-1
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> (Estudo de associação ampla do genoma)
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
LBX1	<i>Ladybird homeobox 1</i>
LEP	Leptina
LEP-R	Receptor da leptina
LVSC	Linha vertical sacral central
mRNA	RNA mensageiro
mm	milímetro
MT	main thoracic /Torácia principal
NKX3-1	<i>NK3 homeobox 1</i>
NKX3-2	<i>NK3 homeobox 2</i>
NV	Vértebra neutra
OR	<i>Odds ratio</i> (Razão de chance)
OPG	osteoprotegerina
PAX-1	<i>Paired box 1</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSVL	Linha vertebral sacral posterior
PUMC	<i>Peking Union Medical College</i>
RANK-L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa -beta
RASO	<i>Relative anterior spinal overgrowth</i> (Supercrescimento espinhal anterior relativo)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
SRS	<i>Scoliosis Research Society</i> (Sociedade de Pesquisa em Escoliose)
sOB-R	Soluble obese receptor (receptor da leptina solúvel)
SV	Vértebra estável
SVA	Eixo vertical sagital
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TL/L	Tóraco-lombar/lombar
TP	Torácica proximal
χ^2	Teste Qui-quadrado de Pearson
WHO	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vértebra da coluna vertebral em um corte sagital e axial	17
Figura 2: Anatomia e curvas fisiológicas da coluna vertebral	18
Figura 3: Peças anatômicas de coluna com escoliose	20
Figura 4: Exemplo de paciente com escoliose	22
Figura 5: Radiografia panorâmica de coluna vertebral para definição do ângulo de Cobb	23
Figura 6: Método de Risser para avaliação da maturidade esquelética	25
Figura 7: Avaliação da maturidade esquelética	26
Figura 8: Diagrama da classificação de Lenke para escoliose	27
Figura 9: Cascata multifatorial sobre a etiopatogenia da escoliose idiopática	31
Figura 10: Polimorfismo de um único nucleotídeo	34
Figura 11: Vias de sinalização da leptina no metabolismo ósseo	36
Figura 12: Radiografia panorâmica de coluna vertebral	46
Figura 13: Avaliação da maturidade esquelética pelo método de Risser	47
Figura 14: Exemplos de radiografias panorâmicas da coluna pósterio-anterior	48
Figura 15: Análise do polimorfismo <i>LEP</i> rs2167270	51
Figura 16: Análise do polimorfismo <i>LEPR</i> rs2767485	52
Figura 17: Radiografias de pacientes com maturidade esquelética	57
Figura 18: Radiografias de pacientes com Cobb $\geq 45^\circ$	57
Figura 19: Distribuição de frequência dos polimorfismos nos casos e nos controles	60
Figura 20: Distribuição de frequência dos polimorfismos no controle, de acordo com IMC	67
Figura 21: Hipótese sobre a influência do polimorfismo <i>LEPR</i> rs2767485 na escoliose	69

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Características das escolioses idiopáticas e não idiopáticas	21
Tabela 2: Informações dos polimorfismos e dos ensaios TaqMan para genotipagem	50
Tabela 3: Características dos pacientes com escoliose idiopática do adolescente	56
Tabela 4: Comparação dos dados demográficos entre os casos e os controles	58
Tabela 5: Associação do polimorfismo <i>LEP</i> rs2167270 com a escoliose	62
Tabela 6: Análise de associação do polimorfismo <i>LEPR</i> rs2767485 com a escoliose	63
Tabela 7: Análise de associação dos genótipos combinados com a escoliose	65
Tabela 8: Análise de associação dos polimorfismos com o IMC na escoliose	68

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Atualmente, o termo escoliose idiopática, segundo a Sociedade de Pesquisa em Escoliose (*Scoliosis Research Society - SRS*), é definido para as curvas laterais sem etiologia conhecida cuja medida determinada pelo método de Cobb em radiografias panorâmicas simples de coluna vertebral em anteroposterior (AP) ortostática for superior a 10° (NEGRINI et al., 2018).

A escoliose idiopática do adolescente (EIA) afeta aproximadamente 3% dos adolescentes e o sexo feminino apresenta o maior risco de progressão (CHENG et al., 2015; FADZAN; BETTANY-SALTIKOV, 2017; KONIECZNY; SENYURT; KRAUSPE, 2013). O diagnóstico da EIA é feito por exclusão de doença de base, associado a uma radiografia panorâmica de coluna e exame clínico, existindo diversos tipos (fenótipos) de curva, variando de acordo com a localização da vértebra apical e pela medida do ângulo de Cobb (LINKER, 2012; LANGENSIEPEN et al., 2013; GSTOETTNER et al., 2007; WANG et al., 2018).

As características antropométricas dos pacientes portadores de EIA são elevada estatura, índice de massa corporal (IMC) baixo e baixa densidade óssea (CLARK et al., 2014; WATANABE et al., 2020). A etiologia da escoliose permanece desconhecida, contudo, discute-se amplamente na literatura a influência e a interação de fatores hormonais, biomecânicos, genéticos e ambientais para tentar explicar o desenvolvimento e progressão da doença (BURWELL et al., 2016a; DE AZEVEDO et al., 2022; FADZAN; BETTANY-SALTIKOV, 2017a; MARYA et al., 2022; PEDROSA et al., 2022).

A associação do sistema endócrino hormonal e o desenvolvimento da EIA tem sido interesse de pesquisa atual, e durante a adolescência, os níveis de vários hormônios que regulam o crescimento e o desenvolvimento do corpo estão em constante transformação (LIANG et al., 2021). A teoria metabólica se baseia no baixo peso encontrado no início da puberdade, que leva a

diminuição da células gordurosas produtoras da leptina, hormônio fundamental para formação e absorção óssea e para regular o apetite e gasto energético (MATUSIK et al., 2020; WANG et al., 2020). Além disso, meninas com EIA apresentam uma baixa taxa de leptina sanguínea e maior nível de receptor solúvel da leptina (sOB-R), quando comparados com grupo controle, sugerindo que existe uma biodisponibilidade anormal da leptina nesses pacientes (LIU et al., 2012). O nível alterado da concentração ou deficiência do principal receptor da leptina (sOB-R) pode causar desequilíbrio de crescimento ósseo, alterando o metabolismo ósseo pela via de sinalização central e periférica (REID; BALDOCK; CORNISH, 2018).

A história familiar de pacientes com EIA é considerada um fator de risco para o desenvolvimento e progressão de EIA (WARD et al., 2010). Os estudos de associação que avaliam amplamente todo o genoma (GWAS) e que fazem o mapeamento genético de indivíduos, já identificaram variantes (polimorfismos) em genes associados a suscetibilidade genética à EIA (SHARMA et al., 2011). O polimorfismo genético é caracterizado pela substituição, deleção ou inserção de nucleotídeos na fita de DNA. Quando ocorre a troca de um único nucleotídeo é denominado SNP (*single nucleotide polymorphism*). Nosso grupo tem se dedicado à busca de polimorfismos genéticos, que possam estar associados ao risco de desenvolvimento e progressão da EIA (DE AZEVEDO et al., 2022; PEDROSA et al., 2022), com intuito de entender a etiologia da doença e contribuir para identificação de um biomarcador genético que possa permitir o acompanhamento de indivíduos em risco, evitando consultas e exames radiográficos frequentes, altos custos com o tratamento e má qualidade de vida desses pacientes. A escolha de um polimorfismo candidato, se baseia no impacto do polimorfismo na expressão ou função da proteína codificada pelo respectivo gene, além da alta frequência na população alvo.

A leptina e seu receptor principal receptor (sOB-R) são codificados pelos genes *LEP* e *LEPR*, localizados no cromossomo 7(7q32.1) e 1(1p31.3), respectivamente. Ambos os genes

são polimórficos, e os SNPs podem afetar a função e expressão da leptina e seu receptor, e consequentemente a suscetibilidade da EIA (LIANG et al., 2012; LIU et al., 2015; MÓROCZ et al., 2011; NIKOLOVA et al., 2015). Depois de avaliar 6 SNPs do gene *LEPR* (rs1137101, rs1137100, rs4655555, rs2767485, rs1751492 e rs8179183) em 1.140 indivíduos chineses, apenas o SNP *LEPR* rs2767485 foi associado à ocorrência da EIA, sugerindo que o nível de expressão anormal do receptor de leptina desempenha um papel patogênico no crescimento esquelético assimétrico em pacientes com escoliose (LIU et al., 2015). O SNP rs2167270, localizado na região 5' não traduzida (5'-UTR) no gene *LEP*, altera o nível sérico de leptina e tem sido estudado como um fator de risco no desenvolvimento de várias doenças, incluindo obesidade e degeneração do disco intervertebral (CHEN et al., 2022).

A relação entre níveis de leptina, IMC e fatores genéticos que possam explicar a etiologia da EIA ainda é controversa. Polimorfismos nos genes *LEP* e *LEPR* podem alterar esta via de sinalização, induzir a biodisponibilidade anormal da leptina, alterar a remodelação óssea e apoiar as teorias precursoras da etiologia da EIA. Além disso, até este momento, não haviam estudos na literatura que tenham avaliado o efeito combinado de ambos os SNPs (*LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485) com a ocorrência de EIA. Nesse contexto, torna-se relevante investigar a etiologia das escolioses idiopáticas na população brasileira, com o intuito de formular políticas de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. Fundamentação teórica

2.1 Anatomia da coluna vertebral

A coluna vertebral faz parte do esqueleto axial, correspondendo ao conjunto de sete vértebras cervicais, doze torácicas, cinco lombares e cinco vértebras sacrais. Uma vértebra típica é composta por um corpo vertebral, dois processos transversos, dois pedículos e duas lâminas, sendo que estas estruturas ósseas formam o canal vertebral, que protege a medula espinhal e seus nervos. Além disso, as vértebras apresentam um processo espinhoso, que corresponde a porção óssea mais proeminente da coluna. As vértebras típicas possuem dois pares de processos articulares superiores e dois pares de processos articulares inferiores, que permitem a mobilidade segmentar da coluna vertebral (**Figura 1**). O disco intervertebral é uma estrutura cartilágnea, que une os corpos vertebrais adjacentes a partir de C2, que tem como função amortecer as cargas axiais (CRAMER, 2017).

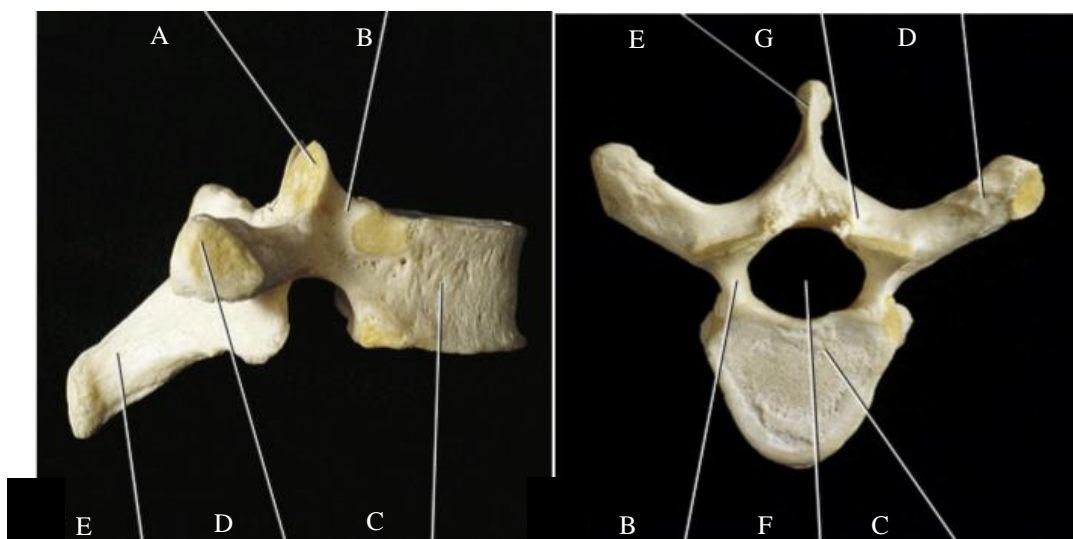


Figura 1: Vértebra da coluna vertebral em um corte sagital (figura da esquerda) e em um corte axial (figura à direita). As estruturas indicadas na vértebra são: processos articulares superiores (a), pedículo vertebral (b), corpo vertebral (c), processo transversos (d), processo espinhoso (e), canal vertebral (f) e lâmina (g) (adaptado de Cramer, 2017).

No plano sagital, em condição fisiológica, a coluna vertebral apresenta duas curvas primárias, que estão presentes desde o período fetal. Estas duas curvas são a cifose torácica e a cifose sacral, assim como as curvas secundárias que se desenvolvem conforme a criança adquire a posição ereta, que constituem as curvas da lordose cervical e lombar (**Figura 2**). A harmonia entre estas curvas no plano sagital permite o alinhamento vertical fisiológico entre a cabeça, o tronco e a pelve, sendo fundamental para o funcionamento biomecânico da coluna vertebral. No eixo coronal da coluna vertebral não existe nenhuma curva fisiológica e, qualquer desvio neste plano, constitui a base anatômica da escoliose (CRAMER, 2017).

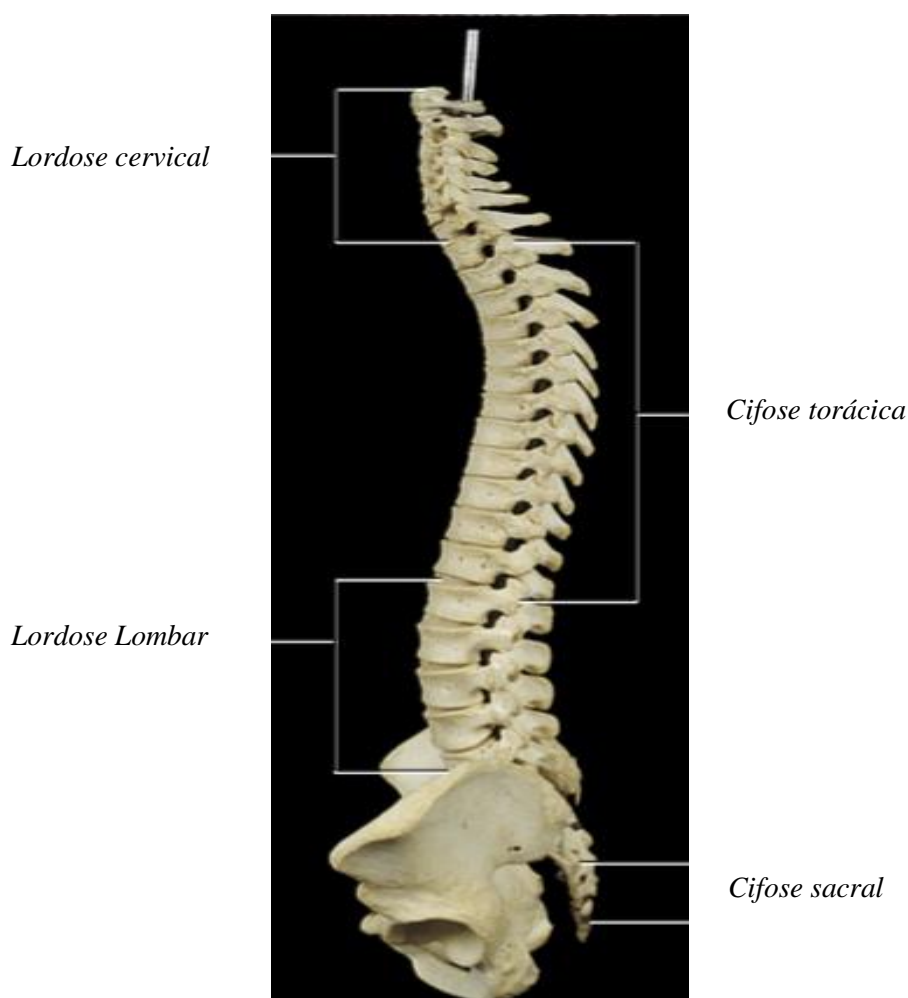


Figura 2: Anatomia e curvas fisiológicas da coluna vertebral. Indicação das curvas: cifose torácica, lordose lombar e cifose sacral (Adaptado de CRAMER, 2017).

2.2 Escoliose: histórico e fisiopatologia

As curvas fisiológicas e o termo escoliose são originárias da língua grega, inicialmente descritos na Grécia antiga. Em seu tratado, Hipócrates, considerado o pai da deformidade da coluna, classificou em cinco grupos as patologias da coluna, utilizando a palavra escoliose para descrever todos os tipos de deformidade da coluna, incluindo a forma traumática com luxação. A descrição da deformidade da escoliose, nos termos contemporâneos da patologia, foi descrita por seu discípulo Galeno. Além disso, ambos os médicos gregos desenvolveram métodos de tratamento conservador da escoliose (VASILIADIS et al., 2009).

A escoliose pode ser classificada como não estrutural (secundária) ou estrutural (primária). A escoliose estrutural é uma deformidade tridimensional da coluna vertebral, incluindo o plano coronal, plano sagital e axial, sendo que a aparência clínica se deve a curva lateral no plano coronal e a giba costal formada pela rotação axial das costelas. A escoliose classificada não estrutural é uma curva secundária à uma discrepância de comprimento de membros, inclinação pélvica ou antálgica (EL-HAWARY e CHUKWUNYERENWA, 2014).

As estruturas anatômicas vertebrais são modificadas na coluna vertebral com a escoliose e as alterações são associadas ao grau de deformidade, sendo mais observada na vértebra apical (**Figura 3**). O corpo vertebral sofre rotação no plano axial em direção à convexidade da curva e o processo transversal roda para o lado da concavidade. O corpo vertebral adquire forma de cunha, sendo a altura do corpo menor na concavidade e maior na convexidade. O canal vertebral também fica distorcido na escoliose, acompanhando um pedículo mais curto e fino no lado da concavidade. Estas alterações da anatomia resultam do crescimento assimétrico da coluna vertebral (LILJENQVIST et al., 2000; HERRING, 2013).

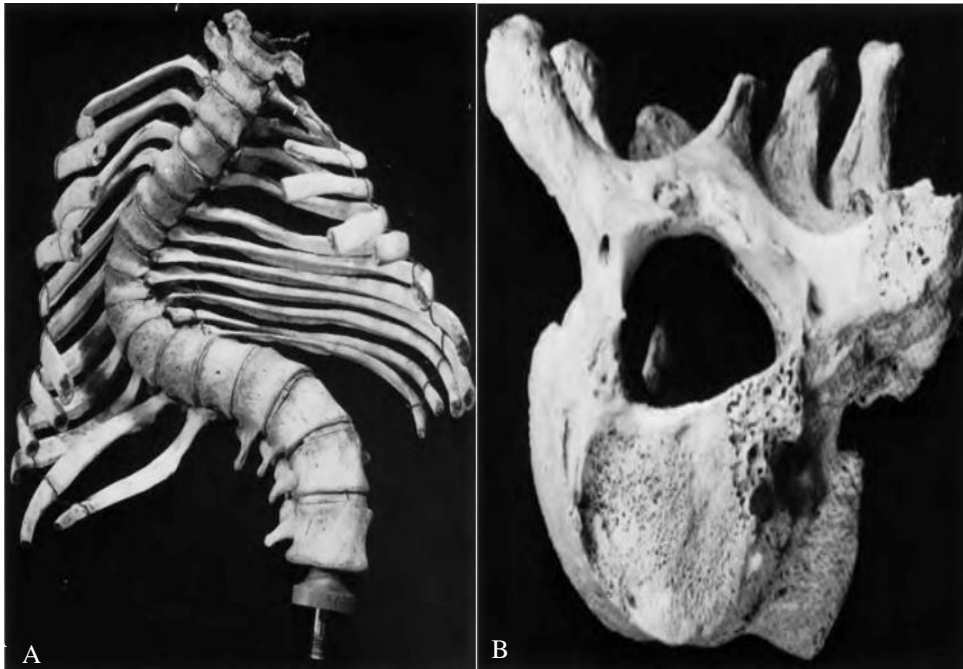


Figura 3: Peças anatômicas de coluna com escoliose. (A) Escoliose torácica grave a direita, com alterações do corpo vertebral (forma trapezoidal) e rotação tridimensional. (B) Corte axial da vértebra com pedículo mais fino e mais curto do lado côncavo da curva (Adaptado de HERRING, 2013).

Constituem os dois maiores grupos de escoliose as formas idiopáticas, consideradas como diagnóstico de exclusão e as formas não idiopáticas, como a escoliose congênita, que tem como causa uma malformação da vértebra no período embrionário; as escolioses sindrômicas, relacionadas com doenças do tecido conectivo, como a síndrome de Marfan; e as escolioses neuromusculares, causadas por desequilíbrio muscular paravertebral secundário à doenças como paralisia cerebral, poliomielite e atrofia muscular espinhal. As características das escolioses idiopáticas e não idiopáticas estão descritas na **Tabela 1** (EL-HAWARY e CHUKWUNYERENWA, 2014). A escoliose idiopática também é classificada pela idade do surgimento, sendo o tipo infantil originado entre 0 a 3 anos, o juvenil de 3 a 10 anos e o tipo adolescente de 11 a 18 anos e do adulto a partir de 18 anos (NEGRINI et al., 2018).

Tabela 1: Características das escolioses idiopáticas e não idiopáticas.

Idiopáticas	Não idiopáticas
Infantil (0-3 anos)	Neuromuscular (neuropáticas e miopáticas)
Juvenil (4-10 anos)	Mesenquimais (Síndrome de Marfan, Mucopolissacaridoses)
Adolescente (11-18 anos)	Congênita (Defeito de formação ou de segmentação e mista)
Adulto (mais 18 anos)	Miscelânea (Neurofibromatose, Tecido conectivo, Osteocondrodistrofias, Metabólico)

Adaptado de EL-HAWARY e CHUKWUNYERENWA (2014).

2.3 Epidemiologia da escoliose idiopática

Atualmente, o termo escoliose idiopática, segundo a Sociedade de Pesquisa em Escoliose (*Scoliosis Research Society - SRS*), é definido para as curvas laterais sem etiologia conhecida cuja medida determinada pelo método de Cobb em radiografias panorâmicas simples de coluna vertebral em anteroposterior (AP) em ortostatismo for superior a 10° (NEGRINI et al., 2018). Utilizando como critério o método de Cobb, a prevalência da escoliose apresentou variação entre 0,5 a 5,2% e foi mais frequente no gênero feminino (1,4- 2:1 homem) (KONIECZNY et al., 2013). Nas curvas com valor superior a 40° pelo método de Cobb a prevalência da escoliose diminui para 0,1% mas permanece prevalente no gênero feminino (7,2:1 homem) (ROGALA et al., 1978; KONIECZNY et al., 2013).

Considerando as escolioses idiopáticas, o tipo infantil apresenta uma prevalência de 1%, e a juvenil varia entre 10 a 15%. A forma idiopática do adolescente é o tipo mais comum, responsável por 90% dos casos de escoliose. Neste grupo de pacientes a progressão da curva depende de diversos fatores como idade esquelética, gênero, magnitude e tipo da(s) curva(s) (EL-HAWARY e CHUKWUNYERENWA, 2014). Em relação ao gênero, observa-se que o risco de deformidade progressiva da coluna é cinco vezes maior nas mulheres (KAROL et al., 1993).

2.4 Diagnóstico da escoliose

O paciente com escoliose geralmente não apresenta muitas queixas associadas a deformidade, sendo que 23 à 85% possui algum grau de dor nas costas (THÉROUX et al., 2017). O diagnóstico de escoliose estrutural é feito pelo exame físico para excluir as causas específicas para escoliose, sendo que a escoliose idiopática do adolescente é um diagnóstico de exclusão. Ao exame físico de inspeção é importante identificar a presença de manchas na pele, tufo piloso, que são sinais de escoliose que podem estar associados com patologias específicas. Além disso, percebe-se assimetria dos ombros e perda do triângulo de talhe (**Figura 4A**). O teste de Adams, que é uma manobra simples realizada para identificar deformidades estruturais da coluna, faz parte da investigação durante o exame físico (**Figura 4B**). Os pacientes deambuladores ao realizarem a flexão ativa do tronco, mantendo os joelhos esticados, apresentam giba que resulta da rotação vertebral para o lado da convexidade (LINKER, 2012).



Figura 4: Exemplo de paciente com escoliose. Foto de paciente com 16 anos, do gênero feminino, com assimetria dos ombros. **(A)** Descompensação do tronco e ausência do triângulo de Talhe. **(B)** Postura para o teste de Adams, ilustrando a presença de escoliose devido a presença da giba costal a direita (Arquivo pessoal).

