

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD  
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS ESTROMAIS DA  
MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM ESCOLIOSE**

Gustavo Borges Laurindo de Azevedo

Rio de Janeiro  
Dezembro  
2017

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD  
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS ESTROMAIS DA  
MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM ESCOLIOSE

Gustavo Borges Laurindo de Azevedo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rafaela Sartore da Costa Gomes

Rio de Janeiro  
Dezembro  
2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

A994a Azevedo, Gustavo Borges Laurindo de.  
Avaliação do potencial osteogênico de células estromais da medula óssea de pacientes com escoliose / Gustavo Borges Laurindo de Azevedo. — 2017.  
78f.

Orientadora: Rafaela Sartore.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2017.

1. Escoliose. 2. Doenças Ósseas Metabólicas. 3. Células Estromais da Medula Óssea. 4. Diferenciação Celular. 5. Osteogênese. 6. Ortopedia. I. Sartore, Rafaela, orient. II. Título.

NLM WE 735

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD  
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS ESTROMAIS DA  
MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM ESCOLIOSE

Gustavo Borges Laurindo de Azevedo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaela Sartore da Costa Gomes

Banca examinadora:

Professora Dra. Renata Binato Gomes (CEMO/INCA)

Professor Dr. Helton Luiz Aparecido Defino (USP)

Professor Dr. João Antonio Matheus Guimarães (INTO)

Rio de Janeiro  
Dezembro  
2017

À minha família, cuja paciência e apoio foram fundamentais para a conclusão deste trabalho

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas envolvidas na elaboração deste trabalho, em especial:

À Professora Doutora Maria Eugênia Leite Duarte, minha grande incentivadora a iniciar esta empreitada.

À Professora Doutora Rafaela Sartore, minha orientadora, excelente pesquisadora, incansável nas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

À Equipe do Laboratório do INTO, pela participação e ajuda nos experimentos essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia pelo apoio oferecido durante a elaboração desta dissertação.

Aos meus amigos Alderico Girão, Ricardo Meirelles, e Rodrigo José da Costa pela convivência e incentivo.

Aos meus pais Tania Azevedo e Carlos Fernando Azevedo, a quem devo toda minha formação cultural e ética, grandes exemplos de médicos, professores e pesquisadores.

À minha amada Ana Carolina Bastos, pelo companheirismo e cumplicidade nesta etapa da minha vida profissional.

Experiência, tentativa e erro, constante reflexão e revisão do itinerário – tais são os únicos meios pelos quais um homem pode, com a graça de Deus, adquirir conhecimento. Isso não se faz do dia para a noite. “*Veritas filia temporis*”.

Olavo de Carvalho, 2001

## RESUMO

DE AZEVEDO, Gustavo Borges Laurindo. Avaliação do potencial osteogênico de células estromais da medula óssea de pacientes com escoliose. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2017.

Apesar de descrita há muitos anos em pacientes com escoliose idiopática do adolescente (EIA), a relação entre osteopenia e escoliose ainda é pouco compreendida. Mais recentemente, redução da densidade mineral óssea também foi relatada em associação com a escoliose congênita (EC). Estudos *in vitro* demonstraram que células estromais da medula óssea (BMSC) de pacientes com EIA apresentam diminuição na capacidade de diferenciação osteogênica e essa pode ser uma das razões pelas quais esses pacientes desenvolvem osteopenia e osteoporose. Apesar do relato da diminuição da massa óssea em pacientes com escoliose congênita (EC), não existem dados na literatura sobre a capacidade de diferenciação de BMSC desses pacientes. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de formação óssea das BMSC de pacientes com EIA e EC, analisar sua frequência na medula óssea, sua capacidade proliferativa e o potencial de diferenciação *in vitro* e *in vivo*. BMSC foram isoladas de amostras ósseas de pacientes com EC e EIA, coletadas durante a cirurgia para correção da curvatura da coluna vertebral, e de indivíduos sem escoliose submetidos ao tratamento cirúrgico de fraturas esqueléticas. O teste de eficiência de formação de colônias mostrou frequência reduzida de BMSC isoladas de pacientes com EIA e também maior tempo de duplicação celular em relação às BMSC de pacientes com EC e controles sem escoliose. A avaliação dos marcadores de superfície CD34, CD45, CD73, CD90 e CD146 por citometria de fluxo demonstrou perfil fenotípico similar entre as BMSC dos três grupos (EC, EIA e controle). Quanto ao potencial de diferenciação *in vitro*, BMSC dos três grupos foram capazes de originar células das linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Os ensaios funcionais para avaliar o potencial de formação de tecido ósseo *in vivo* mostraram que as BMSC de EIA e as BMSC do grupo controle reproduziram a microarquitetura do tecido ósseo, recapitulando o microambiente da medula óssea. Embora os mecanismos celulares e moleculares que contribuem para a perda de massa óssea na EIA e EC ainda não estejam totalmente definidos, nossos resultados favorecem a hipótese de que deficiências quantitativas e qualitativas da população de BMSC possam estar implicadas, respectivamente, com a patogenia da EIA e da EC.