O método de imagem mais comum no diagnóstico da escoliose idiopática é a radiografia panorâmica da coluna vertebral em anteroposterior e perfil ortostática, incluindo a coluna cervical e a pelve, com visualização das cabeças femorais. Este exame é realizado utilizando um cassete radiográfico (14 x 36 polegadas) ou radiografias por programas digitais. Pela realização deste exame é possível medir o grau da curva, o acompanhamento da progressão de sua magnitude, a maturidade esquelética, classificar o tipo de curva e o grau de correção do tratamento nos planos coronal e sagital (GSTOETTNER et al., 2007; WANG et al., 2018).

O método descrito por Cobb é universalmente utilizado para medir o grau da curva. O ângulo de Cobb é calculado após a identificação das vértebras das extremidades da curva, traçando duas linhas perpendiculares ao platô superior destas vértebras e medindo o ângulo formado pelo cruzamento destas duas linhas (**Figura 5**). Este ângulo é medido em todas as curvas coronais e sagitais e, mesmo para curvas fisiológicas sagitais, o método de Cobb é indicado (PRUIJS et al., 1994; LANGENSIEPEN et al., 2013).

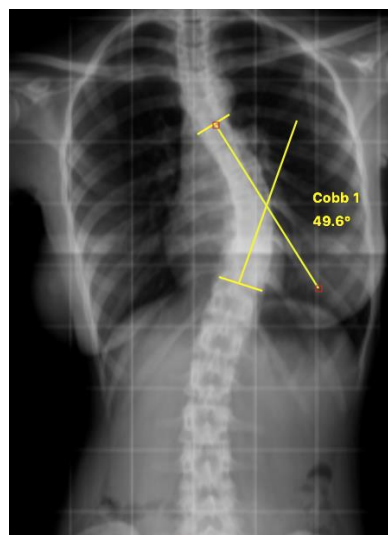


Figura 5: Radiografia panorâmica de coluna vertebral em anteroposterior e em ortostatismo para definição do ângulo de Cobb. Após a identificação das vértebras das extremidades da curva são traçadas duas linhas perpendiculares ao platô superior dessas duas vértebras. O ângulo formado pelo encontro das duas linhas é o Ângulo de Cobb (49,6° no exemplo) (Imagem gerada pelo Software Surgimap, arquivo pessoal).

Outro parâmetro a ser incluído na avaliação clínica da escoliose é a medida da flexibilidade da curva (teste de flexibilidade da curva). Já foram descritos diversos métodos para esta avaliação, tais como radiografia em tração e radiografia com inclinação lateral com fulcro (LIU et al., 2010). As radiografias de inclinação lateral são realizadas com o paciente em posição supina, fazendo esforço máximo de inclinação lateral da curva durante a realização da radiografia. Este teste de inclinação lateral é essencial para a classificação das curvas estrutural e não estrutural (PUNO et al. 2003).

Para a avaliação da maturidade esquelética, parâmetro radiográfico que avalia o risco de progressão da curva da escoliose, são utilizados os centros de ossificação da mão, da apófise do osso ilíaco e a cartilagem trirradiada. O método descrito por RISSER consiste na avaliação gradual, de antero-lateral para pósterio-lateral da ossificação da apófise da crista ilíaca (RISSER, 2010) (**Figura 6**). O método estabelece cinco estágios: zero quando não há ossificação; estágio 1, quando a ossificação atinge 25% do quadrante lateral da apófise ilíaca; estágio 2, a ossificação atinge 50% da crista ilíaca; estágio 3, a ossificação atinge 75% da crista ilíaca; estágio 4, quando 100% da crista ilíaca é coberta pela ossificação e estágio 5, quando há fusão completa da apófise ao osso ilíaco (RISSER, 1958; RISSER, 2010).

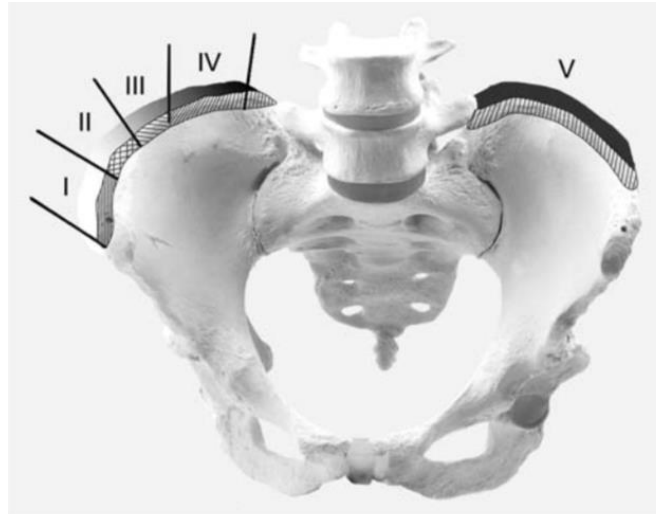


Figura 6: Método de Risser para avaliação da maturidade esquelética. Utiliza-se o percentual de ossificação da linha da apófise de crescimento em relação à superfície do osso íliaco para definir os graus de zero a cinco (THALER et al., 2008).

Outro parâmetro utilizado na avaliação da maturidade esquelética é a presença da cartilagem trirradiada, que consiste na cartilagem que forma o acetábulo, é formada pela intersecção dos ossos íliaco, púbico e ísquio e pode ser visualizada nas radiografias panorâmicas de coluna (**Figura 7**). Embora não possa ser graduada quanto ao padrão de ossificação, a cartilagem trirradiada aberta é um sinal fidedigno do estado pré-puberal (THALER et al 2008).

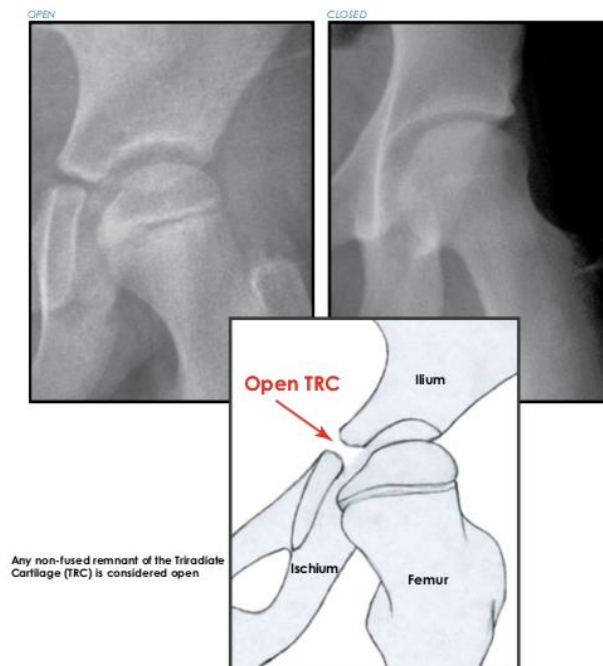


Figura 7: Avaliação da maturidade esquelética em radiografia do quadril em anteroposterior. A imagem da esquerda refere-se a cartilagem aberta e da direita a fechada. O esquema ilustra a cartilagem trirradiada formada pela intersecção dos ossos íliaco, púbico e ísquio (O'BRIEN et al., 2008).

Uma das classificações mais aceitas para escoliose idiopática é a proposta por Lenke, que define seis tipos de curvas no plano coronal, sendo de 1 a 6 três modificadores lombares, descritos com A, B e C; e três modificadores sagitais, segundo o ângulo de cifose torácica medida de T5-T12, descrito pelos sinais positivo (+), quando a cifose é maior que 40° e negativo (-) quando é menor do que 10° e normal (N), quando a cifose está entre 11° a 40° (LENKE et al., 2001). A curva também é classificada segundo a localização em torácica proximal (TP), torácica principal (MT) e tóraco-lombar / lombar TL/L) e ainda em estrutural ou não estrutural. A maior curva sempre é considerada estrutural, mesmo sendo flexível (LENKE et al., 2001) (**Figura 8**).



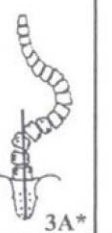



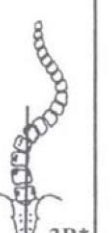



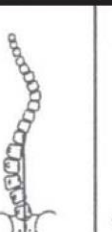

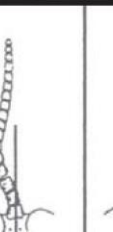



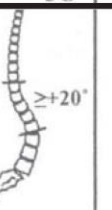
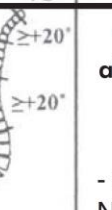
CURVA TIPO (1-6)						
Modificador lombar	Tipo 1 (torácica principal)	Tipo 2 (dupla torácica)	Tipo 3 (dupla principal)	Tipo 4 (tripla principal)	Tipo 5 (TL/L)	Tipo 6 (TL/L-TP)
A (nenhuma ou mínima curva)	 1A*	 2A*	 3A*	 4A*		
B (curva moderada)	 1B*	 2B*	 3B*	 4B*		
C (curva grande)	 1C*	 2C*	 3C*	 4C*	 5C*	 6C*
CrITÉRIOS estruturais sagitais possíveis para determinação do tipo de curva	 Normal	 $\geq +20^\circ$ Cifose torácica proximal	 $\geq +20^\circ$ Cifose toracolumbar	 $\geq +20^\circ$ $\geq +20^\circ$ Cifose TP + TL	* Modificador do alinhamento sagital T%-T12 - : $< 10^\circ$ N : 10 - 40° + : $> 40^\circ$	

Figura 8: Diagrama da classificação de Lenke para escoliose. Os seis tipos de curvas são definidos pelos modificadores lombar e pelos critérios estruturais sagitais. TL: toracolumbar; L: lombar; TP: torácica proximal (RISSO-NETO et al., 2006).

Os critérios de Lenke para uma curva ser considerada estruturada são definidos em radiografias com inclinação lateral em supino e em radiografia panorâmica da coluna em perfil. As radiografias de inclinação lateral em supino são fundamentais na classificação de Lenke, pois se o ângulo de Cobb permanece superior a 25° no teste de inclinação a curva é considerada estruturada.

Nas radiografias panorâmicas em perfil as curvas com cifose regional superior a 20° (medidas no segmento T2-T5 para curva TP e no segmento T10-L2 para curvas TL/L), são consideradas estruturais (LENKE et al., 2001).

A escoliose Lenke tipo 1 é a mais frequente nos pacientes com escoliose cirúrgica, seguida pelo tipo 2. Um estudo multicêntrico retrospectivo envolvendo cinco centros de escoliose no Estados Unidos avaliou 606 pacientes e diagnosticou escoliose Lenke tipo 1 e 2 respectivamente em 51% e 20% dos pacientes (LENKE et al., 2002).

2.5 Tratamento da escoliose

O tratamento conservador da escoliose é realizado desde do tempo de Hipócrates com utilização de métodos de tração axial e três pontos de correção em cordas utilizando escadas mesa e assentos (VASILIADIS; GRIVAS; KASPIRIS, 2009).

A utilização de colete no tratamento da EIA é considerada quando o ângulo de Cobb é superior a 20° e quando a curva apresenta de progressão superior 5° do ângulo de Cobb entre os exames radiográficos de subsequentes (AGABEGI et al., 2015). A órtese deve ter seu uso por no mínimo 16 horas por dia, com duração de 2 a 5 anos até final do crescimento ósseo, sendo difícil adesão entre os adolescentes devido impacto psicossocial em adolescentes (KONIECZNY; HIERONYMUS; KRAUSPE, 2017). A utilização do colete no tratamento da EIA tem como o maior objetivo impedir a progressão da curva (WEINSTEIN et al., 2008). Em alguns casos pode existir progressão mesmo com uso regular do colete, sendo associada a diversos fatores de risco, incluindo histórico familiar (CHEUNG et al., 2020; HAWARY et al., 2019; LANDAUER; TRIEB, 2022).

O tratamento cirúrgico pela técnica de artrodese vertebral está indicado para as curvas torácicas >50° e para as curvas lombares >40°, mesmo após a maturidade esquelética (AGABEGI et al., 2015).

Em 1911, Russell Hibbs foi pioneiro na utilização da fusão óssea, através da artrodese da coluna vertebral. A técnica se baseava na utilizando de tração no pré-operatório-e uso de coletes no pós-operatório, que resultavam na interrupção da progressão da deformidade após a fusão óssea. Porém, pela falta de técnicas de fixação da coluna vertebral, as taxas de pseudartrose variavam de 29 a 39% (HIBBS, 2007; KOSTUIK, 2015).

A introdução de novas técnicas de fusão como a artrodese interfacetária preconizada por John Moe, acarretou na diminuição dos índices de pseudartrose após a correção das deformidades. Este autor foi o primeiro a se preocupar com a escolha da última vértebra a ser incluída na área de artrodese, utilizando a vértebra neutra sem rotação como critério de escolha (MOE, 1958).

O surgimento da fixação interna após a artrodese vertebral, reduziu drasticamente a perda de correção da escoliose e as taxas de pseudoartrose (HARRINGTON, 1962). A referência para definir o último nível de instrumentação era a vértebra que se encontrava na zona estável descrita por Harrington (TAMBORNINO et al., 1964; DICKSON et al., 1990). A incapacidade do instrumental de Harrington em preservar a lordose lombar fisiológica gerou a necessidade de evolução do instrumental. Assim, o instrumental conhecido como de terceira geração formado por ganchos e parafusos que permitia a fixação por segmento vertebral e a preservação da lordose fisiológica foi popularizado na década dos anos 80 (RICHARDS, 1992; DESAI et al. 2013).

2.6 Etiopatogenia da escoliose

Apesar da etiologia da escoliose idiopática ser ainda desconhecida, existem algumas teorias que tentam explicar o surgimento da doença, como a disfunção do sistema nervoso, as alterações biomecânicas, a alteração do crescimento ósseo, os erros metabólicos e as alterações genéticas. Atualmente, o conceito da cascata multifatorial é o mais aceito para tentar explicar a etiopatogenia da escoliose idiopática (**Figura 9**) (BURWELL et al., 2016)

As alterações neurológicas observadas nos adolescentes com escoliose idiopática envolvem o sistema visual de percepção, o sistema vestibular, proprioceptivo e de controle postural, o envolvimento do tronco cerebral incluindo a integração dos hemisférios cerebrais e o corpo caloso. A espessura do córtex cerebral avaliada por ressonância magnética difere nos pacientes com escoliose idiopática do adolescente e indivíduos sem escoliose. Contudo, existem dúvidas na literatura se estas alterações são primárias ou secundárias à deformidade da coluna (WANG et al., 2012).

Os pacientes com escoliose idiopática do adolescente possuem razão reduzida de comprimento da medula espinhal em relação ao crescimento do corpo vertebral. Esta alteração resulta em uma medula ancorada funcional, que reforça a teoria do assincronismo do crescimento neuro-ósseo (CHU et al., 2008). Outro achado neurológico nesses pacientes é a assimetria entre o sistema vestibular direito e esquerdo e a conexão anormal entre os canais semi-circulares do ouvido interno (CHENG et al., 2015b).

A teoria mecanicista explicada pela lei de Huert-Volkman define que a maior força de compressão retarda o crescimento no lado côncavo da curvatura e a sua diminuição aumenta o crescimento do lado convexo. Este ciclo vicioso descrito por Stokes resulta em uma vértebra em cunha identificada principalmente no ápice da curva (FADZAN e BETTANY-SALTIKOV, 2017).

A teoria metabólica considera que alteração na fisiologia dos hormônios relacionados com crescimento e desenvolvimento musculoesquelético seja a base da cascata multifatorial da etiopatogenia da EIA, estudos prospectivos que mostram associação entre a diminuição da massa corporal magra e de gordura e o maior risco de desenvolvimento de escoliose (CLARK et al., 2014). Dentre os hormônios envolvidos no etiopatogenia da EIA destaca-se a leptina (BALDOCK et al., 2006; LIU et al., 2012; MATUSIK et al., 2020).

A teoria biomecânica foi descrita a partir do estudo das forças biomecânicas que agem durante a fase de crescimento da coluna vertebral, obedecendo a força gravitacional. Na postura

bípede dos humanos, a posição sagital do corpo vertebral determina a força de cisalhamento posterior que, por sua vez, reduz a estabilidade rotacional da vértebra. Durante o desenvolvimento normal da coluna vertebral existe uma força de conversão rotacional da esquerda para direita. Esta rotação preexistente pode ter sua magnitude influenciada pela posição da coluna em relação à força de gravidade. Nas meninas é observada uma área da coluna mais inclinada posteriormente mais instável pela ação da gravidade e que constitui fator adicional para explicar o acometimento maior da escoliose em meninas (DICKSON et al., 1994; BURWELL et al., 2016).

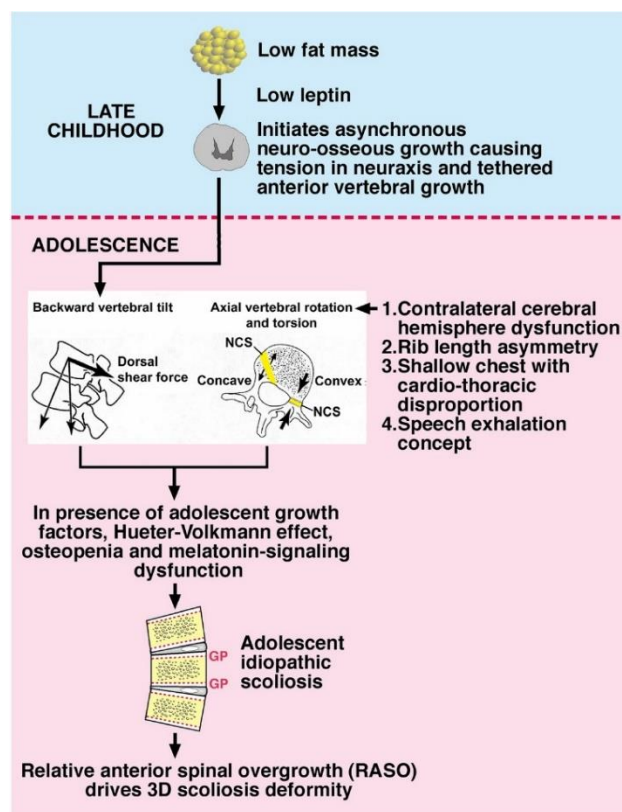


Figura 9: Cascata multifatorial sobre a etiopatogenia da escoliose idiopática. O início da deformidade ocorre na pré-adolescência, na presença de uma baixa massa corporal de gordura, acarretando na redução dos níveis de leptina (teoria metabólica). Durante a adolescência, há uma alteração biomecânica, impactando na lordotização do ápice com uma força de cisalhamento, provocando uma rotação vertebral (teoria biomecânica). Os efeitos metabólicos como osteopenia e disfunção do estímulo da melatonina provocam crescimento assimétrico anterior (RASO - *relative anterior spinal overgrowth*) (Adaptado de BURWELL et al., 2016).

Por fim, a teoria genética foi descrita por Garland, em 1934, que descreveu em uma mesma família a presença de escoliose ao longo de cinco gerações (GRAUERS et al., 2016). Em 1973, Wynne-Davis evidenciou prevalência significativamente maior de escoliose, quando comparada a população geral, entre as famílias que apresentavam um parente de primeiro grau afetado com a doença (7%), reduzindo para 3,9% em famílias que apresentavam um parente de segundo grau com escoliose e 1,5% em famílias com parentes de terceiro grau afetados (WYNNE-DAVIES, 1973).

2.7 Escoliose idiopática e genética

A herança genética da escoliose descrita anteriormente foi confirmada, em 2010, por Ward e colaboradores, confirmando a importância dos fatores hereditários no desenvolvimento da doença, já que parentes de indivíduos com escoliose idiopática apresentaram maior prevalência da doença do que a população em geral (WARD et al., 2010). Foram avaliadas 69 famílias americanas, com histórico de escoliose idiopática do adolescente, após avaliar quatro gerações, confirmou o diagnóstico da doença em 247 indivíduos. Além disso, estimou um risco para o desenvolvimento da escoliose de até 29% quando o indivíduo possui pelo menos um dos genitores afetados, assumindo um padrão de herança autossômica dominante. O risco de desenvolvimento da escoliose diminui à medida que o parentesco se torna mais distante. Contudo, o menor risco de recorrência calculado, para parentes de terceiro grau, foi de 9%, muito acima do risco da população geral. Além disso, foi sugerido que a localização da curva escoliótica significativamente associada à hereditariedade genética, independentemente da gravidade ou do padrão de curva da coluna (WARD et al., 2010).

Além disso, estudos anteriores envolvendo gêmeos com escoliose idiopática relataram maior frequência da doença entre gêmeos monozigóticos comparados aos dizigóticos (KESLING e REINKER, 1997; INOUE et al., 1998; ANDERSEN et al., 2007). Os estudos realizados com gêmeos são extremamente importantes para determinar os fatores hereditários e ambientais

envolvidos com o desenvolvimento de doenças já que os gêmeos monozigóticos compartilham 100% do genoma (ANDERSEN et al., 2007). Em 2012, Grauers e colaboradores estimaram a hereditariedade da escoliose entre 64.578 gêmeos suecos, e descreveram que 38% do risco de desenvolver escoliose é em função de fatores genéticos e 62% devido a fatores ambientais (GRAUERS et al., 2012).

Os estudos de associação que avaliam amplamente todo o genoma (GWAS - *genome-wide association study*) e que fazem o mapeamento genético de indivíduos, constituem uma ferramenta altamente relevante para identificar regiões do genoma e processos biológicos associados as doenças (ALTSHULER et al., 2008). Estudo de GWAS já identificaram variantes em genes associados com hormônios, a musculatura, cartilagem, osso, discos intervertebrais e com o tecido conjuntivo associados com a suscetibilidade a EIA (SUN et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2011; SHARMA et al., 2011; KOU et al., 2013; BUCHAN et al., 2014; OGURA et al., 2015; SHARMA et al., 2015; ZHAO et al., 2015; ZHU et al., 2015; OGURA et al., 2016; ZHU et al., 2017; KHANSHOUR et al., 2018; KOU et al., 2019).

Estudos analíticos do tipo caso controle também são amplamente realizados com intuito de identificar polimorfismos genéticos que possam estar associados com a etiologia da EIA (MÓROCZ et al., 2011; LIANG et al., 2012; GORMAN et al., 2012; LIU et al., 2015; NIKOLOVA et al., 2015; GRAUERS et al., 2016; SOBHAN et al., 2019; DE AZEVEDO et al., 2022; PEDROSA et al., 2022; WANG et al., 2022). O polimorfismo genético é caracterizado pela substituição, deleção ou inserção de nucleotídeos na fita de DNA. Quando ocorre a troca de um único nucleotídeo é denominado SNP (*single nucleotide polymorphism*). Um alelo é considerado um polimorfismo quando ocorre em mais de 1% da população e o alelo mais frequente é considerado selvagem (**Figura 10**). As combinações possíveis de dois alelos que caracterizam um SNP podem formar três possibilidades de genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto variante), que podem

ou não diferir em fenótipos. As variações alélicas podem resultar em alteração da expressão ou da funcionalidade dos produtos gênicos (ALTSHULER et al., 2008; KARKI et al., 2015).

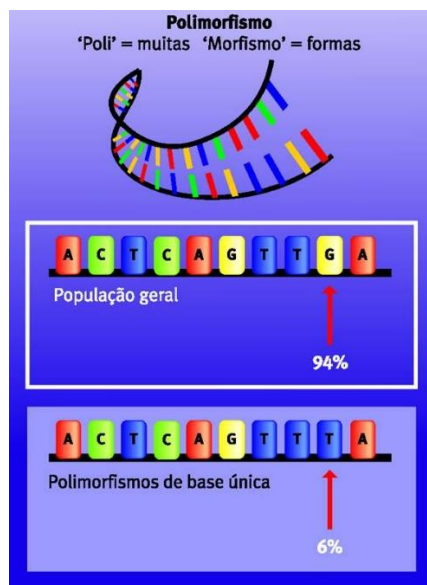


Figura 10: Polimorfismo de um único nucleotídeo. Exemplo da troca do nucleotídeo guanina (G), que ocorre em 94% da população, considerado selvagem, pelo nucleotídeo timina (T), considerado o polimorfismo variante, que ocorre em 6% da população (SUAREZ-KURTZ et al., 2004).

A escolha de um polimorfismo candidato, se baseia no impacto do polimorfismo na expressão ou função da proteína codificada pelo respectivo gene, além da alta frequência na população alvo (GRAUERS et al., 2016). Recentemente, nosso grupo observou a associação de polimorfismos nos genes *FBN1* e no *PAX-1* com a suscetibilidade a EIA na população brasileira (DE AZEVEDO et al., 2022; PEDROSA et al., 2022). O polimorfismo *FBN1* rs12916536 foi associado com o desenvolvimento da EIA em 185 casos de AIS (DE AZEVEDO et al., 2022). A fibrilina-1 (*FBN1*), é uma glicoproteína da matriz extracelular, essencial para a organização das microfibrilas extracelulares, associada com distúrbios do tecido conjuntivo, como é o caso da escoliose (SCHRENK et al. 2018.). Os genótipos *FBN1* rs12916536 GA+AA foram associados a um menor risco de suscetibilidade a EIA na população brasileira (DE AZEVEDO et al., 2022). Por outro lado,

o *PAX-1* (*paired box 1*) é essencial para o desenvolvimento embrionário do esqueleto pelo seu papel na determinação da segmentação da coluna vertebral (RODRIGO et al., 2003). Os polimorfismos rs169311 e rs6137473 do gene *PAX-1* foram associados com o risco aumentado de desenvolvimento da escoliose em 59 casos de EIA com indicação cirúrgica de correção de escoliose (Cobb $\geq 45^\circ$). Além disso, o polimorfismo *PAX-1* rs6137473 foi associado ao modificador lombar B e C, em comparação com A, nos 59 pacientes brasileiros (PEDROSA et al., 2022).

Polimorfismos em genes envolvidos com a via de sinalização da leptina também tem sido estudados para tentar explicar a ocorrência da EIA (SU et al., 2010; LIANG et al., 2012; LIU et al., 2015; MÓROCZ et al., 2011; NIKOLOVA et al., 2015).

2.8 Via de sinalização da leptina e escoliose idiopática

A associação de hormônios endócrinos e o desenvolvimento da EIA tem despertado interesse nas pesquisas atuais, pois na adolescência os níveis de diversos hormônios que regulam o crescimento e o desenvolvimento estão em constante mudança (LIANG et al., 2021). Além disso, a teoria metabólica para explicar o surgimento da escoliose idiopática se baseia em estudos prospectivos que mostram associação entre a diminuição da massa corporal magra e de gordura e maior risco de desenvolvimento da doença (CLARK et al., 2014). Os níveis plasmáticos de leptina tem relação direta com os índices de massa corporal (IMC), com os índices de densidade óssea (BMD) e com os parâmetros de crescimento ósseo (QIU et al., 2007).

O nome leptina se origina da palavra grega “leptos”, que significa magro em português, sendo um hormônio crucial para o fenótipo de obesidade, conforme já bem caracterizado e descrito anteriormente também em modelos animais (ZHANG et al., 1994; REID; BALDOCK; CORNISH, 2018). A leptina é produzida pelas células adiposa, incluindo o tecido adiposo da medula óssea, sendo responsável pelo controle de ingesta alimentar e o equilíbrio da reserva energética do organismo. Sua

ação está relacionada com seus receptores localizados no sistema nervoso central e no sistema musculoesquelético. A leptina originada no tecido adiposo e na medula óssea, se liga ao receptor LEPR (s-OBR), que possui ação direta no metabolismo ósseo. A leptina também atua no eixo hipotálamo-hipófise, ativando o sistema nervoso simpático, promovendo a perda de peso (REID; BALDOCK; CORNISH, 2018). A via de sinalização da leptina nos osteoblastos e condrócitos, influenciando no metabolismo ósseo e na perda de peso, via hipotálamo, é ilustrada na **Figura 11**.

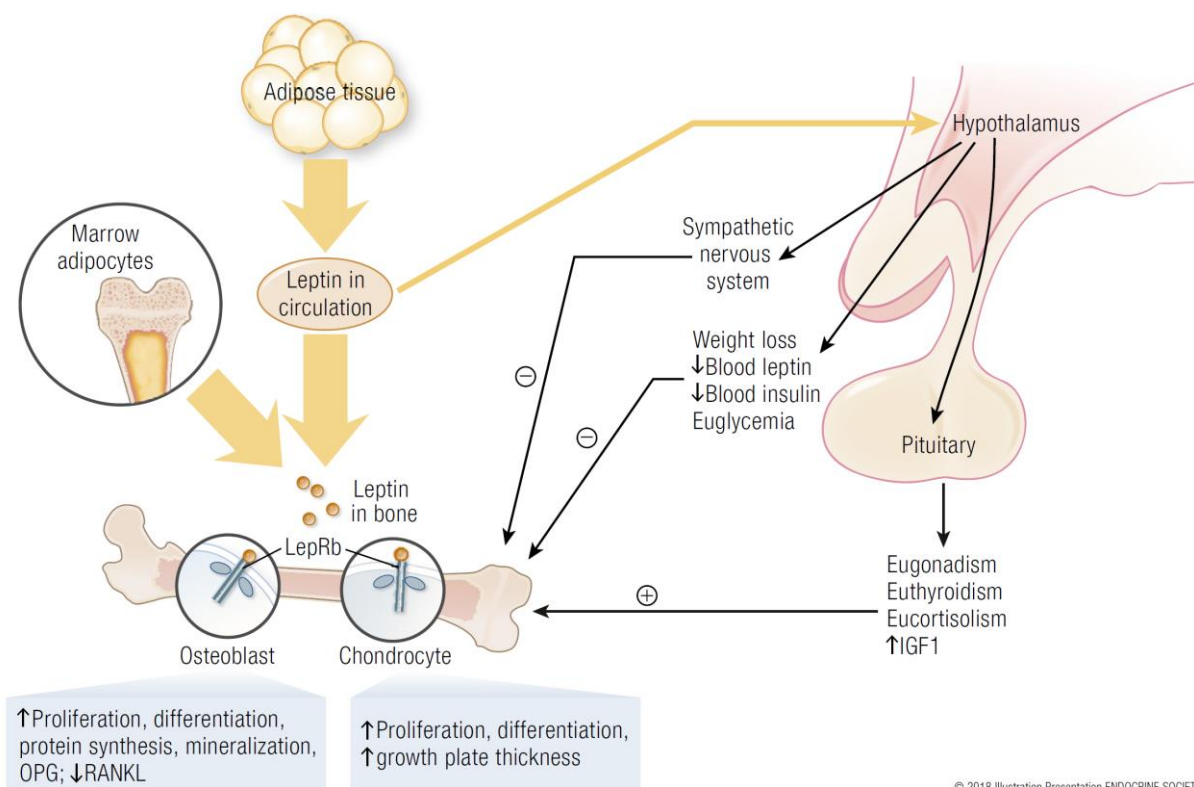


Figura 11: Vias de sinalização da leptina no metabolismo ósseo. A leptina originada no tecido adiposo e na medula óssea, se liga ao receptor LepRb (s-OBR), que possui ação direta no metabolismo ósseo, aumentando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos e condrócitos, além de aumentar a espessura da placa de crescimento ósseo nos condrócitos. Nos osteoblastos ativa a síntese de proteínas, afeta a mineralização óssea, aumenta osteoprotegerina (OPG) e diminui a expressão de ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β (RANKL). A leptina circulante também atua no hipotálamo, ativando o sistema nervoso simpático, influenciando na perda de peso, diminuindo os níveis de leptina e insulina no sangue, além de outros efeitos na glândula pituitária, que aumentam o fator de crescimento IGF1. A largura das setas amarelas indica as concentrações de leptina encontradas nos ossos e no SNC (REID; BALDOCK; CORNISH, 2018).

O nível alterado de leptina ou a deficiência da via de sinalização LEP-LEPR pode resultar em um distúrbio do crescimento esquelético, já que a leptina pode afetar o metabolismo ósseo, tanto por vias centrais quanto periféricas (BALDOCK et al., 2006). Os níveis de leptina e seu receptor estão associados com o maior risco de escoliose e sua progressão (WU et al., 2015; BURWELL et al., 2016). Diversos trabalhos já mostraram que pacientes com EIA apresentam níveis mais baixos de leptina no sangue periférico e níveis mais altos de receptores de leptina solúvel (sOB-R) em comparação aos controles, sugerindo uma biodisponibilidade anormal da leptina na etiologia da EIA (QIU et al., 2007; LIU et al., 2012; WU et al., 2015; BURWELL et al., 2016; MATUSIK et al., 2020; WANG et al., 2020). Um estudo recente de meta-análise, envolvendo 653 casos de EIA e 3456 controles, observou a mesma diferença significativa dos níveis de leptina e seu receptor comparando casos e controles (WANG et al., 2020). Um estudo *in vitro* também observou menor expressão do receptor LEPR em osteoblastos induzidos de pacientes com EIA comparado ao controle (LIANG et al., 2012). Juntos, estes resultados corroboram apontando a importância do papel crucial da via de sinalização da leptina na etiopatogenia da EIA (BALDOCK et al., 2006; QIU et al., 2007; LIU et al., 2012; LIANG et al., 2012; WU et al., 2015; BURWELL et al., 2016; MATUSIK et al., 2020; WANG et al., 2020).

Os genes que codificam a leptina (LEP) e seu receptor sOB-R (LEPR) são polimórficos e estas alterações podem estar associadas com a etiologia da EIA e com a progressão da curva escoliótica (MÓROCZ et al., 2012; LIANG et al., 2012; LIU et al., 2015; NIKOLOVA et al., 2015).

2.9 Polimorfismos nos genes *LEP* e *LEPR* associados com a escoliose idiopática

Os genes *LEP* e *LEPR* estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 7 (7q32.1) e 1 (1p31.3). Polimorfismos em ambos os genes podem alterar a expressão e/ou função da leptina e

seu receptor sOB-R (LIANG et al., 2012; LIU et al., 2015; MÓROCZ et al., 2011; NIKOLOVA et al., 2015).

Um estudo de GWA envolvendo 1.504 mulheres com ascendência europeia identificou o polimorfismo *LEPR* rs2767485 associado aos níveis de sOB-R (SUN et al., 2010). Esse polimorfismo é caracterizado pela troca de uma citosina por uma timina na região intrônica do gene *LEPR*, já tendo sido associado com a modulação do IMC (CORGOSINHO et al., 2017; HELGELAND et al., 2019), uma vez que o alelo *LEPR* rs2767485 T foi associado a níveis mais elevados do receptor sOB-R (SUN et al., 2010). Além disso, em 2015, um estudo envolvendo 570 pacientes chinesas com EIA entre 10 e 18 anos avaliou 6 polimorfismos (rs1137101, rs1137100, rs4655555, rs2767485, rs1751492 e rs8179183) no gene *LEPR* e identificou que apenas o polimorfismo rs2767485 foi associado com baixo risco de ocorrência da EIA, sugerindo que este polimorfismo é um candidato potencial para explicar a suscetibilidade genética da EIA, considerando a via de sinalização da leptina (LIU et al., 2015).

Por outro lado, um estudo envolvendo 446 pacientes com EIA e 550 controles não observou associação com a suscetibilidade e a gravidade de desenvolvimento da EIA ao avaliar 6 polimorfismos (rs3828942, rs75506045, rs10954174, rs41457646, rs11761556 e 53A>G) do gene *LEP* (LIANG et al., 2012). Além disso, Mórocz e colaboradores (2009) também não encontraram associação com a EIA ao analisar o polimorfismo rs7799039 do gene da leptina em 126 pacientes europeus (MÓROCZ et al., 2009). Considerando o gene *LEP*, o polimorfismo *LEP* rs2167270 destaca-se pela localização na região 5' não traduzida (5'-UTR) do gene, que altera significativamente o nível sérico de leptina e tem sido estudado como fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo a obesidade e a degeneração do disco intervertebral (CHEN et al., 2022).

Até o presente momento não existiam estudos na população brasileira avaliando a influência de polimorfismos nos genes *LEP* e *LEPR* com o desenvolvimento e gravidade da escoliose.

Apenas um estudo avaliou e encontrou associação do polimorfismo *LEPR* rs2767485 com o desenvolvimento da escoliose, contudo na população chinesa. Não existiam dados que avaliaram o polimorfismo funcional *LEP* rs2167270 com a suscetibilidade da escoliose, nem mesmo o efeito combinado desses dois polimorfismos (*LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485). Já é sabido que pacientes com EIA apresentam menor IMC, biodisponibilidade alterada de leptina e menor massa óssea sistêmica, o que indica que a via de sinalização LEP-LEPR pode estar associada com a suscetibilidade genética da EIA.

JUSTIFICATIVA

3. Justificativa

Embora a etiologia da EIA seja desconhecida, diversos fatores extrínsecos e intrínsecos foram apontados como estando associados ao seu desenvolvimento. Dentre os fatores intrínsecos destaca-se o componente hereditário, já que parentes de indivíduos com escoliose idiopática apresentaram maior prevalência da doença do que a população em geral. A composição antropométrica dos pacientes com EIA, que possuem baixo peso e baixa densidade óssea comprovada em vários estudos, aumenta o interesse na causa de origem metabólica, estando os hormônios do desenvolvimento em destaque. Visto o papel da leptina no metabolismo ósseo e conseqüentemente no crescimento da coluna vertebral, além dos níveis alterados de leptina (LEP) e seu receptor (LEPR) em pacientes com EIA, a via LEP-LEPR torna-se importante para explicar a etiologia da doença.

A relação entre níveis de leptina, IMC e fatores genéticos que possam explicar a etiologia da EIA ainda é controversa. Polimorfismos nos genes que codificam a LEP e LEPR podem alterar a expressão e/ou função das respectivas proteínas. Dessa forma, essa via de sinalização alterada pode interferir no remodelamento ósseo e explicar a etiologia da EIA.

O Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO/MS) é um órgão do Ministério da Saúde, referência na assistência de pacientes com doenças ortopédicas de alta complexidade, incluindo um número elevado de pacientes adolescentes com diagnóstico de escoliose idiopática, que muitas vezes são referenciados de outros centros, já em estágio avançado da doença. Nesse contexto, torna-se relevante investigar a suscetibilidade genética de EIA, na via LEP-LEPR, com o intuito de identificar indivíduos em risco, formular políticas de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença.

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1. Objetivo primário

Avaliar a influência de polimorfismos nos genes que codificam a leptina e seu receptor com o desenvolvimento da EIA e com a indicação de tratamento cirúrgico para correção da deformidade, em uma amostra da população brasileira.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar os parâmetros radiográficos para classificação da EIA, de acordo com a indicação cirúrgica;
- Descrever os dados demográficos e clínicos dos pacientes com EIA;
- Determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 em pacientes com EIA e em indivíduos sem doença na coluna vertebral;
- Avaliar a magnitude de associação dos polimorfismos estudados com o desenvolvimento e gravidade da EIA.
- Avaliar a associação dos polimorfismos estudados com o IMC em pacientes com EIA;
- Avaliar o efeito combinado dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 com o desenvolvimento da EIA.

MATERIAL E MÉTODOS

5. Material e Métodos

5.1. Aspectos éticos e tipo de estudo

Foi realizado um estudo retrospectivo, analítico, do tipo caso controle envolvendo pacientes com escoliose idiopática do adolescente, atendidos pelo Centro de Doenças da Coluna do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) no Rio de Janeiro. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), sob parecer 73527617.4.0000.5273 (**Anexo I**). Todos os indivíduos convidados para participar do estudo receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e concordaram em participar do estudo mediante assinatura do termo (**Anexo II**). Após concordarem em participar do estudo foram colhidas informações demográficas (sexo, idade, peso e altura), clínicas e radiográficas (ângulo de Cobb e maturidade esquelética) dos pacientes (**Anexo III**).

Foram considerados para inclusão no estudo pacientes com idade acima de 10 anos e diagnóstico clínico de escoliose idiopática do adolescente, classificados com ângulo de Cobb maior que 10°. Não foram incluídos pacientes com qualquer doença de base que pudesse justificar um quadro de escoliose não idiopática, tais como alterações neurológicas, doenças neuromusculares e sindrômica, pacientes com dados radiográficos incompletos e impossibilidade de coleta e/ou análise genética das amostras.

No grupo controle foram incluídos voluntários saudáveis e sem doença na coluna vertebral, recrutados no banco de doadores de sangue do INTO (HEMOINTO).

Após assinatura do TCLE as amostras biológicas (células do epitélio bucal) foram coletadas com auxílio de um *swab* estéril e encaminhadas em recipiente adequado para o Laboratório de Biologia Molecular do INTO para as análises genéticas (extração DNA genômico e análise dos polimorfismos de interesse).

5.2. Avaliação radiográfica

O diagnóstico de escoliose idiopática do adolescente foi realizado pela avaliação da radiografia panorâmica da coluna vertebral em AP (**Figura 12**) para definir o ângulo de Cobb.

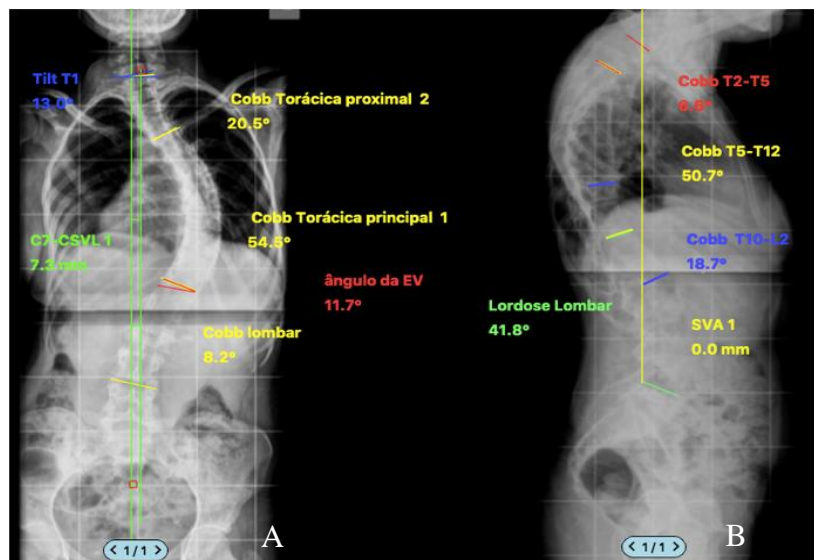


Figura 12: Radiografia panorâmica de coluna vertebral. (A) Incidência antero-posterior com o valor do ângulo de Cobb das curvas torácica proximal, torácica principal e lombar. **(B)** Incidência em perfil com as medidas pelo método de Cobb da cifose regional T2- T5 (vermelho), cifose torácica global T5-T12 (amarelo) e cifose regional T10-L2 (azul) (arquivo pessoal).

A avaliação da maturidade esquelética foi feita pelo método de Risser (RISSER, 2010), através da visualização da apófise do ílaco em radiografia panorâmica de coluna em AP (**Figura 13**). O método classifica a idade óssea em cinco tipos, de zero a 5. Estágio zero, indica a ausência de ossificação da apófise da crista íliaca; estágio I compreende até 25% de ossificação; estágio II engloba de 25% a 50% de ossificação; estágio III, de 50% a 75% de ossificação; estágio IV de 75% a 100% de ossificação da apófise com cartilagem de crescimento ainda visível; estágio V – ossificação completa da apófise.

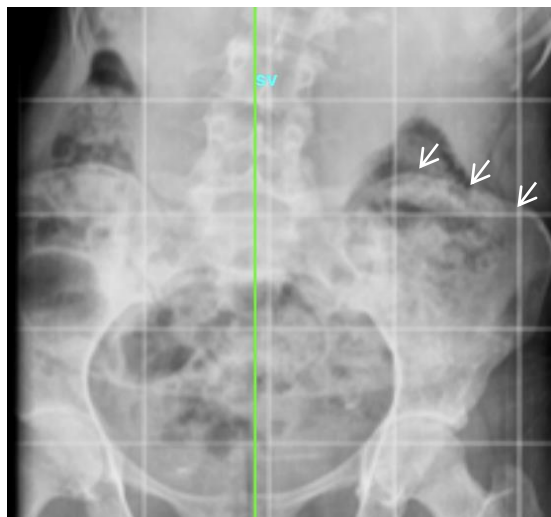


Figura 13: Avaliação da maturidade esquelética pelo método de Risser. No exemplo toda a extensão da apófise do íliaco está ossificada (Risser IV) (Arquivo pessoal). SV=vértebra estável.

A avaliação das radiografias panorâmicas de coluna vertebral foi realizada utilizando o software Surgimap Spine (Nemaris Inc. New York, USA), versão 2.2.15.5 para definição do ângulo de Cobb e da maturidade esquelética. Todas as medidas foram feitas independentemente por dois investigadores, cirurgiões de coluna experientes, cegados para as informações clínicas para evitar viés. Os casos de EIA foram separados em dois grupos, de acordo com a magnitude do ângulo de Cobb (Cobb $<45^\circ$ e Cobb $\geq 45^\circ$), conforme ilustrado na **figura 14**.

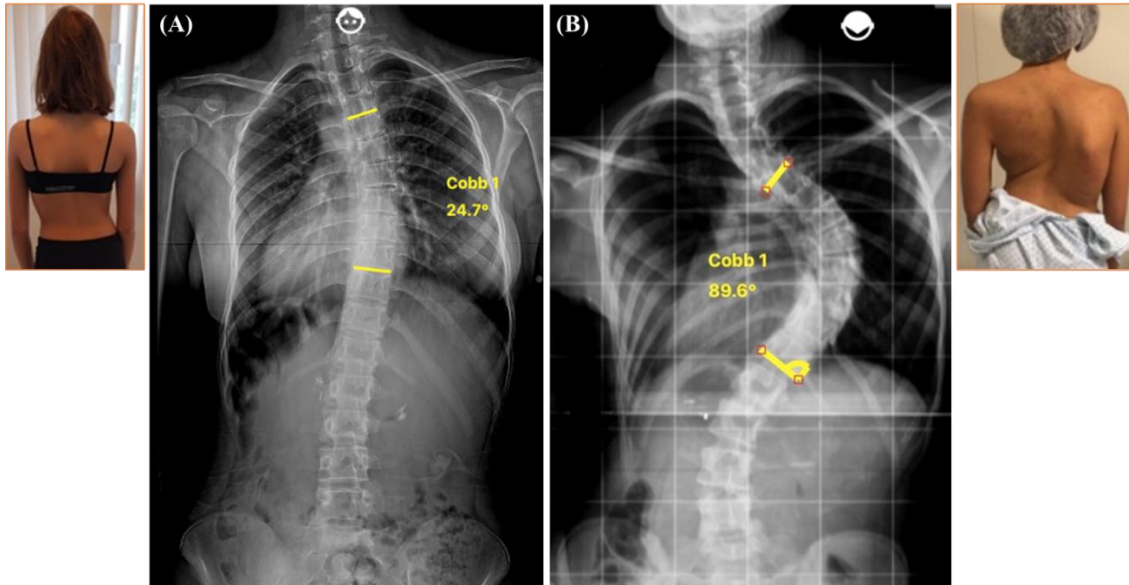


Figura 14: Exemplos de radiografias panorâmicas da coluna póstero-anterior. Imagens utilizadas para avaliação do ângulo de Cobb e classificação dos pacientes quanto a necessidade de tratamento cirúrgico para correção da curva escoliótica. **(A)** Exemplo de pacientes com escoliose com ângulo de Cobb $<45^\circ$. **(B)** Exemplo de pacientes com escoliose com ângulo de Cobb $\geq 45^\circ$ e com indicação de tratamento cirúrgico (Arquivo pessoal).

5.3. Análise de polimorfismos

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de mucosa oral, utilizando um kit comercial (Invisorb® Spin, Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Em resumo, a extração de DNA foi realizada pela lise das células, juntamente com a incubação com Proteinase K. Foram utilizadas colunas e tampões específicos para purificação e isolamento do DNA. Após as lavagens e centrifugações necessárias, o DNA foi isolado com um tampão de eluição. As amostras foram armazenadas em microtubos de 1500 μ l, devidamente etiquetados, com o código interno de cada voluntário, em freezer (-20°C) para posterior análise de genotipagem.