Palavras-chave: Escoliose, osteopenia, células estromais da medula óssea, diferenciação celular, osteogênese.

## ABSTRACT

DE AZEVEDO, Gustavo Borges Laurindo. Evaluation of the osteogenic potential of bone marrow stromal cells isolated from scoliotic patients. Rio de Janeiro, 2017. Master Thesis (Master's Degree in Applied Sciences to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology e Orthopedics, Ministry of Health, 2017.

Although reported for many years in patients with adolescent idiopathic scoliosis (AIS), the relationship between osteopenia e scoliosis is still poorly understood. Recently, decreased bone mineral density has also been described in congenital scoliosis (CS) patients. *In vitro* studies have shown that bone marrow stromal cells (BMSC) isolated from patients with EIA present reduced osteogenic differentiation capacity, which may be related to osteopenia. Despite reports of decreased bone mass in patients with congenital scoliosis (CS), there are no data in the literature on the differentiation potential of BMSC of those patients. Thus, the aim of this study was to evaluate the bone forming potential of BMSC of patients with AIS e CS, to analyze their frequency in the bone marrow, its proliferative capacity e the potential for differentiation *in vitro* e *in vivo*. BMSC were isolated from EC e EIA bone samples harvested during surgery for spine curvature correction, e from individuals without scoliosis submitted surgical treatment of skeletal trauma. Colony forming efficiency assay showed reduced frequency of BMSC isolated from patients with EIA e also a longer time of cell duplication compared to BMSC of patients with CS e control without scoliosis. The evaluation of the surface markers CD34, CD45, CD73, CD90, e CD146 by flow cytometry demonstrated similar phenotypic profile for BMSC from the three groups (EC, EIA e control). In relation to the potential to differentiate *in vitro*, BMSC from the three groups differentiated into osteogenic, chondrogenic e adipogenic lineages. Functional assays to evaluate the potential for bone tissue formation *in vivo* showed that BMSC from AIS e BMSC from control group reproduced the microarchitecture of bone tissue, recapitulating the microenvironment of the bone marrow. Although the cellular e molecular mechanisms contributing to bone mass loss in AIS e CS have not yet been fully established, our results favor the hypothesis that quantitative e qualitative impairment of BMSC population may be, respectively, implicated in the pathogenesis of osteopenia associated with AIS e CS.

Keywords: scoliosis, osteopenia, bone marrow stromal cells, cell differentiation, osteogenesis.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Escoliose .....	1
1.1.1 Escoliose Congênita .....	4
1.1.2 Escoliose idiopática do adolescente .....	6
1.2 Tratamento da escoliose idiopática e congênita .....	7
1.2.1 Tratamento conservador .....	8
1.2.2 Tratamento cirúrgico .....	10
1.3 Escoliose e Osteopenia .....	11
1.4 Modelos celulares .....	13
1.4.1 Células estromais derivadas da medula óssea .....	13
1.4.2 BMSC no remodelamento ósseo .....	14
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	16
3. OBJETIVOS .....	17
3.1 Objetivo Principal .....	17
3.2 Objetivo Específicos .....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Participantes da pesquisa .....	18
4.2 Coleta dos fragmentos ósseos .....	18
4.3 Isolamento e expansão de células estromais da medula óssea.....	19
4.4 Ensaio de eficiência de formação de colônias .....	20
4.5 Análise do tempo de duplicação celular ( <i>population doubling time</i> , PDT).....	20
4.6 Imunofenotipagem por citometria de fluxo .....	20
4.7 Ensaio de diferenciação <i>in vitro</i> .....	21
4.7.1 Diferenciação osteogênica.....	21

4.7.2 Diferenciação adipogênica .....	22
4.7.3 Diferenciação condrogênica .....	22
4.8 Ensaio de diferenciação osteogênica <i>in vivo</i> .....	23
4.9 Análise histológica.....	24
4.10 Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS .....	25
5.2 Frequência das células estromais da medula óssea (BMSC).....	27
5.3 Caracterização da proliferação <i>in vitro</i> das BMSC.....	28
5.4 Perfil imunofenotípico das BMSC.....	29
5.5 Potencial de diferenciação <i>in vitro</i> das BMSC .....	31
5.6 Avaliação da diferenciação <i>in vivo</i> das BMSC.....	33
6. DISCUSSÃO .....	36
7. CONCLUSÕES .....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
ANEXO A. Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com escoliose .....	54
ANEXO B. Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes de trauma .....	56
ANEXO C. Termo de assentimento do menor de 18 anos .....	58
ANEXO D. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do INTO.....	59
ANEXO E. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais do INTO.....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>BMD</b>	<i>Bone mineral density</i> (densidade mineral óssea)
<b>BMP</b>	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Morfogenética Óssea)
<b>BMSC</b>	<i>Bone marrow stromal cells</i> (células estromais da medula óssea)
<b>BMU</b>	<i>Bone modeling units</i> (unidades de modelamento ósseo)
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i> (cluster de diferenciação)
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética de Utilização de Animais
<b>CFE</b>	Ensaio de eficiência de formação de colônias
<b>CFU-F</b>	<i>Colony forming unit-fibroblast</i> (unidade formadora de colônia fibroblastóide)
<b>CMF</b>	<i>Calcium-magnesium free</i> (livre de cálcio emagnésio)
<b>COL1A1</b>	Colágeno tipo 1, alfa 1
<b>COL1A2</b>	Colágeno tipo 1, alfa 2
<b>DLL1</b>	<i>Delta-like protein 1</i>
<b>EC</b>	Escoliose congênita
<b>EIA</b>	Escoliose idiopática do adolescente
<b>fgfr3</b>	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i> (receptor tipo 1 do fator de crescimento de fibroblasto)
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
<b>HOX</b>	Homeobox
<b>FBN1</b>	Fibrilina 1
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
<b>MSX2</b>	<i>Msh Homeobox 2</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffer saline</i> (solução salina tamponada)
<b>PDT</b>	<i>Population doubling time</i> (tempo de duplicação populacional)
<b>ptk7</b>	Proteína tirosina quinase 7
<b>RUNX2</b>	<i>Runt-related transcription factor 2</i> (fator de transcrição relacionado ao Runt)
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>shp2</b>	<i>Src Homology Phosphatase 2</i> (fosfatase 2 homóloga à Src)
<b>SOX9</b>	<i>SRY-related HMG-box</i>
<b>SSC</b>	<i>Skeletal stem cells</i> (células-tronco esqueléticas)
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TRAP</b>	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i> (fosfatase ácida resistente atartarato)
<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	<i>Minimum Essential Medium</i> (meio essencial mínimo)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alinhamento normal da coluna vertebral nos planos frontal e sagital	1
<b>Figura 2.</b> Método de Cobb utilizado para a mensuração das curvaturas da coluna vertebral na escoliose	2
<b>Figura 3.</b> Aspecto clínico da deformidade da coluna vertebral em paciente com escoliose idiopática	3
<b>Figura 4.</b> Ilustração dos tipos de defeitos vertebrais da escoliose congênita	5
<b>Figura 5.</b> Tratamento conservador da escoliose com o uso de colete	9
<b>Figura 6.</b> Tratamento cirúrgico da escoliose idiopática	10
<b>Figura 7.</b> Ilustração do perfil de expressão gênica durante a diferenciação das BMSC na linhagem osteogênica	15
<b>Figura 8.</b> Ensaio de eficiência de unidades formadoras de colônias fibroblastoides	28
<b>Figura 9.</b> Análise do tempo de duplicação das BMSC	29
<b>Figura 10.</b> Imunofenotipagem das BMSC	31
<b>Figura 11.</b> Diferenciação osteogênica e adipocítica <i>in vitro</i> das BMSC em adipócitos e osteoblastos	33
<b>Figura 12.</b> Diferenciação <i>in vitro</i> das BMSC na linhagem condrogênica	34
<b>Figura 13.</b> Diferenciação osteogênica <i>in vivo</i> das BMSC	36