A análise dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o sistema TaqMan. O DNA foi amplificado utilizando oligonucleotídeos específicos e a identificação dos polimorfismos foi realizada utilizando sondas TaqMan exclusivas para cada SNP, validadas e adquiridas da empresa

Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), conforme descrito na **Tabela 2**. O sistema TaqMan para discriminação alélica consiste em um par de sondas marcadas com fluorescência diferente (VIC e FAM), possibilitando a identificação dos dois possíveis alelos (*LEP* rs2167270 G>A e *LEPR* rs2767485 T>C) presentes na amostra do indivíduo. A intensidade de fluorescência é captada pelo equipamento termociclador (PCR em tempo real), discriminando o genótipo de cada indivíduo.

Para todos os ensaios, as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 8 ul, com 30 ng de DNA, 1x *Taqman Universal Master Mix* (Applied Biosystems), 1x de cada ensaio específico de oligo e sonda 40x e H₂O q.s.p. As condições da PCR foram: 95°C por 10 minutos, acompanhados de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto. Ao final, a detecção dos genótipos foi realizada no aparelho 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), conforme ilustrado nas **Figuras 15 e 16**. Cada ensaio de genotipagem foi realizado utilizando 2 controles negativos e 2 controles positivos de cada genótipo (selvagem, heterozigoto e homozigoto variante).

Tabela 2: Informações dos polimorfismos e dos ensaios TaqMan para genotipagem.

Gene	Cromossomo	Polimorfismo	Troca nucleotídeo	Código sonda	Sequência analisada
<i>LEP</i>	7	rs2167270	G>A	C_15966471 _20	GAGCCCCGTAGGAATCG
					CAGCGCCA[A/G]CGGTTG
					CAAGGTAAGGCCCCCGGC GC
<i>LEPR</i>	1	rs2767485	C>T	C_16068395 _10	TAACTGGTAGCTCTGCCT
					AGATCCA[C/T]GTGCTTG
					GTGTTAGGGAAGGAACA G

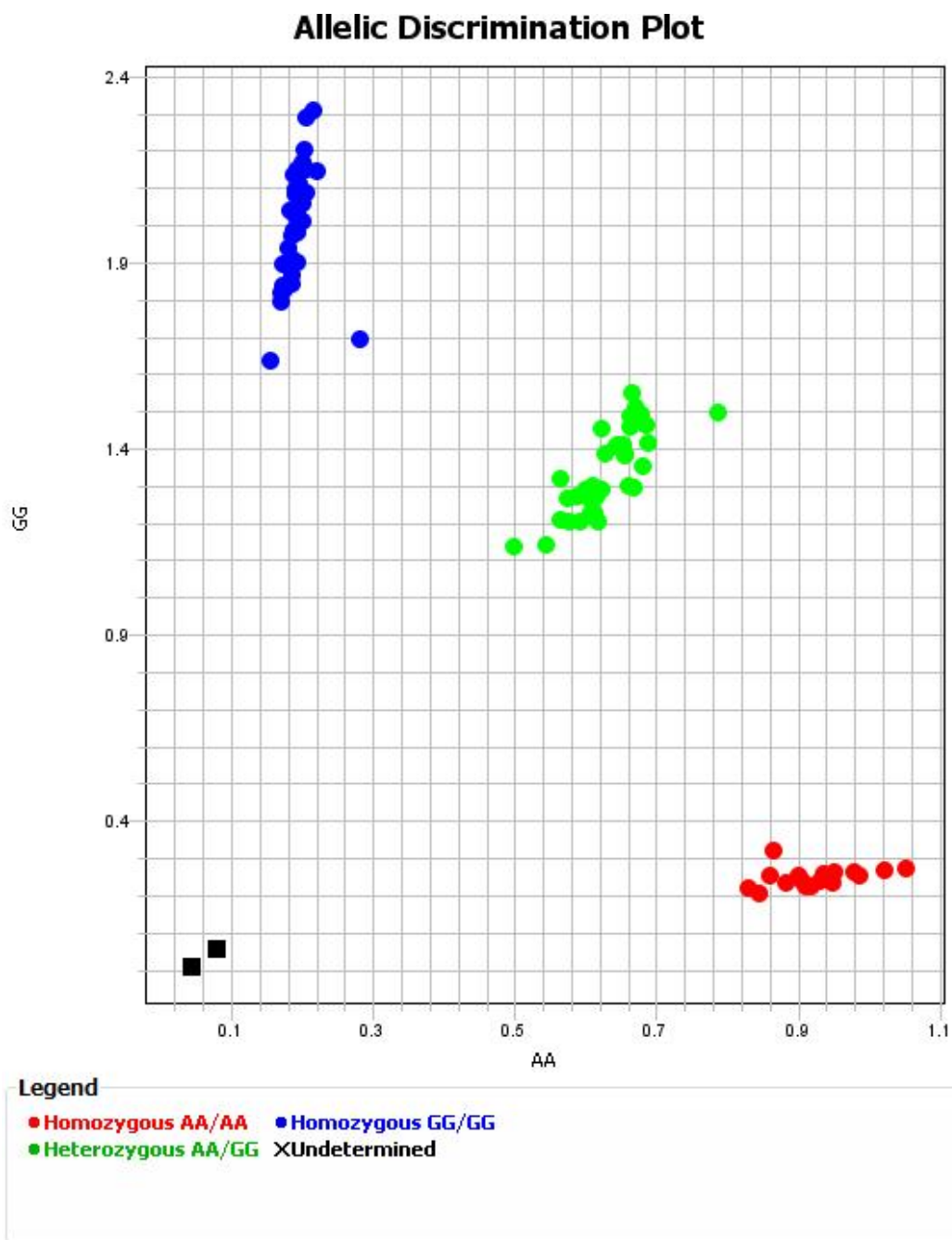


Figura 15: Análise do polimorfismo *LEP* rs2167270. Determinação dos diferentes genótipos utilizando o sistema TaqMan por PCR em tempo real. O quadrado em preto representa o controle negativo. Os círculos em azul são os genótipos homocigotos selvagem (*LEP* rs2167270 GG); em vermelho os homocigotos variantes (*LEP* rs2167270 AA) e, em verde, os indivíduos com genótipo heterocigoto (*LEP* rs2167270 GA).

Allelic Discrimination Plot

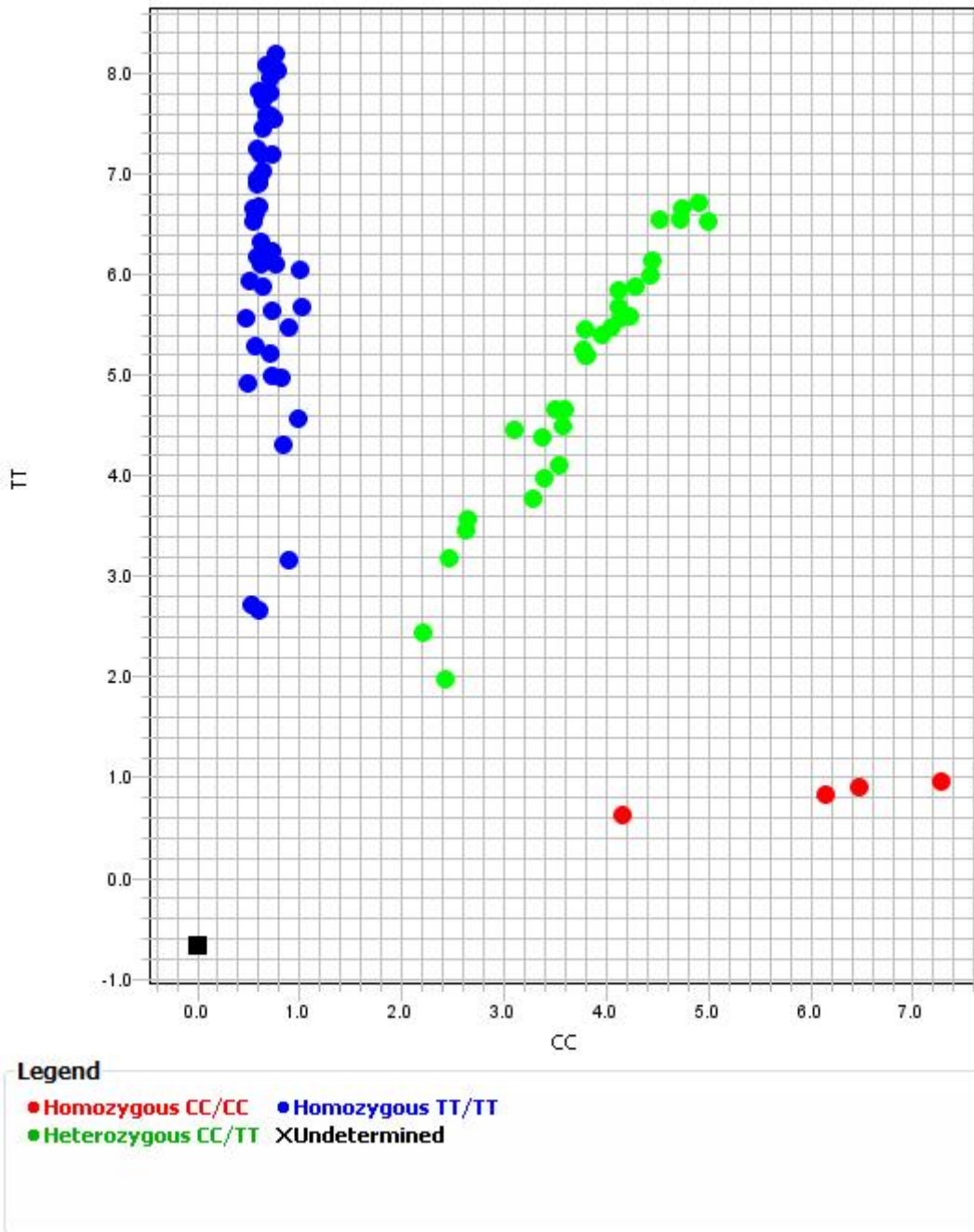


Figura 16: Análise do polimorfismo *LEPR rs2767485*. Determinação dos diferentes genótipos utilizando o sistema TaqMan por PCR em tempo real. O quadrado em preto representa o controle negativo. Os círculos em azul são os genótipos homocigotos selvagem (*LEPR rs2767485 TT*); em vermelho os homocigotos variantes (*LEPR rs2767485 CC*) e, em verde, os indivíduos com genótipo heterocigoto (*LEPR rs2767485 TC*).

3.4 Análise estatística

A normalidade da população foi avaliada pelo teste de Shapiro – Wilk ou pelo teste Kolmogorov – Smirnov. As diferenças entre as médias das variáveis contínuas foram avaliadas usando o teste T-Student, enquanto as diferenças entre as proporções das variáveis categóricas pelo teste Chi-quadrado χ^2 , sendo considerado um grau de significância de 5%. Os dados foram expressos como média, desvio padrão, valores mínimo e máximo, além do número e a frequência por grupo/variável.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como o peso (kg) dividido pelo quadrado da altura (m²). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO 2006), o IMC foi classificado em cinco grupos: baixo peso (IMC \leq 18,5 kg/m²), peso normal (18,6 - 24,9 kg/m²), sobrepeso (25 - 29,9 kg/m²), obesidade (30 - 39,9 kg/m²) e obesidade mórbida (IMC \geq 40 kg/m²).

As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 foram determinadas por contagem direta dos alelos e analisadas pelo teste de Fisher ou teste χ^2 , após constatar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Para avaliar a magnitude de associação entre o polimorfismo estudado e o desenvolvimento da EIA, as razões de chances brutas e ajustadas (OR) com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram estimadas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA, versão 20.0) e um nível de significância de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O tamanho da amostra foi calculado no Epi Info 7, versão 7.1.3. (<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>) para detectar uma diferença entre os grupos caso e controle, assumindo um OR de 2,0, com base em evidências anteriores do

grupo (AZEVEDO et al ., 2022; PEDROSA et al., 2022), com poder de 0,8 e 5% de erro tipo I.

O modelo do mecanismo para explicar a hipótese da influência do polimorfismo da via de sinalização LEP-LEPR na suscetibilidade da EIA e no IMC foi criado com auxílio do programa BioRender (<https://biorender.com/>).

RESULTADOS

6. Resultados

Os resultados gerados com a execução desta tese foram organizados em um manuscrito científico e submetido à revista *European Spine Journal* (ISSN 0940-6719) (<https://www.europeanspinejournal.org/>), fator de impacto 2,586 (Qualis A1) (**Anexo IV**).

6.1 Características dos casos de escoliose

Os dados clínicos dos 202 pacientes com EIA incluídos no estudo estão reunidos na **Tabela 3**. Considerando o grau de maturidade esquelética, segundo a escala de Risser, a grande maioria (69,4%) dos pacientes com EIA apresentou grau maduro, classificados como IV e V (**Figura 17**). A média do ângulo de Cobb da maior curva foi de $49,1 \pm 16,3$ graus, variando entre 11° e 110° . A grande maioria dos casos (58,9%) apresentaram curvas acima de 45° , parâmetro utilizado para a indicação do tratamento cirúrgico (**Figura 18**).

Tabela 3: Características dos pacientes com escoliose idiopática do adolescente.

Variáveis	Casos de EIA (N = 202) N (%)
Escala de Risser	
0	20 (9,9)
I	13 (6,4)
II	12 (5,9)
III	17 (8,4)
IV	50 (24,8)
V	90 (44,6)
Cobb (graus)	
< 45	83 (41,1)
≥ 45	119 (58,9)

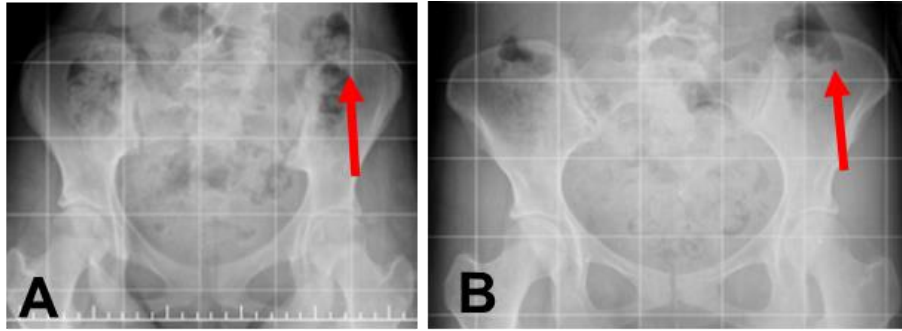


Figura 17: Radiografias de pacientes com maturidade esquelética. Radiografias panorâmicas de bacia para identificação do sinal de Risser, conforme indicado pela seta vermelha. (A) Exemplo de paciente com Risser 4, em que a ossificação ocorre em 100%. (B) Exemplo de paciente com Risser 5, ilustrando a fusão da crista ílfaca ao ílio.

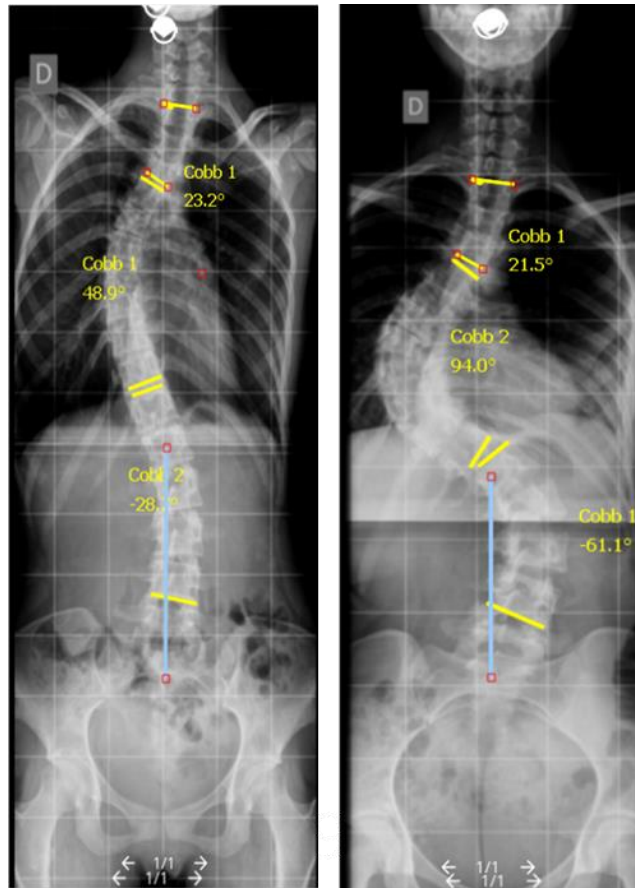


Figura 18: Radiografias de pacientes com Cobb $\geq 45^\circ$. Exemplos de radiografias panorâmicas da coluna pósterio-anterior de casos de EIA com indicação de tratamento cirúrgico para correção da curva.

A maioria dos 202 pacientes com EIA é do sexo feminino (93,6%), com uma proporção de 1 homem para 14,5 mulheres afetadas. A média de idade foi de $16,7 \pm 5,4$ (10 - 30) anos, sendo a maioria (74,3 %) abaixo dos 18 anos. O IMC médio foi de $20,6 \pm 4,4$ (13,9 - 39,9) kg/m^2 e a maioria (87,6%) apresenta baixo peso ou na faixa normal. Nenhum paciente com EIA apresentou obesidade mórbida ou grave, considerada acima de 40 kg/m^2 e apenas 5,4% dos pacientes com EIA apresentaram obesidade (30 - 39,9 kg/m^2).

6.2 Características demográficas dos casos e controles

A comparação dos dados demográficos dos 757 indivíduos incluídos no estudo caso-controle está reunida na **Tabela 4**. A média de idade ($36,9 \pm 12,2$) e IMC ($27,4 \pm 4,1$) do grupo controle foi significativamente maior ($P < 0,001$, teste t de *Student*) que dos casos de EIA, já que a maioria dos voluntários foram recrutados no banco de doadores de sangue do INTO (HEMOINTO). O sexo feminino foi o mais frequente no grupo de casos de EIA comparado aos controles ($P < 0,001$, teste χ^2).

Tabela 4. Comparação dos dados demográficos entre os casos e os controles (n = 757).

Variáveis	Controles (N = 555)	Casos de Escoliose (N = 202)	P valor ^a
	N (%)		
Idade (anos)			
≤ 18	18 (3.2)	150 (74.3)	<0,001
19 - 25	113 (20.4)	32 (15.8)	
≥ 26	424 (76.4)	20 (9.9)	
Sexo			
Feminino	240 (43.2)	189 (93.6)	<0,001
Masculino	315 (56.8)	13 (6.4)	
IMC^c (kg/m^2)			
≤ 18,50	4 (0.7)	78 (38.6)	<0,001
18,51 a 24,9	160 (28.8)	99 (49.0)	
25,0 a 29,9	246 (44.3)	14 (7.0)	
30 - 39,9	145 (26.2)	11 (5.4)	

^aP-valor calculado pelo teste χ^2 ou exato de Fisher, quando necessário.

6.3 Frequência dos polimorfismos nos casos e controles

A frequência do polimorfismo *LEP* rs2167270 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os subgrupos: controles (n = 555, P = 0,87) e casos de EIA (n = 202, P = 0,54). Já o polimorfismo *LEPR* rs2767485 apresentou equilíbrio de Hardy-Weinberg apenas no grupo controle (n = 555, P = 0,11) e não no grupo casos (n = 202, P = 0,001), já que nenhum paciente com EIA apresentou o genótipo *LEPR* rs2767485 CC.

A distribuição da frequência dos alelos e genótipos de ambos os polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 nos casos de EIA e nos controles está descrita na **Figura 19**. A menor frequência dos alelos (*minor allele frequency* - MAF) *LEP* rs2167270 A e *LEPR* rs2767485 C foi, respectivamente, 35,9% e 18,3% nos casos de escoliose e 37,0% e 24,4% nos controles. Comparando casos de EIA e os controles, foi observada diferença significativa na distribuição de frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo *LEPR* rs2767485 (P = 0,01 e 0,004, respectivamente, teste χ^2). Contudo, não foi observada diferença significativa entre os dois grupos (casos e controles) na distribuição da frequência considerando o polimorfismo *LEP* rs2167270 (P = 0,68 e 0,77, respectivamente, teste χ^2).

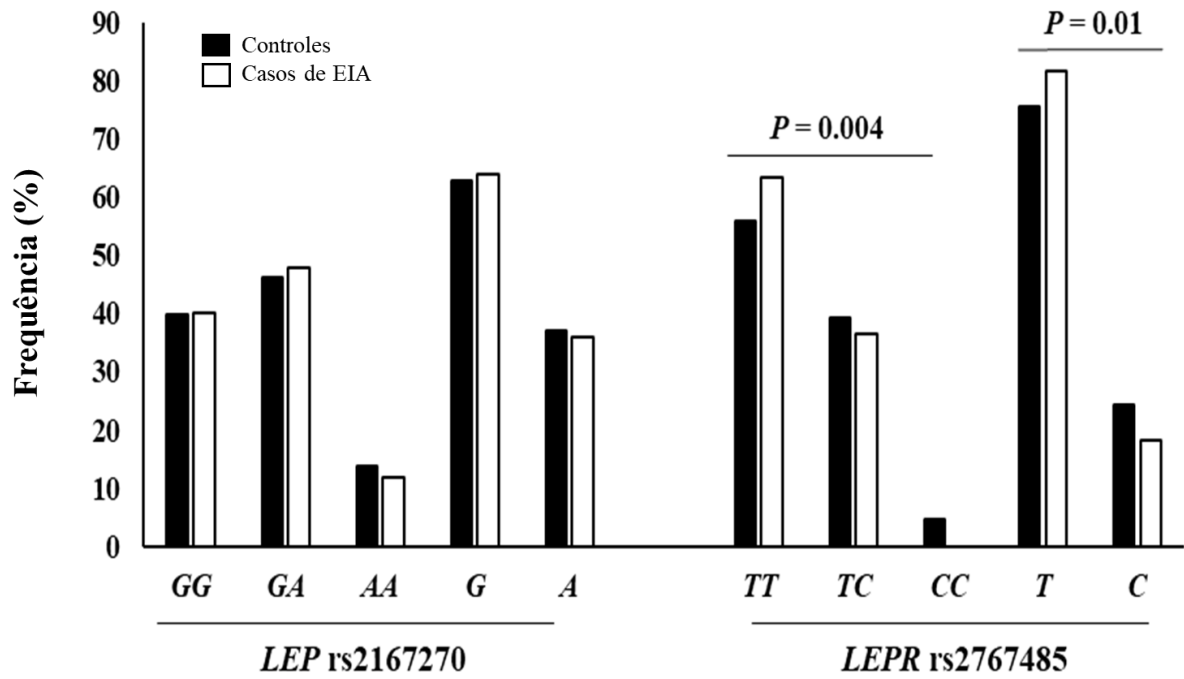


Figura 19: Distribuição de frequência dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 nos casos e nos controles. Legenda: número de controles = 555 e de casos com escoliose = 202. *p*-valor calculado pelo teste χ^2 ou exato de Fisher, quando necessário.

Ao avaliar a associação dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 com suscetibilidade genética da EIA (**Tabelas 5 e 6**), não foi observada associação do polimorfismo *LEP* rs2167270 com o desenvolvimento da escoliose, considerando todos os casos de EIA ou os subgrupos de acordo com a indicação cirúrgica (Cobb $<45^\circ$ e $\geq 45^\circ$) de tratamento da doença (**Tabela 5**). Por outro lado, o polimorfismo *LEPR* rs2767485 (**Tabelas 6**) foi associado com o risco de ocorrência de EIA de aproximadamente 1,5 vezes na presença do alelo *LEPR* rs2767485 *T* e dos genótipos *TT* e *TC*. Como o genótipo homocigoto variante *LEPR* rs2767485 *CC* foi encontrado apenas no grupo controle, utilizamos este genótipo como referência e adotamos um modelo dominante (*LEPR* rs2767485 *TC* + *TT*) para as análises de associação dos polimorfismos com o risco de EIA. Assim, o genótipo *LEPR* rs2767485 *CC* apresenta um efeito protetor no desenvolvimento da escoliose, o que pode explicar a ausência de equilíbrio na distribuição dos genótipos deste polimorfismo no grupo dos casos de EIA. O polimorfismo *LEPR* rs2767485 também foi associado com os subgrupos de EIA, tanto nos casos com Cobb abaixo de 45° , quanto nos casos com indicação cirúrgica de tratamento da doença (Cobb $\geq 45^\circ$) (**Tabelas 6**).

Tabela 5: Análise de associação do polimorfismo *LEP* rs2167270 com a suscetibilidade da escoliose idiopática do adolescente.