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

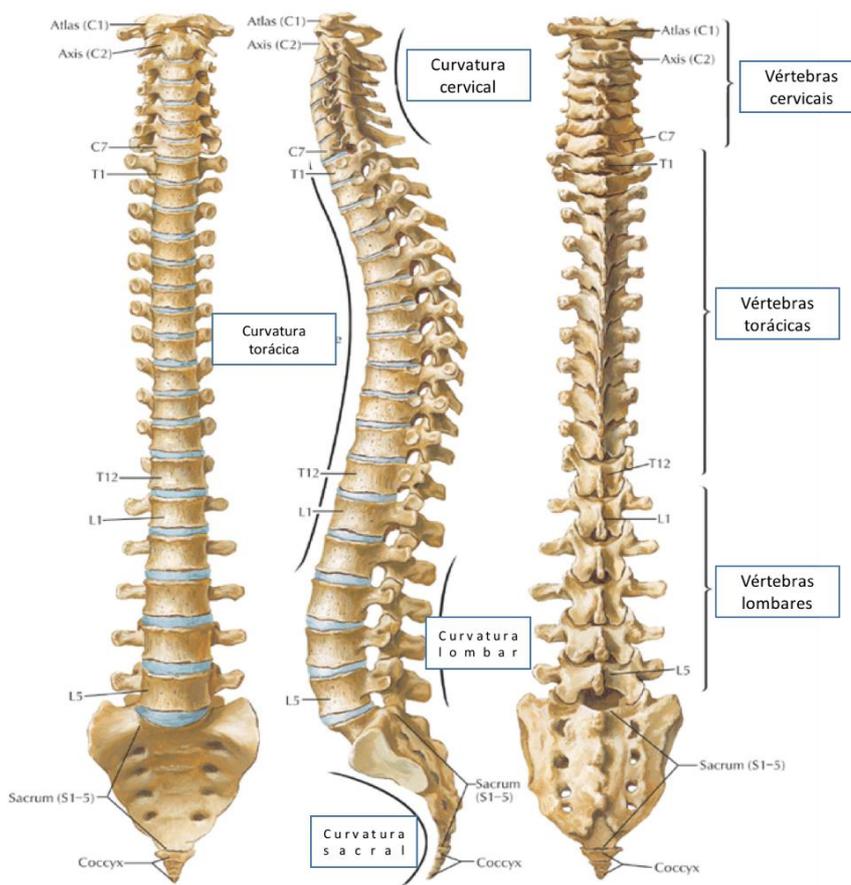
**Tabela 1.** Características dos participantes da pesquisa

26

# 1. INTRODUÇÃO

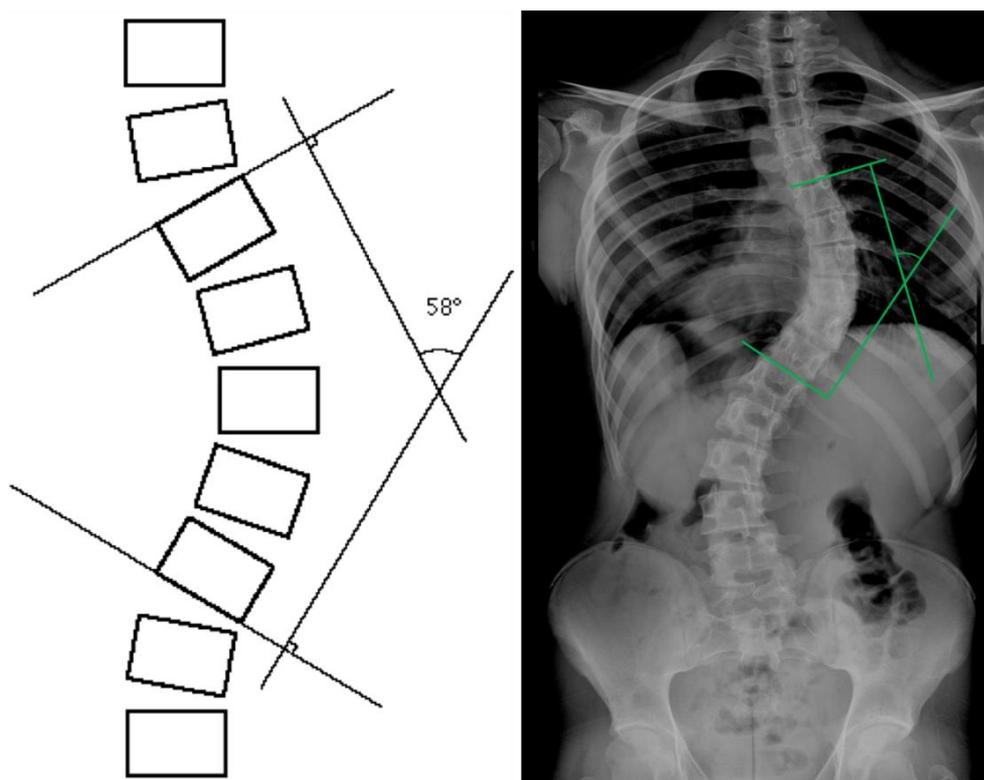
## 1.1 Escoliose

A coluna vertebral é constituída por 33 vértebras que unem o crânio, os membros e a pelve. Suas principais funções consistem em proteger a medula espinhal, dar suporte ao tronco e integrar as cinturas escapular e pélvica. A coluna vertebral possui curvaturas fisiológicas no plano sagital (lateral) – lordose cervical, cifose torácica, lordose lombar e cifose sacral e é responsável pela sustentação e transmissão de cargas durante a realização de todas as atividades. Por outro lado, no plano coronal (frontal), a coluna vertebral não apresenta curvaturas em condições normais (Figura 1) (ROUSSOULY; NNADI, 2010).



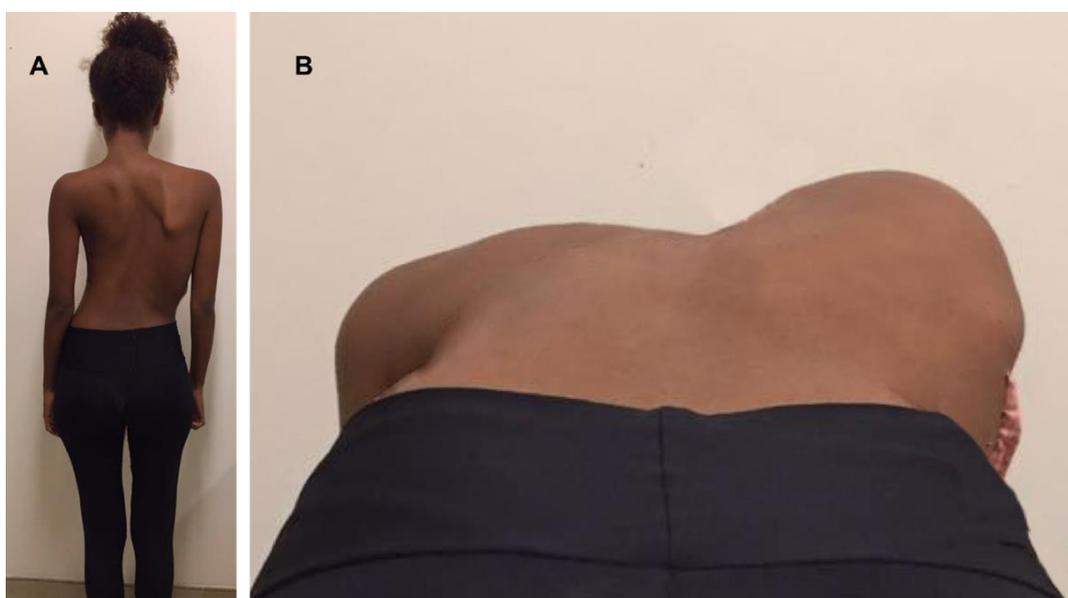
**Figura 1. Alinhamento normal da coluna vertebral nos planos frontal e sagital.** Adaptado de *The Netter Collection of Medical Illustrations*, 2006, painel 153.

A palavra escoliose, derivada do grego *skolios* (curva), é utilizada para definir o desvio lateral da coluna no plano frontal. Trata-se de uma deformidade tridimensional, em que ocorrem alterações da anatomia da coluna nos planos coronal, sagital e axial. Tecnicamente, a escoliose é definida pela presença de curvaturas da coluna vertebral com angulação superior a 10 graus, analisadas em radiografia anteroposterior da coluna vertebral. Essa aferição é tradicionalmente realizada através do método de Cobb, que consiste na medição do ângulo formado por linhas perpendiculares às placas terminais da primeira e da última vértebra da curva (Figura 2) (COBB, 1948).



**Figura 2. Método de Cobb utilizado para a mensuração das curvaturas da coluna vertebral na escoliose.** (A) Desenho esquemático demonstrando as linhas que formam o ângulo de Cobb. A partir das placas superior da primeira e inferior da última vértebra compreendidas na curva, traçam-se linhas perpendiculares. O ângulo formado pela interseção dessas linhas é denominado ângulo de Cobb. (B) Radiografia panorâmica da coluna vertebral em incidência anteroposterior com a marcação do ângulo de Cobb. Arquivo pessoal do autor.