Polimorfismo	Controles (n = 555)	Casos de EIA (n = 202)	<i>P</i> ^a	OR ^b (CI 95%)	Cobb < 45° (n = 83)	OR ^c (CI 95%)	Cobb ≥ 45° (n = 119)	OR ^d (CI 95%)
<i>LEP</i> rs2167270	n (%)				n (%)		n (%)	
<i>GG</i>	221 (39,8)	81 (40,1)		1 ^e	34 (41,0)	1 ^e	47 (39,5)	1 ^e
<i>GA</i>	257 (46,3)	97 (48,0)	0,77	1,03 (0,73 – 1,45)	37 (44,6)	0,94 (0,57 - 1,54)	60 (50,4)	1,10 (0,72 - 1,67)
<i>AA</i>	77 (13,9)	24 (11,9)		0,85 (0,50 – 1,44)	12 (14,5)	1,01 (0,50 - 2,06)	12 (10,1)	0,73 (0,37 - 1,45)
<i>GG + GA</i>	478 (86,1)	178 (88,1)		1 ^e	34 (41,0)	1 ^e	47 (39,5)	1 ^e
<i>AA</i>	77 (13,9)	24 (11,9)	0,48	0,84 (0,51 – 1,37)	49 (59,0)	1,05 (0,54 - 2,02)	72 (60,5)	0,70 (0,37 - 1,32)
<i>G</i>	699 (63,0)	259 (64,1)		1 ^e	105 (63,3)	1 ^e	154 (64,7)	1 ^e
<i>A</i>	411 (37,0)	145 (35,9)	0,68	0,95 (0,75 -1,21)	61 (36,7)	0,99 (0,71 - 1,39)	84 (35,3)	0,93 (0,69 - 1,24)

EIA = escoliose idiopática do adolescente. OR = razão de chances. IC = intervalo de confiança 95%. ^a*P*-valor calculado pelo teste χ^2 ou exato de Fisher, quando necessário. ^bOR referente a análise de associação entre o grupo controle e todos os casos de EIA (n = 202). ^cOR referente a análise de associação entre o grupo controle e os casos de EIA sem indicação de tratamento cirúrgico (n = 83). ^dOR referente a análise de associação entre o grupo controle e os casos de EIA com indicação de tratamento cirúrgico (n = 119). ^eGrupo de referência.

Tabela 6: Análise de associação do polimorfismo *LEPR* rs2767485 com a suscetibilidade da escoliose idiopática do adolescente.

Polimorfismo	Controles (n = 555)	Casos de EIA (n = 202)	<i>P</i> ^a	OR ^b (CI 95%)	Cobb < 45° (n = 83)	OR ^c (CI 95%)	Cobb ≥ 45° (n = 119)	OR ^d (CI 95%)
<i>LEPR</i> rs2767485	n (%)				n (%)		n (%)	
<i>CC</i>	26 (4,7)	0 (0,0)		1 ^e	0 (0,0)	1 ^e	0 (0,0)	1 ^e
<i>TC</i>	219 (39,4)	74 (36,6)	0,004	1,34 (1,25 – 1,43)	22 (26,5)	1,10 (1,06 – 1,14)	52 (43,7)	1,24 (1,17 – 1,31)
<i>TT</i>	310 (55,9)	128 (63,4)		1,41 (1,33 -1,50)	61 (73,5)	1,20 (1,14 – 1,25)	67 (56,3)	1,21 (1,16 – 1,27)
<i>CC</i>	26 (4,7)	74 (36,6)	0,002	1 ^e	22 (26,5)	1 ^e	52 (43,7)	1 ^e
<i>TC + TT</i>	529 (95,3)	128 (63,4)		1,38 (1,32 – 1,44)	61 (73,5)	1,16 (1,12 – 1,19)	67 (56,3)	1,22 (1,18 – 1,27)
<i>C</i>	271 (24,4)	74 (18,3)	0,01	1 ^e	22 (13,3)	1 ^e	52 (21,8)	1 ^e
<i>T</i>	839 (75,6)	330 (81,7)		1,44 (1,08 – 1,92)	144 (86,7)	2,11 (1,32 – 3,38)	186 (78,2)	1,15 (0,82 – 1,62)

EIA = escoliose idiopática do adolescente. OR = razão de chances. IC = intervalo de confiança 95%. ^a*P*-valor calculado pelo teste χ^2 ou exato de Fisher, quando necessário. ^bOR referente a análise de associação entre o grupo controle e todos os casos de EIA (n = 202). ^cOR referente a análise de associação entre o grupo controle e os casos de EIA sem indicação de tratamento cirúrgico (n = 83). ^dOR referente a análise de associação entre o grupo controle e os casos de EIA com indicação de tratamento cirúrgico (n = 119). ^eGrupo de referência.

Os polimorfismos *LEP* rs2167270 G>A e *LEPR* rs2767485 T>C também foram avaliadas quanto ao desenvolvimento da EIA considerando os genótipos combinados: selvagem (*LEPR* TT) + selvagem (*LEP* GG); Selvagem (*LEPR* TT) + Variante [Heterozigoto (*LEP* GA) ou Homozigoto (*LEP* AA)]; Variante [Heterozigoto (*LEPR* TC) ou Homozigoto (*LEPR* CC)]+ Selvagem (*LEP* GG); Variante [Heterozigoto (*LEPR* TC) ou Homozigoto (*LEPR* CC)] + Variante [Heterozigoto (*LEP* GA) ou Homozigoto (*LEP* AA)]. Contudo, não foi observada associação dos genótipos combinados *LEP-LEPR* e o desenvolvimento da escoliose (**Tabela 7**).

Tabela 7: Análise de associação dos genótipos combinados e a suscetibilidade da escoliose idiopática do adolescente.

Genótipos combinados	Controles (n = 555)	Casos de Escoliose (n = 202)	P valor ^a	OR (IC 95 %)
<i>LEPR rs2767485 +LEP rs2167270</i>				
<i>TT + GG</i>	118 (21,3%)	46 (22,8%)		1 ^c
<i>TT + GA ou AA</i>	192 (34,6%)	82 (40,6%)	0,68	1,10 (0,71 - 1,68)
<i>TC ou CC + GG</i>	103 (18,6%)	35 (17,3%)		0,87 (0,52 - 1,46)
<i>TC ou CC + GA ou AA</i>	142 (25,6%)	39 (19,3%)		0,71 (0,43 - 1,15)

OR = razão de chances. IC = intervalo de confiança 95%. ^aP-valor calculado pelo teste χ^2 ou exato de Fisher, quando necessário. ^bOR ajustado pela idade, sexo e IMC. ^cGrupo de referência. (-) não foi possível determinar o valor de P, OR e IC 95%. Genótipos combinados *LEP rs2167270* e *LEPR rs2767485*: Selvagem (TT) + Selvagem (GG); Selvagem (TT) + Variante [Heterozigoto (GA) ou Homozigoto (AA)]; Variante [Heterozigoto (TC) ou Homozigoto (CC)]+ Selvagem (GG); Variante [Heterozigoto (TC) ou Homozigoto (CC)] + Variante [Heterozigoto (GA) ou Homozigoto (AA)].

A distribuição de frequência dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 também foi avaliada em relação aos subgrupos de IMC, agrupando baixo peso ($\leq 18,5$ kg/m²) e peso normal (18,6 - 24,9 kg/m²) em comparação aos indivíduos com sobrepeso (25 - 29,9 kg/m²), obesidade (30 - 39,9 kg/m²) e obesidade mórbida (≥ 40 kg/m²). Nos indivíduos controles (n = 555), não houve diferença significativa na distribuição de frequência de ambos os polimorfismos, considerando os dois subgrupos de IMC (P>0,05, teste χ^2) (**Figura 20**).

Nos casos de escoliose (**Tabela 8**), comparando a frequência dos genótipos e alelos entre os dois subgrupos de IMC ($\leq 24,9$ versus ≥ 25 kg/m²), não foi observada diferença significativa para o polimorfismo *LEP* rs2167270. Contudo, para o polimorfismo *LEPR* rs2767485 foi observada diferença significativa entre os dois grupos de IMC. Houve um predomínio de pacientes com EIA com genótipo selvagem *LEPR* rs2767485 *TT* no grupo de baixo peso ($\leq 18,5$ kg/m²) ou peso normal (18,6 - 24,9 kg/m²) em comparação ao grupo com sobrepeso (≥ 25 kg/m²). Assim, o genótipo *LEPR* rs2767485 *TT* foi associado com o risco de aproximadamente 2,5 vezes em apresentar baixo IMC (**Tabela 8**).

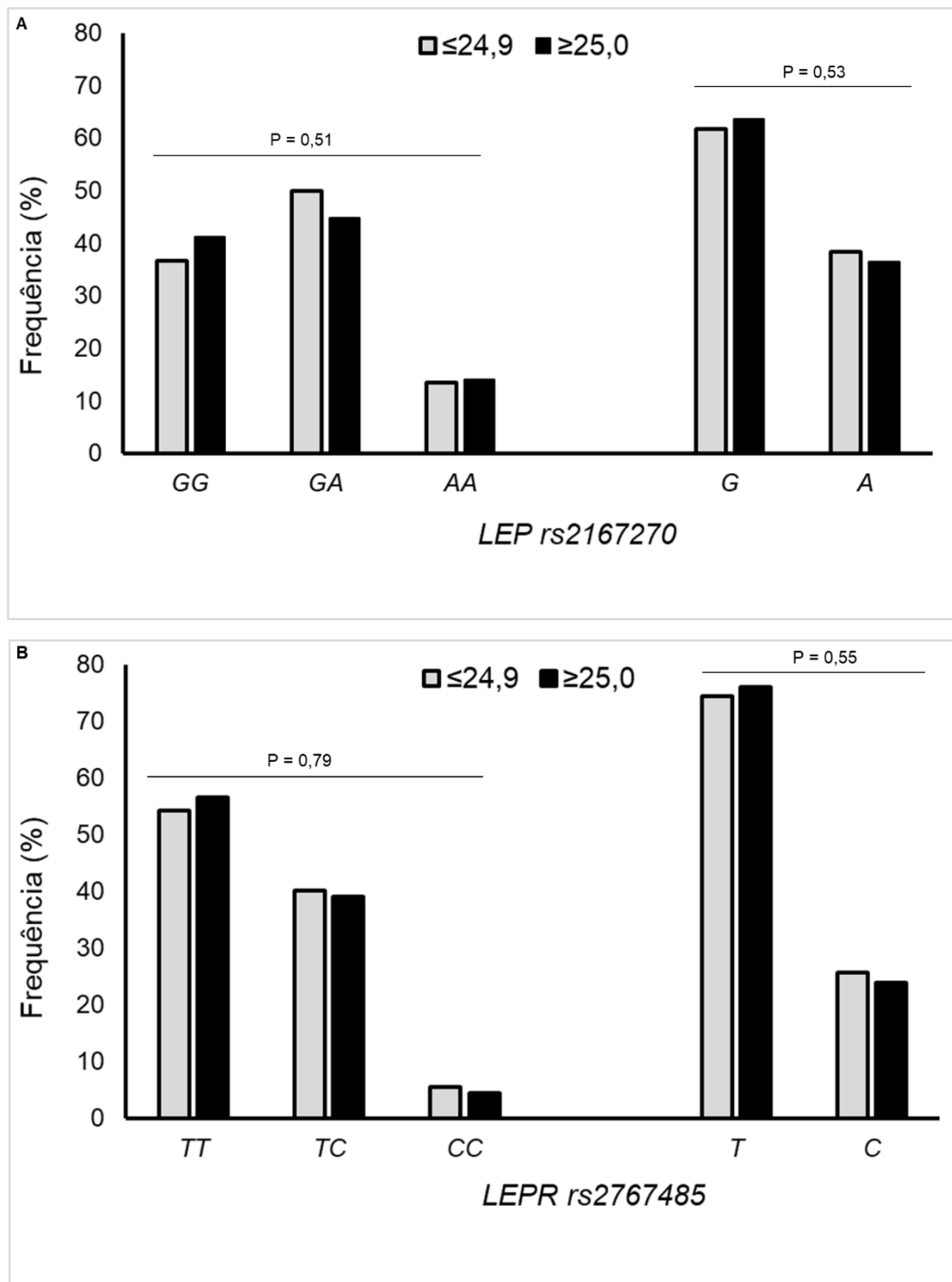


Figura 20: Distribuição de frequência dos polimorfismos no grupo controle, de acordo com os subgrupos de IMC. (A) Polimorfismo *LEP* rs2167270 e (B) *LEPR* rs2767485. Legenda: número de controles com IMC abaixo de 24,9 (baixo peso ou peso normal) = 164. número de controles com IMC acima de 25,0 (sobrepeso, obesidade e obesidade mórbida) = 391. *p*-valor calculado pelo teste χ^2 ou exato de Fisher, quando necessário.

Tabela 8: Análise de associação dos polimorfismos *LEP* rs2167270 e *LEPR* rs2767485 com o IMC nos indivíduos com escoliose idiopática do adolescente (n = 202).

Polimorfismos	IMC \geq 25 ^a (n = 25)	IMC \leq 24.9 ^b (n = 177)	P ^c	OR (95% CI)
<i>LEP</i> rs2167270				
	n (%)			
<i>GG + GA</i>	22 (88,0)	156 (88,1)	0,60	1 ^d
<i>AA</i>	3 (12,0)	21 (11,9)		0,99 (0,27 – 3,58)
<i>G</i>	36 (72,0)	223 (63,0)	0,06	1 ^d
<i>A</i>	14 (28,0)	131 (37,0)		0,66 (0,34 – 1,27)
<i>LEPR</i> rs2767485				
<i>CC + TC</i>	14 (56,0)	60 (33,9)	0,03	1 ^d
<i>TT</i>	11 (44,0)	117 (66,1)		2,48 (1,06 – 5,80)
<i>T</i>	36 (72,0)	294 (83,1)	0,06	1 ^d
<i>C</i>	14 (28,0)	60 (16,9)		1,91 (0,97 – 3,75)

^aPacientes com baixo peso ($\leq 18,5$ kg/m²) ou peso normal (18,6 - 24,9 kg/m²). ^bPacientes com sobrepeso (≥ 25 kg/m²). ^cP-valor calculado pelo teste χ^2 ou exato de Fisher, quando necessário. ^dGrupo de referência. OR = razão de chances. IC = intervalo de confiança 95%.

Finalmente, com base nesses achados e na importância biológica do polimorfismo *LEPR* rs2767485, nós hipostenizamos o possível mecanismo sobre a via de sinalização LEP-LEPR na presença do genótipo *LEPR TT* ou do alelo *LEPR T* no desenvolvimento da EIA (**Figura 21**).

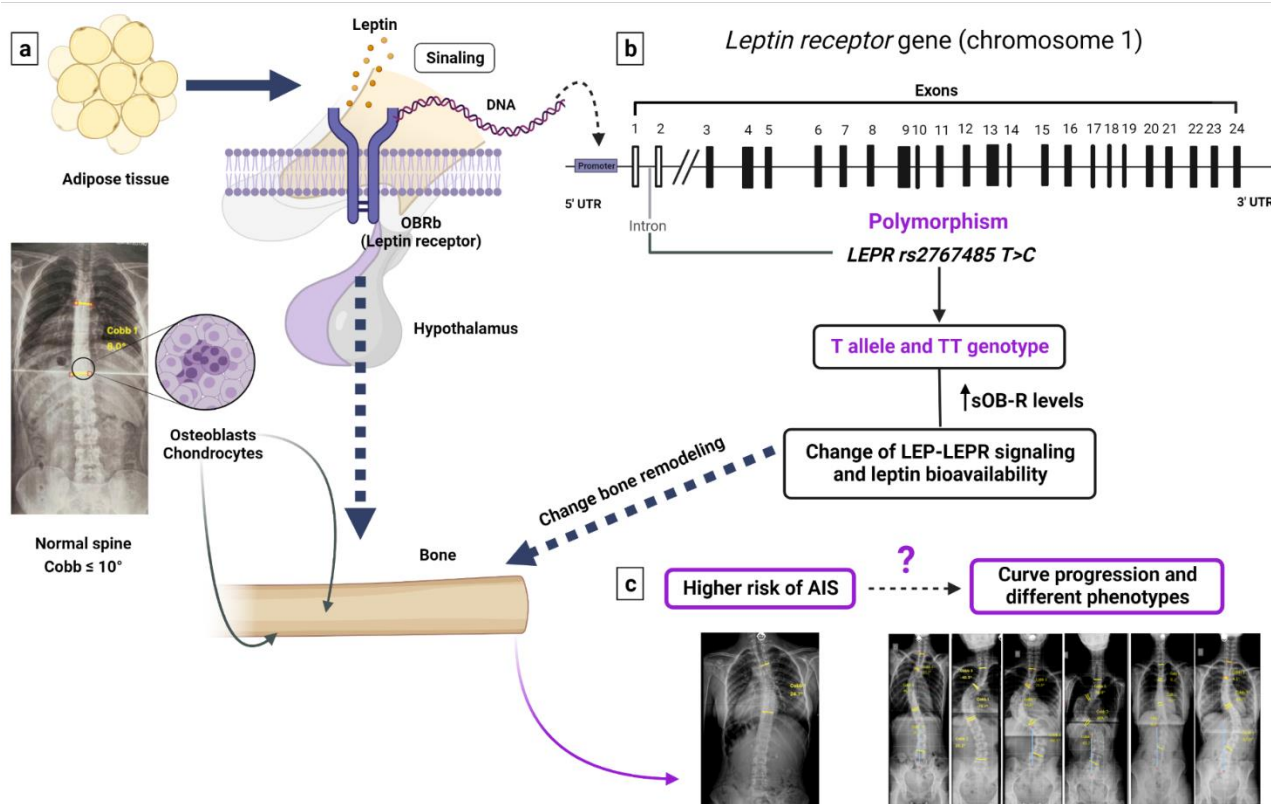


Figura 21: Hipótese sobre a influência do polimorfismo *LEPR* rs2767485 no desenvolvimento da escoliose idiopática. (a) A leptina produzida nos adipócitos se liga ao receptor OBRb no hipotálamo, que ativa o metabolismo ósseo, aumentando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos e condrócitos. (b) O polimorfismo rs2767485, que ocorre no gene *LEPR*, presente no cromossomo 1, aumenta os níveis do receptor solúvel (sOB-R) na presença do genótipo *LEPR* TT ou do alelo *LEPR* T. (c) O nível aumentado de sOB-R promove alteração na via de sinalização LEP-LEPR, impactando no metabolismo ósseo e, conseqüentemente, aumentando o risco da EIA. A progressão da cursa ou a associação com os diferentes fenótipos de curvas escolióticas na presença do polimorfismo *LEPR* rs2767485 não está claramente elucidada, já que o genótipo *LEPR* TT foi associado tanto com o grupo de pacientes com Cobb abaixo de 45° , quanto com o grupo de progressão (Cobb $\geq 45^\circ$).

DISCUSSÃO

7. Discussão

O presente estudo descreveu a associação do polimorfismo *LEPR* rs2767485 do gene envolvido na sinalização da leptina com o risco de EIA e baixo IMC em 202 pacientes atendidos em um hospital público de referência em ortopedia na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. A maioria dos pacientes com EIA eram encaminhados de outros centros para o INTO, local de recrutamento dos participantes de pesquisa. O INTO é um hospital de referência, vinculado ao MS, para atendimento de pacientes com doenças ortopédicas de alta complexidade. Entre janeiro de 2010 a janeiro de 2019 foi realizada uma busca no registro do Centro de Doenças da Coluna Vertebral do INTO para identificação dos pacientes com diagnóstico de EIA e indicação para tratamento cirúrgico. Nesse período do estudo, foi identificado que 235 pacientes já haviam realizado o procedimento cirúrgico para tratamento da deformidade e 261 pacientes aguardavam na fila para realização da cirurgia. Como os participantes do presente estudo são referenciados de outros centros, já em estágio avançado da doença, o grupo com indicação de tratamento cirúrgico da escoliose (Cobb $\geq 45^\circ$) foi significativamente mais velho do que o grupo com Cobb $< 45^\circ$. Recentemente, nosso grupo identificou que a idade contribuiu para uma chance 4 vezes maior de progressão da curva, e observou um aumento do ângulo de Cobb em torno de 1° para cada ano adicional de idade (DE AZEVEDO et al., 2022).

Baseado na teoria multifatorial descrita por Burwell (BURWELL et al., 2016), nosso grupo tem se dedicado à busca de polimorfismos genéticos, que possam estar associados ao risco de desenvolvimento e progressão da escoliose, para permitir o acompanhamento de indivíduos com fatores de riscos para progressão da doença, evitando acompanhamento frequente, número excessivo de radiografias, má qualidade de vida e altos custos com o tratamento da doença (DE AZEVEDO et al., 2022; PEDROSA et al., 2022). Nesse contexto, na busca de um biomarcador genético, destaca-se a via de sinalização da leptina, já que pacientes com EIA apresentam baixo IMC, que leva a diminuição da células gordurosas produtoras da leptina, hormônio fundamental para formação e

absorção óssea e para regular o apetite e gasto energético (MATUSIK et al., 2020; WANG et al., 2020).

Além de atuar no metabolismo ósseo, a via de sinalização LEP-LEPR regula a expressão de vários neuropeptídeos no hipotálamo, induzindo a ativação simpática e, portanto, tem sido atribuída à etiologia da EIA (LIANG et al., 2012; REID; BALDOCK; CORNISH, 2018; WANG et al., 2020). Um estudo de meta-análise observou que os níveis séricos de leptina são significativamente mais baixos e de seu receptor (sOB-R) são mais altos, em pacientes com EIA em comparação com o grupo controle (WANG et al., 2020). Tanto a leptina quanto os níveis de seus receptores podem ser modulados pela presença de polimorfismos em regiões reguladoras de seus respectivos genes (LIANG et al., 2012; SUN et al., 2010). Um estudo de GWAS envolvendo 1.504 mulheres de origem europeia descreveu que o polimorfismo *LEPR* rs2767485 foi associado a modulação dos níveis de sOB-R (SUN et al., 2010). Esse polimorfismo ocorre na região intrônica do gene *LEPR*, caracterizado pela troca de C por T. Nesse sentido, nossos achados retomam a discussão iniciada por LIU et al., 2015, que observaram a mesma associação encontrada aqui, em que o polimorfismo *LEPR* rs2767485 *T>C* está associado ao desenvolvimento da EIA, uma vez que o alelo *LEPR* T mostrou um risco de aproximadamente 1,25 vezes (IC 95% de 1,07–1,45) de ocorrência da doença. Conforme observado na população Chinesa (LIU et al., 2015), no presente trabalho, nenhum caso de EIA apresentou o genótipo *LEPR* rs2767485 *CC*, assim, os genótipos *LEPR* *TC* e *TT*, e o alelo *LEPR* *T* foram associados com o risco (~1,5 vezes) de prevalência da EIA na população brasileira. Até onde sabemos, nenhum outro estudo avaliou a influência do polimorfismo *LEPR* rs2767485 na suscetibilidade genética da escoliose.

A população brasileira destaca-se pela extensa miscigenação, formada, principalmente, por três raízes ancestrais diferentes: Ameríndios, Europeus e Africanos. Portanto, extrapolar dados de outros grupos étnicos não é apropriado (SUAREZ-KURTZ et al., 2010). No presente estudo, a

distribuição de frequência do *LEPR* rs2767485 no grupo controle foi similar a descrita em outro estudo envolvendo indivíduos brasileiros (n = 76) sem escoliose, já que a frequência do alelo *LEPR* C foi de 28,8% (CORGOSINHO et al., 2017) e no grupo controle (n = 555) do presente estudo foi 24,4 %. A ausência do genótipo *LEPR* rs2767485 CC no grupo de casos de EIA deve ter contribuído para a falta de EHW apenas neste grupo, o que apoiou o achado relevante e mais antigo sobre o nível sOB-R significativamente aumentado em pacientes com EIA em comparação com meninas saudáveis normais (LIU et al., 2012). Dessa forma, nas análises de associação do polimorfismo com o risco de EIA, utilizamos o genótipo *LEPR* rs2767485 CC como referência e adotamos o modelo dominante, combinando os genótipos *LEPR* TC + TT. Assim, houve um efeito protetor do genótipo *LEPR* rs2767485 CC para a ocorrência da escoliose na população brasileira, de acordo com resultados encontrados na população Chinesa (LIU et al., 2015).