A escoliose leva à deformidade do tronco e alterações na postura, que inicialmente podem ser sutis e passar despercebidas pelo paciente. As principais características clínicas observadas nos pacientes com escoliose são a diferença na altura dos ombros, a assimetria da linha da cintura, a inclinação do tronco para um dos lados e as gibosidades nas regiões torácica e lombar (Figura 3). Em casos graves, registram-se alterações da função pulmonar, ocasionadas por mudanças anatômicas do tórax, que limitam o seu volume e expansibilidade (WEINSTEIN, 1999; GOLDBERG et al., 2002; ASHER; BURTON, 2006).



**Figura 3. Aspecto clínico da deformidade da coluna vertebral em paciente com escoliose idiopática.** (A) Visão posterior demonstrando desvio lateral do tronco. (B) Flexão anterior do tronco evidenciando gibosidade na região torácica. Arquivo pessoal do autor.

Em mais de 80% dos casos, a escoliose não possui uma causa definida e, por isso, é denominada idiopática. A escoliose idiopática desenvolve-se sem alterações prévias da coluna vertebral e sem que sejam detectadas deformidades morfológicas nas vértebras que expliquem a curvatura da coluna (WINTER et al., 1995).

Entre as causas definidas de escoliose, destacam-se as malformações vertebrais (escoliose congênita), doenças neuromusculares e síndromes genéticas (CHOUDHRY; AHMAD; VERMA, 2016). A escoliose neuromuscular é causada por doenças neurológicas e

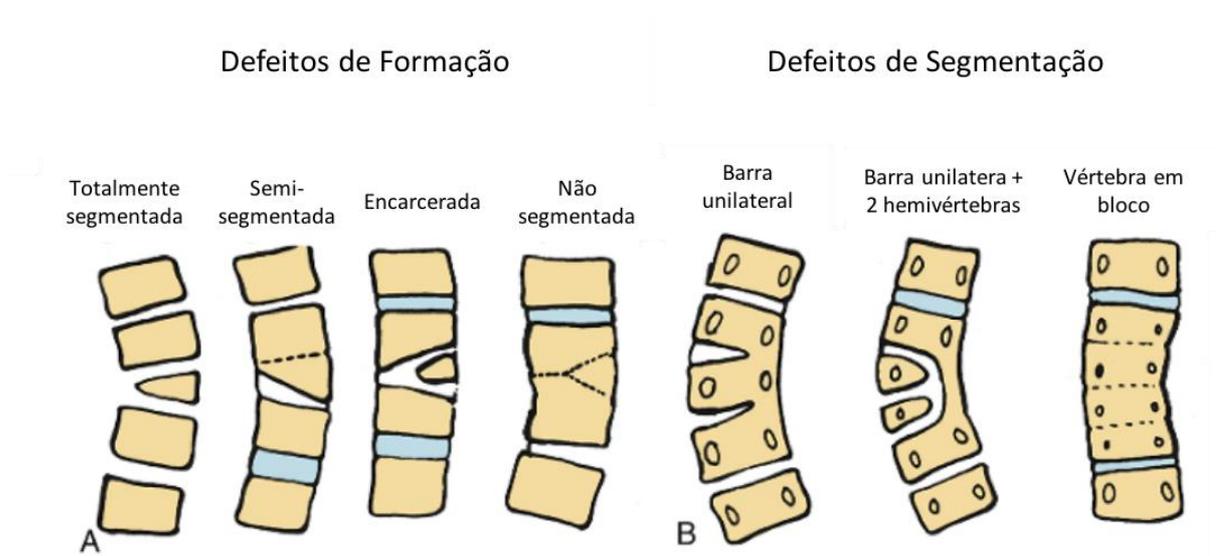
musculares que afetam o controle da musculatura do tronco, causando o encurvamento da coluna principalmente pela diferença de tônus e da contração da musculatura de um lado em relação ao outro (ALLAM; SCHWABE, 2013). As escolioses sindrômicas ocorrem como parte de doenças genéticas com acometimento sistêmico (LEVY et al., 2015). E, por fim, a escoliose congênita (EC) é causada por malformações nos corpos vertebrais que levam a sua assimetria e ao desequilíbrio do crescimento longitudinal da coluna vertebral. A escoliose não resulta de alterações posturais por transportar objetos pesados ou pela prática inadequada de exercícios físicos (HAWES et al., 2006).

#### 1.1.1 Escoliose Congênita

A EC ocorre em cerca de um em cada 1.000 indivíduos nascidos vivos, e é a doença congênita vertebral mais comum, seguida da cifose e da lordose congênitas (ARLET, ODENT, AEBI, 2003; HEDEQUIST, EMANS, 2007). As malformações vertebrais encontradas na EC são originadas durante o desenvolvimento embrionário, período de formação dos precursores vertebrais (TIKOO et al., 2017). Por ocorrer em um período precoce da formação do embrião, as alterações da coluna vertebral podem ser encontradas em associação com malformação de outros sistemas, como cardíaco, urinário e neurológico (HENSINGER, 2009). Logo, o diagnóstico da EC deve ser complementado pela avaliação do eixo neural por ressonância magnética para a pesquisa de medula ancorada, disrafismos espinhais e diastematomielia, além do rastreamento de defeitos cardíacos e urinários (TIKOO et al., 2017).

Os defeitos vertebrais que causam a EC podem ser classificados em falhas de formação, de segmentação ou em defeitos mistos (combinação de falhas de segmentação e de formação) (MCMASTER; SINGH, 1999) (Figura 4). As falhas de formação podem dar origem à vértebra em cunha, com assimetria de altura do corpo vertebral e/ou à hemivértebra, caracterizada pela ausência de um pedículo e de uma região do corpo vertebral (Figura 4A). As falhas de

segmentação levam à fusão de vértebras, que podem ser bilaterais e simétricas, resultando em uma vértebra em bloco, ou unilaterais, formando barras ósseas entre as vértebras (Figura 4B). A progressão da curvatura é causada pelo desequilíbrio do crescimento de um lado da coluna em relação ao outro (WINTER et al., 1995).



**Figura 4. Ilustração dos tipos de defeitos vertebrais da escoliose congênita.** (A) Defeitos de formação originando diferentes tipos de hemivértebras: totalmente segmentada, semi-segmentada, encarcerada e não-segmentada, respectivamente. (B) Defeitos de segmentação com formação de barra óssea unilateral, barra óssea associada à hemivértebra contralateral e vértebra em bloco respectivamente. Adaptado de FU; SMITH; SHAFFREY, 2012.

Embora as alterações estruturais que desencadeiam o desenvolvimento da EC sejam bem conhecidas, as suas causas ainda não estão totalmente esclarecidas (HENSINGER, 2009). Acredita-se que as malformações vertebrais sejam resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais (SPARROW et al., 2012). A hipóxia durante o desenvolvimento embrionário precoce (INGALLS; CURLEY, 1957; LODER et al., 2000), a exposição materna a substâncias químicas como o agente anticonvulsivante ácido valpróico (BANTZ, 1984; MENEGOLA et al., 1999; MASSA et al., 2005) ao solvente industrial ácido bórico (WÉRY et al., 2003), tabagismo (ALEXANDER; CHAU; TUAN, 2007) e consumo de bebidas alcoólicas

(TREDWELL et al., 1982) são fatores associados ao desenvolvimento de malformações vertebrais e da EC (SPARROW et al., 2012).

Mutações em genes que codificam reguladores do desenvolvimento dos precursores vertebrais também são atribuídas à gênese da EC. Mutações nos genes *DLL1* e *NOTCH1*, da família Notch, podem estar presentes em deformidades vertebrais congênitas (BAJARD; OATES, 2012). A expressão de genes da família *HOMEBOX* ou *HOX* (COPLEY; DORMANS, 1998) que codificam proteínas regulatórias transcricionais que orquestram o processo de diferenciação e segmentação somitogênica ao longo do eixo craniocaudal, também já foi descrita como alterada na EC (MALLO; WELLIK; DESCHAMPS, 2010).

#### 1.1.2 Escoliose idiopática do adolescente

A escoliose idiopática pode ser classificada de acordo com a idade em que se desenvolve. Até os três anos de idade, é denominada escoliose idiopática infantil; dos três aos 10 anos de idade é chamada escoliose idiopática juvenil; entre 10 e 18 anos, escoliose idiopática do adolescente (EIA) e acima de 18 anos de idade é designada de escoliose idiopática do adulto (JAMES, 1954). A EIA é a causa mais comum de deformidades da coluna e acomete de 0,4 a 5,2% da população (KONIECZNY; SENYURT; KRAUSPE, 2013). A EIA é mais frequente no sexo feminino e, em curvas da coluna vertebral acima de 30 graus, chega a ser 10 vezes mais frequente em mulheres (WANG et al., 2012).