Em contraste, considerando o polimorfismo analisado do gene que codifica a leptina, não foi observada associação do *LEP* rs2167270 com a suscetibilidade da EIA na população brasileira. Esse polimorfismo ocorre na região regulatória (5'UTR) do gene, caracterizado pela substituição de uma G por A na posição 19 e, portanto, pode influenciar a tradução do mRNA e alterar os níveis da proteína (LIANG et al., 2012). Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar esse polimorfismo com a ocorrência e gravidade da EIA. LIANG et al., 2012 selecionaram seis tags SNPs do gene da leptina e não encontraram associação significativa com suscetibilidade ou gravidade da EIA. No entanto, os autores observaram uma baixa leptina sérica nesses pacientes, sugerindo que esse evento seja possivelmente secundário, podendo estar relacionado à baixa capacidade de adipogênese (LIANG et al., 2021).

A relação exata entre a etiologia da escoliose idiopática, os níveis de leptina, o IMC e os fatores genéticos continua sendo uma área obscura e controversa. Nossos achados provavelmente irão contribuir como base para pesquisas futuras para tentar identificar a etiologia da doença. Com

base no efeito de risco do polimorfismo *LEPR* rs2767485 com a suscetibilidade genética da EIA (LIU et al., 2015), neste trabalho foi possível propor uma hipótese sobre o possível papel desse polimorfismo na via de sinalização da LEP-LEPR e o desenvolvimento da escoliose (**Figura 20**). Os receptores de leptina são amplamente expressos no hipotálamo e, além do efeito anabólico direto que a leptina exerce sobre os osteoblastos e condrócitos, também atua indiretamente pela ligação ao LEPR no hipotálamo, modulando a formação óssea. Efeitos importantes sobre o esqueleto ocorrem devido à atuação da leptina como reguladora da homeostase energética, da função hipotálamo-hipofisária e dos níveis hormonais (REID; BALDOCK; CORNISH, 2018). O polimorfismo rs2767485 *T>C* no gene *LEPR* já foi associado à modulação dos níveis plasmáticos de sOB-R (SUN et al., 2010) e IMC (CORGOSINHO et al., 2017; HELGELAND et al., 2019), uma vez que o alelo *LEPR* rs2767485 *T* ou genótipo *TT* foram associados a níveis mais altos de sOB-R (SUN et al., 2010). Assim, o polimorfismo *LEPR* rs2767485 pode alterar a via de sinalização LEP-LEPR, induzindo a biodisponibilidade anormal da leptina e, portanto, alterando a remodelação óssea e contribuindo para o risco de desenvolvimento de EIA. Além disso, o polimorfismo *LEPR* rs2767485 também pode contribuir para determinar o IMC em pacientes com escoliose, exercendo efeitos modificadores na via de sinalização LEP-LEPR. GORGOSINHO e colegas observaram que esse polimorfismo pode regular o processo de perda de peso, havendo uma maior redução do IMC em pacientes com o genótipo *LEPR* rs2767485 *TT* (CORGOSINHO et al., 2017). Nesse sentido, no presente estudo, o genótipo *LEPR* rs2767485 *TT* foi mais frequente nos casos de EIA com menor IMC ($\leq 24,9$). Assim, o polimorfismo *LEPR* rs2767485 foi associado com o risco de baixo IMC em pacientes com EIA.

Além dos fatores genéticos, algumas características já conhecidas estão associadas com a progressão da curva da escoliose, como: idade abaixo dos 12 anos, estado pré-menarca, pico de velocidade elevado, estágio de Tanner e Risser, estado da cartilagem trirradiada, ângulo de Cobb da curva principal no diagnóstico e localização da curva principal (FALDINI et al., 2022). Portanto,

essas variáveis devem ser avaliadas como fatores de risco no acompanhamento dos pacientes com escoliose. No presente estudo, o polimorfismo *LEPR* rs2767485 foi associado ao risco de EIA, tanto nos casos sem indicação de tratamento cirúrgico (Cobb < 45°) quanto no grupo de casos graves da doença (Cobb ≥ 45°). Recentemente, nosso grupo também mostrou a associação dos polimorfismos nos genes *FBNI* e *PAX-1* com a suscetibilidade da EIA na população brasileira. No entanto, o polimorfismo *FBNI* rs12916536 foi associado apenas à suscetibilidade da EIA e não à gravidade da doença (Cobb ≥ 45°) em um estudo envolvendo 185 casos de EIA (DE AZEVEDO et al., 2022). Em contraste, o polimorfismo *PAX-1* rs6137473 foi associado ao modificador lombar B e C, em comparação com A, em 59 pacientes com indicação cirúrgica de correção de escoliose (PEDROSA et al., 2022).

Algumas limitações do presente estudo devem ser mencionadas. Primeiro, o pequeno número em cada subgrupo de gravidade da doença, considerando o ângulo de Cobb (<45° ou ≥45°) ou os subgrupos de classificação da escoliose, como a descrita por Lenke. Em segundo lugar, a real influência dos polimorfismos nos genes *LEP* e *LEPR* nos níveis de leptina e na expressão de sOB-R não foram diretamente avaliadas, já que não foi previsto no projeto original a coleta de material biológico adequado para quantificar os níveis desse hormônio e seu receptor. Em terceiro lugar, as informações sobre os pacientes passíveis de tratamento com colete, o estado nutricional e as informações do IMC deveriam ter sido coletados ao longo do acompanhamento médico. Por exemplo, o IMC mais baixo foi associado à suscetibilidade da EIA e à gravidade da doença (DE AZEVEDO et al., 2022; MATUSIK et al., 2020; NORMAND; FRANCO; MARCIL, 2020). No entanto, nossos resultados estão de acordo com um estudo recente que observou IMC significativamente menor em pacientes com curvas superiores a 45° em comparação com o grupo de Cobb abaixo de 45° (MATUSIK et al., 2020). Por fim, acreditamos que o papel dos polimorfismos nos genes *LEP* e *LEPR* na gravidade e desenvolvimento da EIA ainda demandam de futuras investigações. Sugerimos que

um estudo longitudinal seja necessário para tentar identificar outros fatores não modificáveis que possam estar associados com o desenvolvimento da EIA. Por exemplo, estudar polimorfismos que ocorrem em forte desequilíbrio de ligação com o *LEPR* rs2767485 (rs12079231, rs12062820, rs11208656, rs1782755, rs1627238, rs1171275, rs1180445, rs11208656, rs1782755, rs1627238, rs1171275, rs1180445, rs171712rs), que também já foram associados com alterações nos níveis do receptor (SUN et al., 2010).

Nosso estudo também tem pontos fortes distintos: é o primeiro relato da distribuição de frequência de dois polimorfismos envolvidos na via de sinalização LEP-LEPR em uma população miscigenada, reunindo duas teorias precursoras (metabólica e genética), que desempenham papéis fundamentais na etiologia da EIA (DE AZEVEDO et al., 2022; FALDINI et al., 2022; LIANG et al., 2012; MIYAGI et al., 2021; WANG et al., 2020). Em segundo lugar, validamos a mesma associação observada em indivíduos Chineses com EIA, de que o polimorfismo *LEPR* rs2767485 foi associado ao risco de desenvolvimento da doença. Em terceiro lugar, todos os participantes foram avaliados por experientes cirurgiões de coluna, confirmando o diagnóstico de acordo com a gravidade da doença (Cobb $<45^\circ$ ou $\geq 45^\circ$) e excluindo as deformidades da coluna no grupo controle. Finalmente, o presente estudo mostrou a realidade do diagnóstico e tratamento da escoliose em um hospital público terciário de um país em desenvolvimento. Por se tratar de uma doença idiopática e multifatorial, aliar pesquisa e assistência médica na identificação de biomarcadores genéticos e no desenho de estudos clínicos adequados, permite fornecer subsídios adicionais para o planejamento do tratamento, a fim de identificar indivíduos em risco de desenvolvimento e progressão da doença.

CONCLUSÃO

8. Conclusão

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que o alelo *LEPR* rs2767485 *T* e os genótipos *LEPR TC* e *TT* são fatores de risco não modificáveis para o desenvolvimento da EIA, além de risco para apresentar baixo IMC em casos de EIA. Juntos, estes resultados podem contribuir para a compreensão da etiologia da doença, permitindo identificar biomarcadores genéticos que possam ser utilizados na prática clínica para acompanhamento dos indivíduos em risco, para nortear a conduta de tratamento e melhorar a qualidade de vida dos pacientes que sofrem com escoliose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

AGABEGI, S. S. et al. Natural History of Adolescent Idiopathic Scoliosis in Skeletally Mature Patients: A Critical Review. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 23, n. 12, p. 714–723, dez. 2015.

ALTSHULER, D.; DALY, M. J.; LANDER, E. S. Genetic Mapping in Human Disease. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 881–888, 7 nov. 2008.

ANDERSEN, M. O.; THOMSEN, K.; KYVIK, K. O. Adolescent Idiopathic Scoliosis in Twins: A Population-Based Survey. **Spine**, v. 32, n. 8, p. 927–930, abr. 2007.

BALDOCK, P. A. et al. Hypothalamic Regulation of Cortical Bone Mass: Opposing Activity of Y2 Receptor and Leptin Pathways. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 10, p. 1600–1607, 17 jul. 2006.

BUCHAN, J. G. et al. Rare variants in FBN1 and FBN2 are associated with severe adolescent idiopathic scoliosis. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 19, p. 5271–5282, 1 out. 2014.

BURWELL, R. G. et al. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS): a multifactorial cascade concept for pathogenesis and embryonic origin. **Scoliosis and Spinal Disorders**, v. 11, n. 1, p. 8, dez. 2016a.

BURWELL, R. G. et al. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS): a multifactorial cascade concept for pathogenesis and embryonic origin. **Scoliosis and Spinal Disorders**, v. 11, n. 1, dez. 2016b.

CHEN, H.-H. et al. Effects of Sex and Obesity on LEP Variant and Leptin Level Associations in Intervertebral Disc Degeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12275, 14 out. 2022.

CHENG, J. C. et al. Adolescent idiopathic scoliosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15030, 24 set. 2015a.

CHEUNG, J. P. Y. et al. Does Curve Regression Occur During Underarm Bracing in Patients with Adolescent Idiopathic Scoliosis? **Clinical Orthopaedics & Related Research**, v. 478, n. 2, p. 334–345, fev. 2020.

CHU, W. C. et al. Relative shortening and functional tethering of spinal cord in adolescent scoliosis – Result of asynchronous neuro-osseous growth, summary of an electronic focus group debate of the IBSE. **Scoliosis**, v. 3, n. 1, dez. 2008.

CLARK, E. M. et al. Association Between Components of Body Composition and Scoliosis: A Prospective Cohort Study Reporting Differences Identifiable Before the Onset of Scoliosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 8, p. 1729–1736, ago. 2014.

CORGOSINHO, F. C. et al. LEPR polymorphism may affect energy balance during weight loss among Brazilians obese adolescents. **Neuropeptides**, v. 66, p. 18–24, dez. 2017.

CRAMER, G. D.; DARBY, S. A. **Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and ANS-E-Book**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2017.

DE AZEVEDO, G. B. L. et al. Association of FBN1 polymorphism with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 23, n. 1, p. 430, dez. 2022.

DESAI, S. K. et al. The lasting legacy of Paul Randall Harrington to pediatric spine surgery: historical vignette. **Journal of Neurosurgery. Spine**, v. 18, n. 2, p. 170–177, fev. 2013.

DICKSON, J. H.; ERWIN, W. D.; ROSSI, D. Harrington instrumentation and arthrodesis for idiopathic scoliosis. A twenty-one-year follow-up. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 72, n. 5, p. 678–683, jun. 1990.

EL-HAWARY, R.; CHUKWUNYERENWA, C. Update on Evaluation and Treatment of Scoliosis. **Pediatric Clinics of North America**, v. 61, n. 6, p. 1223–1241, dez. 2014.

FADZAN, M.; BETTANY-SALTIKOV, J. Etiological Theories of Adolescent Idiopathic Scoliosis: Past and Present. **The Open Orthopaedics Journal**, v. 11, n. 1, p. 1466–1489, 29 dez. 2017a.

GRAUERS, A.; EINARSDOTTIR, E.; GERDHEM, P. Genetics and pathogenesis of idiopathic scoliosis. **Scoliosis and Spinal Disorders**, v. 11, n. 1, dez. 2016.

GRAUERS, A.; RAHMAN, I.; GERDHEM, P. Heritability of scoliosis. **European Spine Journal**, v. 21, n. 6, p. 1069–1074, jun. 2012.

GSTOETTNER, M. et al. Inter- and intraobserver reliability assessment of the Cobb angle: manual versus digital measurement tools. **European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society**, v. 16, n. 10, p. 1587–1592, out. 2007.

HARRINGTON, P. R. Treatment of scoliosis: correction and internal fixation by spine instrumentation. June 1962. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 84-A, n. 2, p. 316, fev. 2002.

HAWARY, R. E. et al. Brace treatment in adolescent idiopathic scoliosis: risk factors for failure—a literature review. **The Spine Journal**, v. 19, n. 12, p. 1917–1925, dez. 2019.

HELGELAND, Ø. et al. Genome-wide association study reveals dynamic role of genetic variation in infant and early childhood growth. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4448, 1 out. 2019.

HERRING, J. A. **Tachdjian's pediatric orthopaedics e-book: from the Texas Scottish Rite Hospital for Children**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2013.

HIBBS, R. A. THE CLASSIC: An Operation for Progressive Spinal Deformities: A Preliminary Report of Three Cases From the Service of the Orthopaedic Hospital. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 460, p. 17–20, jul. 2007.

INOUE, M. et al. Idiopathic scoliosis in twins studied by DNA fingerprinting: the incidence and type of scoliosis. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume**, v. 80, n. 2, p. 212–217, mar. 1998.

KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. 1, p. 37, dez. 2015.

KAROL, L. A. et al. Progression of the curve in boys who have idiopathic scoliosis. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 75, n. 12, p. 1804–1810, dez. 1993.

KESLING, K. L.; REINKER, K. A. Scoliosis in twins. A meta-analysis of the literature and report of six cases. **Spine**, v. 22, n. 17, p. 2009–2014; discussion 2015, 1 set. 1997.

KONIECZNY, M. R.; HIERONYMUS, P.; KRAUSPE, R. Time in brace: where are the limits and how can we improve compliance and reduce negative psychosocial impact in patients with scoliosis? A retrospective analysis. **The Spine Journal**, v. 17, n. 11, p. 1658–1664, nov. 2017.

KONIECZNY, M. R.; SENYURT, H.; KRAUSPE, R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. **Journal of Children’s Orthopaedics**, v. 7, n. 1, p. 3–9, fev. 2013a.

KOSTUIK, J. P. The History of Spinal Deformity. **Spine Deformity**, v. 3, n. 5, p. 417–425, set. 2015.

KOU, I. et al. Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. **Nature Genetics**, v. 45, n. 6, p. 676–679, jun. 2013.

LANDAUER, F.; TRIEB, K. Scoliosis: Brace treatment – from the past 50 years to the future. **Medicine**, v. 101, n. 37, p. e30556, 16 set. 2022.

LANGENSIEPEN, S. et al. Measuring procedures to determine the Cobb angle in idiopathic scoliosis: a systematic review. **European Spine Journal**, v. 22, n. 11, p. 2360–2371, nov. 2013.

LIANG, G. et al. Normal Leptin Expression, Lower Adipogenic Ability, Decreased Leptin Receptor and Hyposensitivity to Leptin in Adolescent Idiopathic Scoliosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36648, 15 maio 2012.

LIANG, Z. et al. The role of endocrine hormones in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 9, set. 2021.

LILJENQVIST, U. R.; LINK, T. M.; HALM, H. F. Morphometric analysis of thoracic and lumbar vertebrae in idiopathic scoliosis. **Spine**, v. 25, n. 10, p. 1247–1253, 15 maio 2000.

LINKER, B. A dangerous curve: the role of history in America's scoliosis screening programs. **American Journal of Public Health**, v. 102, n. 4, p. 606–616, abr. 2012.

LIU, R. W. et al. Comparison of Supine Bending, Push-Prone, and Traction Under General Anesthesia Radiographs in Predicting Curve Flexibility and Postoperative Correction in Adolescent Idiopathic Scoliosis: **Spine**, v. 35, n. 4, p. 416–422, fev. 2010.

LIU, Z. et al. Abnormal Leptin Bioavailability in Adolescent Idiopathic Scoliosis: An Important New Finding. **Spine**, v. 37, n. 7, p. 599–604, abr. 2012.

LIU, Z. et al. Polymorphism of rs2767485 in Leptin Receptor Gene is Associated With the Occurrence of Adolescent Idiopathic Scoliosis: **Spine**, v. 40, n. 20, p. 1593–1598, out. 2015.

MARYA, S. et al. Adolescent idiopathic scoliosis: a review of aetiological theories of a multifactorial disease. **The Bone & Joint Journal**, v. 104-B, n. 8, p. 915–921, 1 ago. 2022.

MATUSIK, E. et al. Association between Bone Turnover Markers, Leptin, and Nutritional Status in Girls with Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS). **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2657, 31 ago. 2020.

MOE, J. H. A critical analysis of methods of fusion for scoliosis; an evaluation in two hundred and sixty-six patients. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 40-A, n. 3, p. 529- 554 passim, jun. 1958.

MÓROCZ, M. et al. Association Study of BMP4, IL6, Leptin, MMP3, and MTNR1B Gene Promoter Polymorphisms and Adolescent Idiopathic Scoliosis: **Spine**, v. 36, n. 2, p. E123–E130, jan. 2011.

NEGRINI, S. et al. 2016 SOSORT guidelines: orthopaedic and rehabilitation treatment of idiopathic scoliosis during growth. **Scoliosis and Spinal Disorders**, v. 13, n. 1, p. 3, dez. 2018a.

NETO, M. Í. R. et al. Análise da reprodutibilidade intra e interobservadores das classificações de King e Lenke para Escoliose Idiopática do Adolescente. [s.d.].

NIKOLOVA, S. et al. In Search of Biomarkers for Idiopathic Scoliosis: *Leptin* and *BMP4* Functional Polymorphisms. **Journal of Biomarkers**, v. 2015, p. 1–5, 2 ago. 2015.

OGURA, Y. et al. A Functional SNP in BNC2 Is Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis. **American Journal of Human Genetics**, v. 97, n. 2, p. 337–342, 6 ago. 2015.

PEDROSA, A. et al. Polymorphisms in paired box 1 gene were associated with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis: A case–control study. **Journal of Craniovertebral Junction and Spine**, v. 13, n. 3, p. 318, 2022.

PRUIJS, J. E. et al. Variation in Cobb angle measurements in scoliosis. **Skeletal Radiology**, v. 23, n. 7, p. 517–520, out. 1994.

PUNO, R. M. et al. Treatment recommendations for idiopathic scoliosis: an assessment of the Lenke classification. **Spine**, v. 28, n. 18, p. 2102–2114; discussion 2114-2115, 15 set. 2003.

QIU, Y. et al. Decreased Circulating Leptin Level and Its Association With Body and Bone Mass in Girls With Adolescent Idiopathic Scoliosis: **Spine**, v. 32, n. 24, p. 2703–2710, nov. 2007.

REID, I. R.; BALDOCK, P. A.; CORNISH, J. Effects of Leptin on the Skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 6, p. 938–959, 1 dez. 2018.

RICHARDS, B. S. Lumbar curve response in type II idiopathic scoliosis after posterior instrumentation of the thoracic curve. **Spine**, v. 17, n. 8 Suppl, p. S282-286, ago. 1992.

RISSER, J. C. The Iliac apophysis; an invaluable sign in the management of scoliosis. **Clinical Orthopaedics**, v. 11, p. 111–119, 1958.

RISSER, J. C. The classic: The iliac apophysis: an invaluable sign in the management of scoliosis. 1958. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 468, n. 3, p. 643–653, mar. 2010.

RODRIGO, I. Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. **Development**, v. 130, n. 3, p. 473–482, 1 fev. 2003.

ROGALA, E. J.; DRUMMOND, D. S.; GURR, J. Scoliosis: incidence and natural history. A prospective epidemiological study. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 60, n. 2, p. 173–176, 1 mar. 1978.

SHARMA, S. et al. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 7, p. 1456–1466, 1 abr. 2011.

SUAREZ-KURTZ, G. et al. *VKORC1* polymorphisms in Brazilians: comparison with the Portuguese and Portuguese-speaking Africans and pharmacogenetic implications. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 9, p. 1257–1267, set. 2010.

SUN, Q. et al. Genome-wide association study identifies polymorphisms in LEPR as determinants of plasma soluble leptin receptor levels. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 9, p. 1846–1855, 1 maio 2010.

TAKAHASHI, Y. et al. A genome-wide association study identifies common variants near *LBX1* associated with adolescent idiopathic scoliosis. **Nature Genetics**, v. 43, n. 12, p. 1237–1240, dez. 2011.

TAMBORNINO, J. M.; ARMBRUST, E. N.; MOE, J. H. HARRINGTON INSTRUMENTATION IN CORRECTION OF SCOLIOSIS. A COMPARISON WITH CAST CORRECTION. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 46, p. 313–321, mar. 1964.

THALER, M. et al. Radiographic versus ultrasound evaluation of the Risser Grade in adolescent idiopathic scoliosis: a prospective study of 46 patients. **European Spine Journal**, v. 17, n. 9, p. 1251–1255, set. 2008.

THÉROUX, J. et al. Prevalence of low back pain in adolescents with idiopathic scoliosis: a systematic review. **Chiropractic & Manual Therapies**, v. 25, n. 1, dez. 2017.

VASILADIS, E. S.; GRIVAS, T. B.; KASPIRIS, A. Historical overview of spinal deformities in ancient Greece. **Scoliosis**, v. 4, p. 6, 25 fev. 2009a.

WANG, D. et al. Abnormal cerebral cortical thinning pattern in adolescent girls with idiopathic scoliosis. **NeuroImage**, v. 59, n. 2, p. 935–942, jan. 2012.

WANG, J. et al. Measurement of scoliosis Cobb angle by end vertebra tilt angle method. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 13, 4 set. 2018.

WANG, Q. et al. Disordered leptin and ghrelin bioactivity in adolescent idiopathic scoliosis (AIS): a systematic review and meta-analysis. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 15, n. 1, p. 502, dez. 2020.

WARD, K. et al. Polygenic inheritance of adolescent idiopathic scoliosis: A study of extended families in Utah. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152A, n. 5, p. 1178–1188, maio 2010a.

WATANABE, K. et al. Health-Related Quality of Life in Nonoperated Patients With Adolescent Idiopathic Scoliosis in the Middle Years: A Mean 25-Year Follow-up Study. **Spine**, v. 45, n. 2, p. E83–E89, 15 jan. 2020.

WEINSTEIN, S. L. et al. Adolescent idiopathic scoliosis. v. 371, 2008.

WU, T. et al. Role of Enhanced Central Leptin Activity in a Scoliosis Model Created in Bipedal Amputated Mice: **Spine**, v. 40, n. 19, p. E1041–E1045, out. 2015.

WYNNE-DAVIES, R. Genetic aspects of idiopathic scoliosis. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 15, n. 6, p. 809–811, dez. 1973.

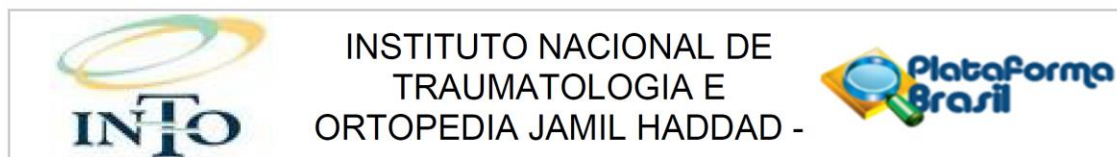
ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–432, dez. 1994.

ZHAO, L.; ROFFEY, D. M.; CHEN, S. Association Between the Estrogen Receptor Beta (ESR2) Rs1256120 Single Nucleotide Polymorphism and Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Spine**, v. 42, n. 11, p. 871–878, 1 jun. 2017.

ZHU, F. et al. Comparison of Surgical Outcome of Adolescent Idiopathic Scoliosis and Young Adult Idiopathic Scoliosis: A Match-Pair Analysis of 160 Patients. **Spine**, 6 fev. 2017.

ANEXOS

ANEXO I. Aprovação do Comitê de Ética institucional.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Comparação dos resultados radiográficos no tratamento das escolioses idiopáticas Lenke 1 e 2, utilizando a linha centro sacral com parâmetro de escolha da última vértebra instrumentada

Pesquisador: ANTONIO EULALIO PEDROSA ARAUJO JUNIOR

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 73527617.4.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.767.503

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda a projeto de pesquisa de aluno do Mestrado Profissional do INTO que propõe a análise dos resultados radiográficos do tratamento da escoliose idiopática Lenke 1 e 2. A escoliose idiopática do adolescente acomete 2 A 3% da população, sendo que o tratamento cirúrgico da escoliose está indicado em curvas maiores de 45°. As escolioses classificadas por Lenke como 1 e 2 são as que geram mais contradição entre cirurgiões em relação a última vértebra a ser instrumentada, sendo esta escolha podendo ser baseada em vários parâmetros radiográficos. Será realizado um estudo para avaliar os parâmetros radiográficos correlacionados com descompensação coronal nas curvas Lenke 1 e 2, e avaliar se existe alguma alteração genética associada à sua doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os parâmetros radiográficos correlacionados com descompensação coronal nas curvas Lenke 1 e 2, e avaliar a associação de polimorfismos genéticos com o desenvolvimento da escoliose.

Objetivo Secundário:

Avaliar a real necessidade das radiografias em inclinação nas curvas 1 e 2, como parâmetro de escolha, se a flexibilidade da curva interfere na

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

ANEXO II. Termo de compromisso livre e esclarecido.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (De acordo com as normas da Resolução do CNS nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: Comparação dos resultados radiográficos no tratamento das escolioses idiopáticas Lenke 1 e 2, utilizando a linha centro sacral com parâmetro de escolha da última vértebra instrumentada. Você foi selecionado por apresentar o padrão cirúrgico de escoliose idiopática Lenke 1 ou 2 e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição e nem com a conduta do tratamento que você está recebendo no INTO.

O objetivo deste estudo é avaliar os parâmetros radiográficos correlacionados com descompensação coronal nas curvas Lenke 1 e 2, e avaliar se existe alguma alteração genética associada à sua doença.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em uma colheita de saliva para a identificação de alterações genéticas que possam estar associadas às escolioses idiopáticas Lenke 1 e 2, e também irá permitir a coleta de dados do seu prontuário. Para a colheita de saliva é utilizado um cotonete estéril na parte interna da bochecha. A colheita da saliva será realizada na Unidade de pesquisa Clínica do INTO. Não há risco adicional se você participar desta pesquisa. Todas as etapas do tratamento serão as mesmas com ou sem a sua participação na pesquisa.

Esta pesquisa não oferece benefícios diretos a você. O benefício principal da sua participação é que no futuro poderá ajudar a melhorar o diagnóstico e/ou tratamento de outras pessoas com escoliose. O teste que será realizado vai identificar as alterações genéticas que podem ou não estar associados ao desenvolvimento da escoliose. No futuro, quando o estudo for concluído, o que pode demorar até um ano, o pesquisador responsável entrará em contato para agendar uma nova consulta para orientação quanto ao resultado do exame realizado no INTO. As amostras coletadas serão utilizadas apenas para realização deste estudo, sendo devidamente descartadas para o encerramento do projeto. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados da pesquisa serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a sua identidade.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para o participante, outra para o pesquisador e uma para ser anexada ao prontuário do participante, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Pesquisador responsável: Antonio Eulalio Pedrosa Araujo Junior

Contato com o pesquisador responsável:

Endereço: Avenida Brasil, 500, 5º andar. Telefone: 2134-5499

e-mail: eulaliojunior@superig.com.br

**Responsável pela aplicação do termo
Assinatura e carimbo**

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Participante da pesquisa: _____

Assinatura do participante da pesquisa

Folha 1 de 1

ANEXO III. Instrumento de coleta de dados.

ID: OSE-0 _____

Material Biológico () Swab () Sangue

Projeto: Estudo de poliformismos genéticos relacionados ao desenvolvimento da escoliose idiopática.

Centro Coleta: () INTO () _____

Nome: _____

Prontuário: _____ **Sexo:** ()feminino ()masculino

Data de nascimento: ____/____/____ **Peso:** _____ kg **Altura:** _____ cm

Idade: ____ anos e ____ meses

Data cirurgia: (se aplicável) ____/____/____ **Idade na cirurgia:** _____

Risser: () zero ()I ()II ()III ()IV ()V **Cartilagem trirradiada aberta?** () sim () não

Vértebra neutra (p Nas -Moe): _____ **Vértebra final da curva (end-vertebra):** _____

Vértebra ápice da curva: **Torácica Principal:** _____ **Lombar:** _____

Nash Moe: **Ápice torácico:** _____ **Ápice lombar :** _____

Classificação de Lenke: Tipo de curva: 1() 2() 3() 4() 5() 6()

Modificador Lombar (CSVL): ()A ()B ()C

Modificador Sagital T5-T12: () hipo ()normal c() hiper

Classificação final: _____

LSTV : _____ **LTV:** _____

Vértebra Sagital Estável : _____

ANEXO IV. Manuscrito submetido para publicação.

European Spine Journal

Association of polymorphism in leptin receptor gene with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:							
Full Title:	Association of polymorphism in leptin receptor gene with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis						
Article Type:	Original Article						
Keywords:	Adolescent idiopathic scoliosis; Leptin; Leptin receptor; Genetic polymorphisms.						
Corresponding Author:	Jamila Alessandra Perini, PhD UERJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, BRAZIL						
Corresponding Author Secondary Information:							
Corresponding Author's Institution:	UERJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro						
Corresponding Author's Secondary Institution:							
First Author:	Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior						
First Author Secondary Information:							
Order of Authors:	Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior Gustavo Borges Laurindo de Azevedo Luis Antonio Medeiros Moliterno Renato Henriques Tavares Jéssica Vilarinho Cardoso Giuliana Rodrigues Souza João Antonio Matheus Guimarães Helton Luiz Aparecido Defino Jamila Alessandra Perini, PhD						
Order of Authors Secondary Information:							
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (309065/2021-6)</td> <td>PharmD, PhD Jamila Alessandra Perini</td> </tr> <tr> <td>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)</td> <td>MD, DSc Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior</td> </tr> <tr> <td>Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (001)</td> <td>PharmD, PhD Jamila Alessandra Perini</td> </tr> </table>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (309065/2021-6)	PharmD, PhD Jamila Alessandra Perini	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	MD, DSc Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (001)	PharmD, PhD Jamila Alessandra Perini
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (309065/2021-6)	PharmD, PhD Jamila Alessandra Perini						
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	MD, DSc Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior						
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (001)	PharmD, PhD Jamila Alessandra Perini						
Abstract:	<p>Purpose: Abnormal leptin bioavailability has play key roles in the etiology of adolescent idiopathic scoliosis (AIS). Both leptin and its receptor levels may be modulated by the presence of genetic polymorphisms. This study aimed to evaluate the role of polymorphisms in the leptin (LEP) and its main receptor (LEPR) genes in the AIS susceptibility.</p> <p>Methods: A retrospective case-control study was conducted with 202 AIS and 555 controls. LEP rs2167270 and LEPR rs2767485 polymorphisms were genotyped using a TaqMan validated assay. Associations were evaluated by odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI).</p> <p>Results: The AIS group showed a predominance of females (n=189, 93.6% and</p>						

14.5:1), 150 (74.3%) were under 18 years old (16.7 ± 5.4), 177 (87.6%) had low or normal BMI (20.6 ± 4.4 kg/m²), 119 (58.9%) had Cobb $\geq 45^\circ$ ($49.1\pm 16.3^\circ$) and 140 (69.3%) were skeletally mature. Minor allele frequencies of rs2167270 and rs2767485 were 35.9% and 18.3%, for AIS and 37.0% and 24.4% for controls, respectively. LEPR rs2767485 T and TC+TT were associated with higher risk of AIS (OR=1.44; 95% CI=1.1-1.9 and OR=1.38; 95% CI=1.3-1.4, respectively), since CC genotype was only present in the group without spinal disease (control). In addition, the LEPR rs2767485 TT was more frequent in low weight (BMI ≤ 24.9) group of AIS patients. There was no significant association between LEP rs2167270 and AIS susceptibility or BMI. Conclusion: The LEPR rs2767485 polymorphism was associated with the genetic susceptibility of AIS and low BMI. These data can contribute to the identification of genetic biomarkers to improve the diagnosis and treatment.

Association of polymorphism in leptin receptor gene with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis

Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior^{1,2}, Gustavo Borges Laurindo de Azevedo^{1,2}, Luis Antonio Medeiros Moliterno^{1,2}, Renato Henriques Tavares¹, Jessica Vilarinho Cardoso³, Giuliana Rodrigues Souza^{3,4}, João Antonio Matheus Guimarães⁴, Helton Luiz Aparecido Defino², Jamila Alessandra Perini^{3*}

¹Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Centro de Cirurgia da Coluna, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Ortopedia e Anestesiologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil;

³Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LAPESF), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁴Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Divisão de Pesquisa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Corresponding author: Jamila Perini, Pharmaceutical Sciences Research Laboratory (LAPESF), State University of Rio de Janeiro (UERJ) (<https://lapesfuezo.wixsite.com/website>). Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1.203. Zip-code: 23070-200, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail address: jamilaperini@yahoo.com.br.

Declarations

Funding

This work was supported by the Brazilian agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Funding body contributed to acquisition of research inputs.

Conflict of interest

The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, Brazil (protocol number 73527617.4.0000.5273). All participating provided written informed consent. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Authors' contributions

Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior, Helton Luiz Aparecido Defino and Jamila Alessandra Perini participated in conception and design of study. Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior, Gustavo Borges Laurindo de Azevedo, Luis Antonio Medeiros Moliterno, Renato Henriques Tavares and Jamila Alessandra Perini collated the data and developed the database. Jessica Vilarinho Cardoso, Giuliana Rodrigues Souza and Jamila Alessandra Perini performed the experiments and statistical analysis. Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior, Jessica Vilarinho Cardoso and Jamila Alessandra Perini carried out the analysis and interpretation of the data and wrote the manuscript. João Antonio Matheus Guimarães and Helton Luiz Aparecido Defino participated in the critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Association of polymorphism in leptin receptor gene with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis

Abstract

Purpose: Abnormal leptin bioavailability has play key roles in the etiology of adolescent idiopathic scoliosis (AIS). Both leptin and its receptor levels may be modulated by the presence of genetic polymorphisms. This study aimed to evaluate the role of polymorphisms in the leptin (LEP) and its main receptor (LEPR) genes in the AIS susceptibility.

Methods: A retrospective case-control study was conducted with 202 AIS and 555 controls. *LEP* rs2167270 and *LEPR* rs2767485 polymorphisms were genotyped using a TaqMan validated assay. Associations were evaluated by odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI).

Results: The AIS group showed a predominance of females (n=189, 93.6% and 14.5:1), 150 (74.3%) were under 18 years old (16.7 ± 5.4), 177 (87.6%) had low or normal BMI (20.6 ± 4.4 kg/m²), 119 (58.9%) had Cobb $\geq 45^\circ$ ($49.1\pm 16.3^\circ$) and 140 (69.3%) were skeletally mature. Minor allele frequencies of rs2167270 and rs2767485 were 35.9% and 18.3%, for AIS and 37.0% and 24.4% for controls, respectively. *LEPR* rs2767485 *T* and *TC+TT* were associated with higher risk of AIS (OR=1.44; 95% CI=1.1-1.9 and OR=1.38; 95% CI=1.3-1.4, respectively), since *CC* genotype was only present in the group without spinal disease (control). In addition, the *LEPR* rs2767485 *TT* was more frequent in low weight (BMI ≤ 24.9) group of AIS patients. There was no significant association between *LEP* rs2167270 and AIS susceptibility or BMI.

Conclusion: The *LEPR* rs2767485 polymorphism was associated with the genetic susceptibility of AIS and low BMI. These data can contribute to the identification of genetic biomarkers to improve the diagnosis and treatment.

Key-words: Adolescent idiopathic scoliosis. Leptin. Leptin receptor. Genetic polymorphisms.

Introduction

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) affects approximately 3% of adolescents and female patients have higher risk of curve progression [1,2]. The exact etiology of AIS remains unknown, however, the interaction between genetic, hormonal, and environmental factors is widely discussed in the literature [2-5].

The leptin signaling pathway is crucial for bone formation and resorption and for the regulation of the body's energy intake and expenditure. Patients with AIS have lower peripheral blood leptin and higher soluble leptin receptor (sOB-R) levels compared to controls [6-8]. Leptin and its receptor are encoded by the *LEP* and *LEPR* genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in both genes have been suggested to affect their expression and/or the susceptibility of AIS [9-12]. After evaluating 6 *LEPR* SNPs, only the rs2767485 was associated with AIS susceptibility, suggesting that the abnormal *LEPR* expression level plays an important pathogenic role in AIS [12]. The *LEP* rs2167270 SNP changes the leptin level and it has been studied as a risk factor for the development of several diseases, including obesity and intervertebral disc degeneration [13]. As far as we know, no studies have evaluated the combined effect of these SNPs with occurrence of AIS.

Therefore, in the present work, we aimed to describe the frequency of *LEP* rs2167270 and *LEPR* rs2767485 SNPs among Brazilian subjects, and to evaluate their role in AIS susceptibility.

Materials and Methods

Research question

Polymorphisms in *LEP* and *LEPR* genes may alter this signaling pathway, to induce the abnormal leptin bioavailability, and to support the precursor theories of AIS etiology [4,7,10,12].

Thus, we suppose that *LEP* rs2167270 and *LEPR* rs2767485 polymorphisms can be associated with AIS susceptibility.

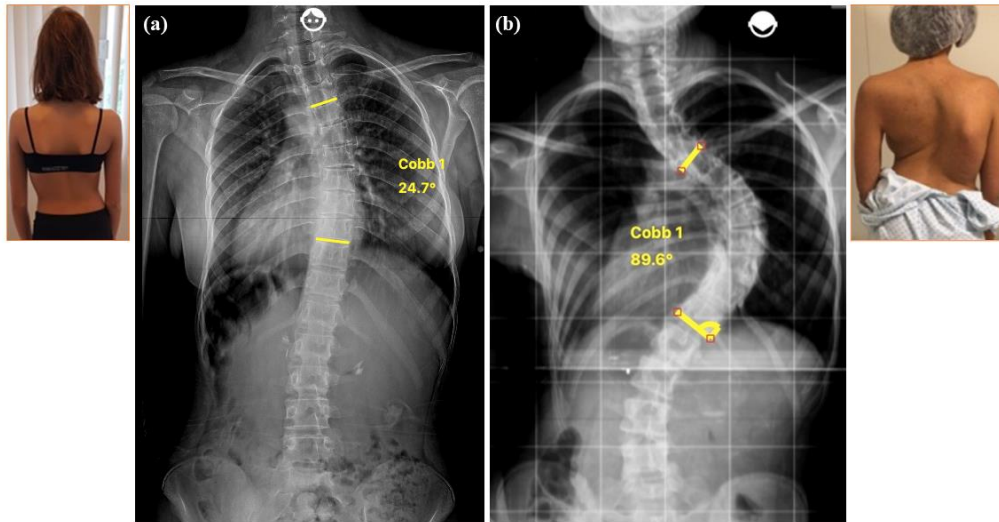
Study population and clinical evaluation

The analytical observational case–control study was approved by the Human Research Ethics Committees (73527617.4.0000.5273). The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Patients with AIS (n = 202), diagnosed with spinal curvatures exceeding 10° (Cobb measuring) by clinical and radiographic examination were included in the study. AIS cases were categorized according to the Cobb angle magnitude (<45° and ≥45°) and indication of surgical treatment for scoliosis (**Fig. 1**) [4,5]. The skeletal maturity (Risser's sign) was assessed by ossification of the iliac apophysis, as the predictor of scoliosis progression [14]. All measurements were performed using the Surgimap Spine software (Nemaris Inc., New York, USA), version 2.2.15.5.

Participants from the control group (n = 555) were evaluated by an orthopedic spine surgeon to rule out any spine deformity [4,5].

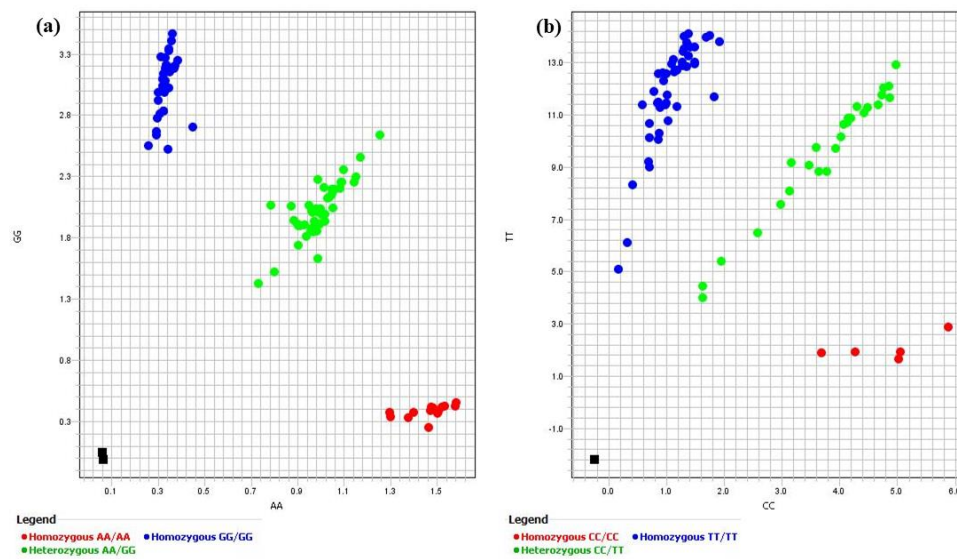
Fig. 1 Panoramic radiographs of the posteroanterior spine were taken to measure the Cobb angle. **(a)** Example of scoliosis patients with Cobb angle <45°. **(b)** Example of scoliosis patients with Cobb angle ≥45° and with indication of surgical treatment



Polymorphisms genotyping analysis

The genomic DNA extraction was performed using an extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the procedures recommended by the manufacturer. The genotyping analysis of the *LEP* rs2167270 and *LEPR* rs2767485 polymorphisms were performed using TaqMan allelic discrimination assays (C_15966471_20 and C_16068395_10, respectively). The probes are marked with different fluorescence captured by the equipment software (7500 Real-Time System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), discriminating the individual genotype (**Fig. 2**).

Fig. 2 Analysis of polymorphisms by real-time PCR using the TaqMan system. Black squares are negative controls, which should not present PCR amplification. The blue circles are patients with wild homozygous genotype. The red circles are the variant homozygotes and the green circles are heterozygotes, which presents fluorescence of both probes. (a) Example of *LEP* rs2167270 *G>A* analysis. (b) Example of *LEPR* rs2767485 *T>C* analysis.



Data analysis

Categorical data were presented as number (n) and frequency (%) and analyzed using the Chi-squared (χ^2) statistic test or Fischer exact test, when applicable. Comparisons of continuous variables between cases and controls groups were performed using the Student's t test, and data were presented as mean \pm standard deviation (SD).

The polymorphisms alleles frequencies and genotypes distributions were derived by counting, and frequencies between the two groups were compared using the χ^2 test or, when appropriate, the Fisher's exact test. Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in the polymorphism's frequencies were assessed by the goodness-of-fit χ^2 test.

The associations between categorical variables and AIS were evaluated by determining the odds ratios (OR) and their respective 95% confidence intervals (95% CI). All analyses were performed using the IBM SPSS 20.0 Statistics for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and a significance level of 0.05 was adopted.

The sample size was calculated using Epi Info 7, version 7.1.3. (<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>) to detect a difference between case and control groups, assuming an OR of 2.0, based on previous evidence [4,5], with a power of 0.8 and 5% type I error.

The mechanistic model to explain the hypothesis of *LEPR* polymorphism in AIS susceptibility was created with BioRender (<https://biorender.com/>).

Results

Table 1 shows the demographic data of the 757 participants included in this study. Most AIS cases were aged less than or equal to 18 years (16.7 ± 5.4 versus 36.9 ± 12.2) and 87.6% had low or normal BMI (20.6 ± 4.4 versus 27.4 ± 4.1 kg/m²). Moreover, among the AIS group there was a predominance of females (14.5:1). There were significant differences between cases and controls for sex, age and BMI ($P < 0.001$).

Table 1 Demographic data of the studied population (n = 757)

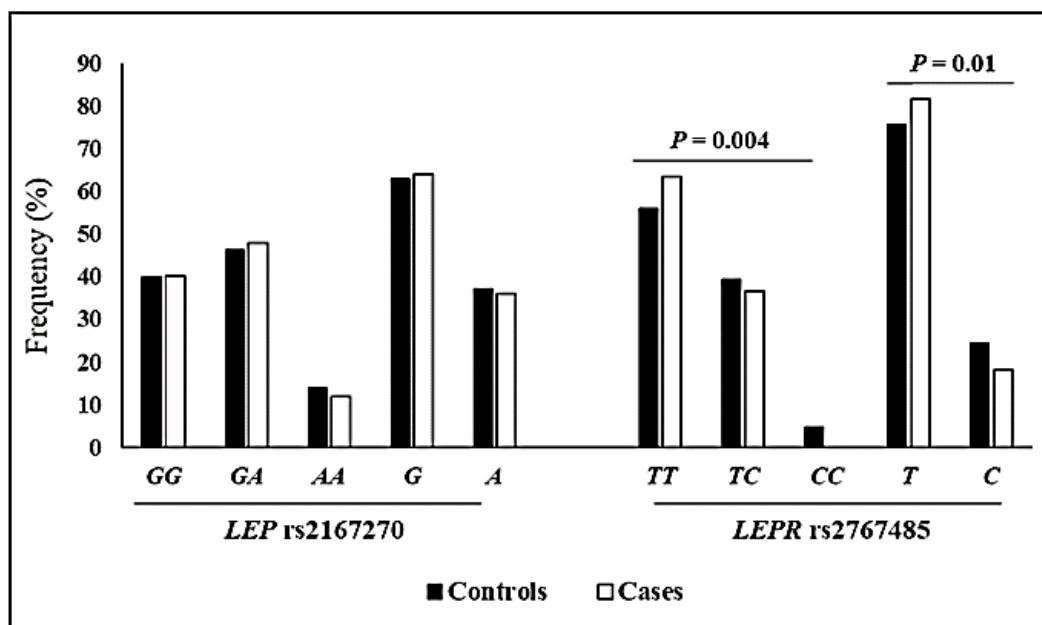
Variables	Controls (n = 555)	AIS cases (n = 202)	P-value ^a
	n (%)		
Age			
≤ 18	18 (3.2)	150 (74.3)	<0.001
19 - 25	113 (20.4)	32 (15.8)	
≥ 26	424 (76.4)	20 (9.9)	
Sex			
Female	240 (43.2)	189 (93.6)	<0.001
Male	315 (56.8)	13 (6.4)	
BMI (kg/m²)			
≤ 18.50	4 (0.7)	78 (38.6)	<0.001
18.51 - 24.9	160 (28.8)	99 (49.0)	
25.0 - 29.9	246 (44.3)	14 (7.0)	
≥ 30 - 39.9	145 (26.2)	11 (5.4)	

BMI body mass index, ^aPearson's Chi-square test (X^2) or Fisher's exact test, when necessary

According to the Risser scale, most AIS patients (69.4%) were classified as IV and V (mature grade). The mean Cobb angle of the greater curve (lumbar or thoracic) was $49.1 \pm 16.3^\circ$ and the majority (58.9%) presented Cobb angle $\geq 45^\circ$ (**Fig. 1**). The mean age and BMI in AIS group with Cobb $< 45^\circ$ (14.8 ± 3.8 years and 19.7 ± 3.1 kg/m²) were significantly lower ($P < 0.001$ and $P = 0.02$, respectively) than in the AIS Cobb $\geq 45^\circ$ group (18.0 ± 5.9 years and 21.2 ± 5.1 kg/m²).

The *LEP* rs2167270 polymorphism was in HWE in both subgroups: controls ($P = 0.87$) and AIS cases ($P = 0.54$). However, the *LEPR* rs2767485 polymorphism was in HWE only among the controls ($P = 0.10$ for controls and $P = 0.001$ for AIS group). The alleles and genotypes distribution of both polymorphisms in cases and controls is illustrated in **Fig. 3**. The variant allele and genotype frequencies of *LEP* rs2167270 were 35.9% (A) and 11.9% (AA), respectively, for AIS cases, and 37.0% (A) and 13.9% (AA), respectively, for controls; while for *LEPR* rs2767485 they were 18.3% (C) and 0% (CC), for AIS cases, and 24.4% (C) and 4.7% (CC) for controls, respectively. The significant differences between cases and controls were observed only in allelic and genotypic frequencies of the *LEPR* rs2767485 SNP, showing a higher frequency of both *LEPR* T allele and TT genotype in the AIS group compared to the control group.

Fig. 3 Genotypic and allelic distribution of *LEP* rs2167270 and *LEPR* rs2767485 polymorphisms in adolescent idiopathic scoliosis cases and controls. ^aPearson's Chi-square test (X^2) or Fisher's exact test, if necessary.



An association analysis was performed to assess the risk of both polymorphisms of developing AIS and different Cobb angles, as shown in **Table 2**. The *LEPR* rs2767485 *T* allele and *TT* and *TC* genotypes or the dominant model (*TC+TT*) were risk factors for the prevalence of AIS, either considering Cobb angle groups $<45^\circ$ or $\geq 45^\circ$. There was no significant association between *LEP* rs2167270 polymorphism and AIS. A combined analysis of the two polymorphisms was performed to investigate their interaction on the risk of AIS. However, there was no significant association between *LEP-LEPR* combined polymorphisms and AIS prevalence (data not shown).

In addition, the association of the polymorphisms and low BMI was made considering only the subjects of AIS group. **Table 3** show the association analysis of the *LEP* rs2167270 and *LEPR* rs2767485 polymorphisms between $\text{BMI} \geq 25$ and ≤ 24.9 in AIS cases. There was a significant difference for *LEPR* rs2767485 polymorphism between the two groups, with a predominance of *LEPR TT* patients in low weight group, being a risk factor for $\text{BMI} \leq 24.9$ in AIS cases.

Table 2 Analysis of association of the *LEP* rs2167270 and *LEPR* rs2767485 polymorphisms with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility and according to Cobb angle

<i>Polymorphisms</i>	Controls (n = 555)	Scoliosis cases (n = 202)	<i>P</i> -value ^a	OR^b (95% CI)	Cobb < 45° (n = 83)	OR^c (95% CI)	Cobb ≥ 45° (n = 119)	OR^d (95% CI)
<i>LEP</i> rs2167270	n (%)							
<i>GG</i>	221 (39.8)	81 (40.1)		1 ^e	34 (41.0)	1 ^e	47 (39.5)	1 ^e
<i>GA</i>	257 (46.3)	97 (48.0)	0.77	1.03 (0.73 - 1.45)	37 (44.6)	0.94 (0.57 - 1.54)	60 (50.4)	1.10 (0.72 - 1.67)
<i>AA</i>	77 (13.9)	24 (11.9)		0.85 (0.50 - 1.44)	12 (14.5)	1.01 (0.50 - 2.06)	12 (10.1)	0.73 (0.37 - 1.45)
<i>GG</i>	221 (39.8)	81 (40.1)		1 ^e	34 (41.0)	1 ^e	47 (39.5)	1 ^e
<i>GA + AA</i>	334 (60.2)	121 (59.9)	0.48	0.98 (0.71 - 1.37)	49 (59.0)	0.76 (0.47 - 1.24)	72 (60.5)	1.01 (0.68 - 1.52)
<i>G</i>	699 (63.0)	259 (64.1)		1 ^e	105 (63.3)	1 ^e	154 (64.7)	1 ^e
<i>A</i>	411 (37.0)	145 (35.9)	0.68	0.95 (0.75 - 1.21)	61 (36.7)	0.99 (0.71 - 1.39)	84 (35.3)	0.93 (0.69 - 1.24)
<i>LEPR</i> rs2767485	n (%)							
<i>CC</i>	26 (4.7)	0 (0.0)		1 ^e	0 (0.0)	1 ^e	0 (0.0)	1 ^e
<i>TC</i>	219 (39.4)	74 (36.6)	0.004	1.34 (1.25 - 1.43)	22 (26.5)	1.10 (1.06 - 1.14)	52 (43.7)	1.24 (1.17 - 1.31)
<i>TT</i>	310 (55.9)	128 (63.4)		1.41 (1.33 - 1.50)	61 (73.5)	1.20 (1.14 - 1.25)	67 (56.3)	1.21 (1.16 - 1.27)

<i>CC</i>	26 (4.7)	0 (0.0)	0.002	1 ^e	0 (0.0)	1 ^e	0 (0.0)	1 ^e
<i>TT + TC</i>	529 (95.3)	202 (100)		1.38 (1.32 – 1.44)	83 (100)	1.16 (1.12 – 1.19)	119 (100)	1.22 (1.18 – 1.27)
<i>C</i>	271 (24.4)	74 (18.3)	0.01	1 ^e	22 (13.3)	1 ^e	52 (21.8)	1 ^e
<i>T</i>	839 (75.6)	330 (81.7)		1.44 (1.08 – 1.92)	144 (86.7)	2.11 (1.32 – 3.38)	186 (78.2)	1.15 (0.82 – 1.62)

OR odds ratio, *CI* confidence interval, (-) it was not possible to determine the value of OR and 95% CI, ^aPearson's Chi-square test (X^2) or Fisher's exact test, when necessary, ^bOdds ratio to Controls *versus* Scoliosis cases, ^cOdds ratio to Controls *versus* Cobb angle below 45°, ^dOdds ratio to Controls *versus* Cobb angle above or equal 45°, ^eReference group

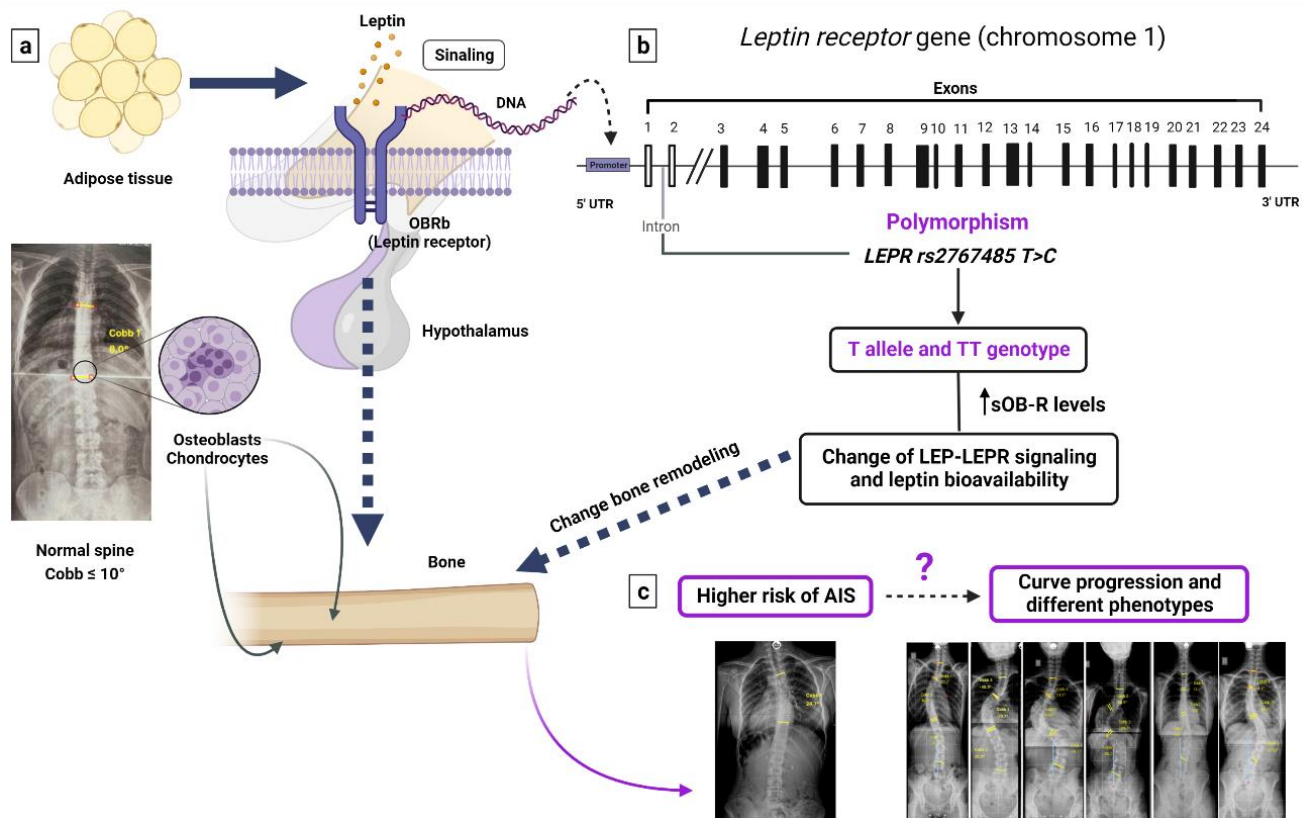
Table 3 Association analysis of the *LEP* rs2167270 and *LEPR* rs2767485 polymorphisms and the BMI in patients with adolescent idiopathic scoliosis

<i>Polymorphisms</i>	BMI \geq 25^a (n = 25)	BMI \leq 24.9^b (n = 177)	<i>P</i> -value ^c	OR (95% CI)
<i>LEP</i> rs2167270				
	n (%)			
<i>GG + GA</i>	22 (88.0)	156 (88,1)	0.60	1 ^d
<i>AA</i>	3 (12.0)	21 (11.9)		0.99 (0.27 – 3.58)
<i>G</i>	36 (72.0)	223 (63.0)	0.06	1 ^d
<i>A</i>	14 (28.0)	131 (37.0)		0.66 (0.34 - 1.27)
<i>LEPR</i> rs2767485				
<i>CC + TC</i>	14 (56.0)	60 (33.9)	0.03	1 ^d
<i>TT</i>	11 (44.0)	117 (66.1)		2.48 (1.06 - 5.80)
<i>T</i>	36 (72.0)	294 (83.1)	0.06	1 ^d
<i>C</i>	14 (28.0)	60 (16.9)		1.91 (0.97 - 3.75)

OR odds ratio, *CI* confidence interval, ^aPatients with overweight (25 - 29.9 kg/m²), obesity (30 - 39.9 kg/m²) and morbid obesity (\geq 40 kg/m²), ^bPatients with low weight (\leq 18.5 kg/m²) or normal weight (18.6 - 24.9 kg/m²), ^cPearson's Chi-square test (X^2) or Fisher's exact test, when necessary. ^dReference group

Based on these findings and the biological importance of the *LEPR* rs2767485 polymorphism, we hypothesized the possible relationship of LEP-LEPR signaling, bone remodeling and BMI in the development of AIS (**Fig. 4**).

Fig. 4 Mechanistic model to explain the relationship of LEP-LEPR signaling (**a**), in which the *LEPR* rs2767485 polymorphism changes bone remodeling (**b**), contributing to the scoliosis occurrence (**c**).



Discussion

The present study described the association of a polymorphism from a gene involved in the LEP-LEPR signaling with the risk of AIS and low BMI in 202 patients treated in a public orthopedic referral hospital in Brazil. Most patients were referred from other facilities for surgical treatment, contributing to the delay in definitive diagnosis and initiation of appropriate treatment. Thus, the AIS group with indication for surgical treatment of scoliosis (Cobb $\geq 45^\circ$) were significantly older than AIS group with Cobb $< 45^\circ$. Our group has been dedicated to the search for genetic polymorphisms, which may be associated with risk of development and progression of scoliosis, to allow the monitoring of at-risk individuals, avoiding frequent follow-up, poor health quality of life and high costs with the disease treatment [4,5].

The LEP-LEPR signaling pathway has been attributed to the etiology of AIS [7,10,15]. Both leptin and its receptor levels may be modulated by the presence of polymorphisms in regulatory regions of their respective genes [10,16]. A genome-wide association study (GWAS) identified the *LEPR* rs2767485 polymorphism associated with sOB-R levels [16]. In this sense, our findings retake the discussion initiated by Liu et al., 2015, who observed the same association between the *LEPR* rs2767485 polymorphism and AIS susceptibility, since *T* allele showed a risk of AIS occurrence (~1,5 fold). As observed in the Chinese Han population [12], here, no AIS case had the *LEPR* rs2767485 *CC* genotype; and *TC* or *TT* genotypes and *T* allele were associated with risk (~1,5 fold) of AIS prevalence in Brazilian population. To our knowledge, no other study has evaluated the influence of the *LEPR* rs2767485 polymorphism on the susceptibility of AIS.

The Brazilian population was formed by extensive admixture from different ancestral roots, and therefore, extrapolating data from other ethnic groups is not appropriate [17]. In the current study, the frequency distribution of the *LEPR* rs2767485 in the control group was in agreement with another study involving Brazilians subjects without scoliosis [18]. Furthermore, the absence of the *LEPR* rs2767485 *CC* genotype in the AIS group must have contributed to the lack of HWE only in this group, which supported the relevant and older finding on the significantly increased sOB-R level in AIS patients compared to normal healthy girls [19].

On the other hand, there was no association between *LEP* rs2167270 and AIS susceptibility in Brazilian population. The *LEP* *G>A* polymorphism is within in the regulatory region and, therefore, can alter the levels of the LEP protein [10]. However, to our knowledge, this is the first study to evaluate this polymorphism with the occurrence of AIS. Liang et al., 2012 selected six tag SNPs of the leptin gene and found no significant association with susceptibility or curve severity in AIS. However, the authors observed a low serum leptin in those patients, suggesting that this event is possibly secondary, and it may be related to the low capacity of adipogenesis in AIS [10].

The exact relationship between AIS etiology, leptin levels, BMI and genetic factors remains an area of substantial controversy and our findings will likely shed light on these complex processes. Based on the risk effect of the *LEPR* rs2767485 polymorphism with the genetic susceptibility of AIS [12], we proposed a mechanism of this polymorphism on the LEP-LEPR signaling pathway with the AIS development. Leptin receptors are widely expressed in the hypothalamus and, besides the direct anabolic effect that leptin has on osteoblasts and chondrocytes, it also acts indirectly through binding to LEPR in the hypothalamus, modulating bone formation (**Fig. 4a**). The *LEPR* rs2767485 *T* or *TT* have already been associated with higher levels of sOB-R [16] (**Fig 4b**), and with the modulation of BMI [18,20]. Thus, the *LEPR* rs2767485 polymorphism may alter the LEP-LEPR signaling pathway, inducing abnormal leptin bioavailability and, therefore, changing bone remodeling and contributing to the risk of AIS development (**Fig 4c**). Moreover, the *LEPR* rs2767485 polymorphism may also regulate the weight loss process, and there is a greater reduction of BMI in *LEPR* rs2767485 *TT* subjects [18]. In the current study, the *LEPR* rs2767485 *TT* genotype was more frequent in AIS cases with lower BMI (≤ 24.9).

In addition to the genetic factors, some known parameters have already been related to scoliosis curve progression (**Fig 4c**), such as: younger age (<12 years), premenarcheal status, high peak velocity, Tanner and Risser stage, status of triradiate cartilage, main curve Cobb angle at diagnosis and localization of the main curve [21]. Here, the *LEPR* rs2767485 polymorphism was associated with risk of AIS, either in cases with no indication for surgical treatment and in the severe cases group of the disease ($\text{Cobb} \geq 45^\circ$). Recently, our group also showed the association of polymorphisms in the *FBNI* and *PAX-1* genes with AIS susceptibility in the Brazilian population. However, the *FBNI* rs12916536 polymorphism was associated only with AIS susceptibility and not with disease severity [4]. In contrast, the *PAX-1* rs6137473 polymorphism was associated with the

lumbar modifier (B and C) in 59 cases of Lenke type I and II, with surgical indication of scoliosis correction [5].

A few limitations of the current study must be mentioned. First, the small number in each subgroups of disease severity. Second, the leptin levels and sOB-R expression could not be directly identified. Third, the information about patients amenable for brace treatment, the nutritional status and BMI information should have been collected throughout the medical follow-up. However, our results are in agreement with a recent study that observed significant lower BMI in patients with curves exceeding 45° compared with Cobb under 45° [22]. Thus, a longitudinal study is necessary to account other non-modifiable factors for developing AIS, such as polymorphisms in strong linkage disequilibrium with *LEPR* rs2767485, which have also been associated with changes in receptor levels [16].

Our study has also distinct strengths: it is the first report of the distribution of two polymorphisms involved in LEP-LEPR signaling pathway in an admixed population, bringing together two precursor theories, which play pivotal roles in the etiology of AIS [4,7,10,21,22]. Second, we validated the same association observed in Han Chinese AIS individuals. Third, all participants were evaluated by experienced spine surgeons, confirming the diagnosis according to the severity of the disease and excluding spine deformities in the control group. Finally, the current study showed the real-life of diagnosing and treating AIS in a public hospital from a developing country. As it is an idiopathic and multifactorial disease, combining research and medical care in the identification of genetic biomarkers and in the design of appropriate clinical studies, makes possible to provide additional subsidies for treatment planning, in order to identify individuals at risk of development and progression of the disease.

Conclusion

In summary, the *LEPR* rs2767485 *T* allele, *TC* and *TT* genotypes play a risk non-modifiable factor for disease development, and it was associated with low BMI in AIS cases, which represents an advance in understanding the etiology of this disease.

References

- [1] Konieczny MR, Senyurt H, Krauspe R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J Child Orthop*. 2013 Feb;7(1):3-9. doi: 10.1007/s11832-012-0457-4. Epub 2012 Dec 11.
- [2] Fadzan M, Bettany-Saltikov J. Etiological Theories of Adolescent Idiopathic Scoliosis: Past and Present. *Open Orthop J*. 2017 Dec 29;11:1466-1489. doi: 10.2174/1874325001711011466.
- [3] Marya S, Tambe AD, Millner PA, Tsirikos AI. Adolescent idiopathic scoliosis: a review of aetiological theories of a multifactorial disease. *Bone Joint J*. 2022 Aug;104-B(8):915-921. doi: 10.1302/0301-620X.104B8.BJJ-2021-1638.R1.
- [4] de Azevedo GBL, Perini JA, Araújo Junior AEP, Moliterno LAM, Andrade RM, Guimarães JAM, Defino HLA. Association of *FBN1* polymorphism with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2022 May 7;23(1):430. doi: 10.1186/s12891-022-05370-1.
- [5] Pedrosa AE, de Azevedo GBL, Cardoso JV, Guimarães JAM, Defino HLA, Perini JA. Polymorphisms in paired box 1 gene were associated with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis: A case-control study. *J Craniovertebr Junction Spine*. 2022 Jul-Sep;13(3):318-324. doi: 10.4103/jcvjs.jcvjs_54_22. Epub 2022 Sep 14.
- [6] Matusik E, Durmala J, Olszanecka-Glinianowicz M, Chudek J, Matusik P. Association between Bone Turnover Markers, Leptin, and Nutritional Status in Girls with Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS). *Nutrients*. 2020 Aug 31;12(9):2657. doi: 10.3390/nu12092657.

- [7] Wang Q, Wang C, Hu W, Hu F, Liu W, Zhang X. Disordered leptin and ghrelin bioactivity in adolescent idiopathic scoliosis (AIS): a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2020 Oct 30;15(1):502. doi: 10.1186/s13018-020-01988-w.
- [8] Liu Z, Tam EM, Sun GQ, Lam TP, Zhu ZZ, Sun X, Lee KM, Ng TB, Qiu Y, Cheng JC, Yeung HY. Abnormal leptin bioavailability in adolescent idiopathic scoliosis: an important new finding. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012 Apr 1;37(7):599-604. doi: 10.1097/BRS.0b013e318227dd0c.
- [9] Mórocz M., Czibula Á., Grózer Z. B., et al. Association study of BMP4, IL6, Leptin, MMP3, and MTNR1B gene promoter polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 2011;36(2):E123–E130. doi: 10.1097/BRS.0b013e318a511b0e.
- [10] Liang G, Gao W, Liang A, Ye W, Peng Y, Zhang L, Sharma S, Su P, Huang D. Normal leptin expression, lower adipogenic ability, decreased leptin receptor and hyposensitivity to Leptin in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *PLoS One.* 2012;7(5):e36648. doi: 10.1371/journal.pone.0036648. Epub 2012 May 15.
- [11] Nikolova S, Yablanski V, Vlaev E, Getova G, Atanasov V, Stokov L, Savov AS, Kremensky IM. In Search of Biomarkers for Idiopathic Scoliosis: Leptin and BMP4 Functional Polymorphisms. *J Biomark.* 2015;2015:425310. doi: 10.1155/2015/425310. Epub 2015 Aug 2.
- [12] Liu Z, Wang F, Xu LL, Sha SF, Zhang W, Qiao J, Bao HD, Qiu Y, Jiang Q, Zhu ZZ. Polymorphism of rs2767485 in Leptin Receptor Gene is Associated With the Occurrence of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2015 Oct 15;40(20):1593-8. doi: 10.1097/BRS.0000000000001095.
- [13] Chen HH, Hsu HT, Liao MH, Teng MS. Effects of Sex and Obesity on LEP Variant and Leptin Level Associations in Intervertebral Disc Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 14;23(20):12275. doi: 10.3390/ijms232012275.

- [14]Risser JC. The classic: The iliac apophysis: an invaluable sign in the management of scoliosis. 1958. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(3):643-53. doi: <https://doi.org/10.1007/s11999-009-1096-z>
- [15]Reid IR, Baldock PA, Cornish J. Effects of Leptin on the Skeleton. *Endocr Rev.* 2018 Dec 1;39(6):938-959. doi: 10.1210/er.2017-00226.
- [16]Sun Q, Cornelis MC, Kraft P, Qi L, van Dam RM, Girman CJ, Laurie CC, Mirel DB, Gong H, Sheu CC, Christiani DC, Hunter DJ, Mantzoros CS, Hu FB. Genome-wide association study identifies polymorphisms in LEPR as determinants of plasma soluble leptin receptor levels. *Hum Mol Genet.* 2010 May 1;19(9):1846-55. doi: 10.1093/hmg/ddq056. Epub 2010 Feb 17. Erratum in: *Hum Mol Genet.* 2011 Feb 1;20(3):629.
- [17]Suarez-Kurtz G, Amorim A, Damasceno A, Hutz MH, Moraes MOD, Ojopi EB et al. VKORC1 polymorphisms in Brazilians: comparison with the Portuguese and Portuguese-speaking Africans and pharmacogenetic implications. *Pharmacogenomics,* 2010. 11(9), 1257-1267. doi: 10.2217/pgs.10.89.
- [18]Corgosinho FC, Almeida SS, Tock L, Pesquero JB, Araújo RC, Clemente APG, Dal'Molin Netto B, da Silveira Campos RM, Masquio DCL, de Carvalho Ferreira JP, de Lima Sanches P, de Piano Ganen A, Rogero MM, Oyama LM, Tufik S, de Mello MT, Dâmaso AR. LEPR polymorphism may affect energy balance during weight loss among Brazilians obese adolescents. *Neuropeptides.* 2017 Dec;66:18-24. doi: 10.1016/j.npep.2017.07.007. Epub 2017 Aug 2.
- [19]Liu Z, Tam EM, Sun GQ, Lam TP, Zhu ZZ, Sun X, Lee KM, Ng TB, Qiu Y, Cheng JC, Yeung HY. Abnormal leptin bioavailability in adolescent idiopathic scoliosis: an important new finding. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012 Apr 1;37(7):599-604. doi: 10.1097/BRS.0b013e318227dd0c.
- [20]Helgeland Ø, Vaudel M, Juliusson PB, Lingaas Holmen O, Juodakis J, Bacelis J, Jacobsson B, Lindekleiv H, Hveem K, Lie RT, Knudsen GP, Stoltenberg C, Magnus P, Sagen JV, Molven A,

Johansson S, Njølstad PR. Genome-wide association study reveals dynamic role of genetic variation in infant and early childhood growth. *Nat Commun.* 2019 Oct 1;10(1):4448. doi: 10.1038/s41467-019-12308-0.

[21] Faldini C, Manzetti M, Neri S, Barile F, Viroli G, Geraci G, Ursini F, Ruffilli A. Epigenetic and Genetic Factors Related to Curve Progression in Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Systematic Scoping Review of the Current Literature. *Int J Mol Sci.* 2022 May 25;23(11):5914. doi: 10.3390/ijms23115914.

[22] Miyagi M, Saito W, Imura T, Nakazawa T, Shirasawa E, Kawakubo A, Uchida K, Akazawa T, Inage K, Ohtori S, Inoue G, Takaso M. Body Composition in Japanese Girls with Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine Surg Relat Res.* 2020 Aug 31;5(2):68-74. doi: 10.22603/ssrr.2020-0088.