A EIA apresenta progressão gradual da curvatura da coluna vertebral no período que antecede o pico de crescimento da puberdade. Com o aumento da velocidade de crescimento do esqueleto, a curva se acentua e pode sofrer grandes acréscimos em sua magnitude (LONSTEIN; CARLSON, 1984). Ao final do crescimento esquelético, a magnitude das curvas da EIA tende a se estabilizar, podendo haver progressão lenta ao longo da vida adulta. Os fatores associados à progressão da EIA são o sexo feminino, o baixo grau de maturidade esquelética,

curvas acima de 50 graus e a localização do ápice da curva na coluna torácica (ASCANI et al., 1986; BUNNELL, 1986; PEHRSSON et al., 1991; SANDERS et al., 2008).

Diversas teorias acerca da etiopatogenia da EIA já foram propostas, incluindo alterações biomecânicas e do controle neuromuscular (VELDHUIZEN; WEVER; WEBB, 2000), assincronia de crescimento entre o sistema nervoso central e os ossos da coluna vertebral (PORTER, 2001), crescimento assimétrico da coluna vertebral (VELDHUIZEN; WEVER; WEBB, 2000), alterações na propriocepção (BARRACK et al., 1984; LOMBARDI et al., 2011) e fatores hormonais, como já demonstrado para a sinalização de melatonina (MOREAU et al., 2004) e na concentração corporal de leptina (CLARK et al., 2014).

## **1.2 Tratamento da escoliose idiopática e congênita**

De maneira geral, o objetivo do tratamento das escolioses é impedir a progressão das curvaturas e corrigir a deformidade, mantendo o equilíbrio do tronco e o nivelamento dos ombros. O tratamento das escolioses idiopática e congênita tem particularidades que levam em consideração o estudo de sua história natural e o conhecimento adquirido a partir da observação da evolução das deformidades (DANIELSSON, 2013).

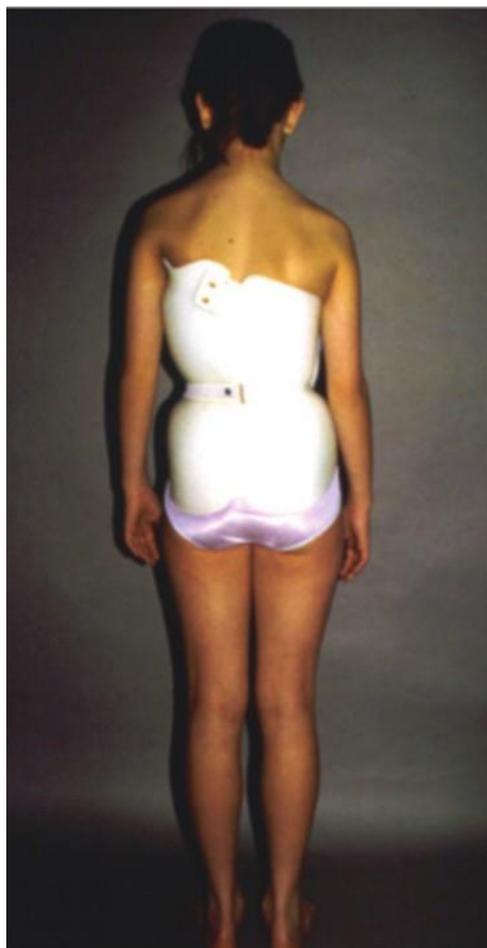
Os principais determinantes do tratamento da escoliose idiopática são a magnitude da curva e o grau de maturidade esquelética do paciente. Em pacientes esqueleticamente imaturos, curvas de até 20 graus geralmente não necessitam de tratamento, enquanto o uso de coletes é indicado para curvas entre 20 e 45 graus, podendo-se evitar a necessidade de tratamento cirúrgico (DOBBS, 2013). Contudo, em pacientes com curvas acima de 45 graus, o uso de coletes não alcança bons resultados e em geral é indicado o tratamento cirúrgico (WEINSTEIN; PONSETI, 1983).

Na EC, metade dos casos apresenta progressão rápida da curvatura da coluna vertebral e necessita de tratamento cirúrgico, enquanto 25% das curvas progredem pouco e os 25%

restantes se estabilizam (DEBNATH et al., 2010). O tratamento da EC é baseado principalmente no tipo de defeito vertebral, na magnitude da deformidade e na maturidade esquelética do paciente (MCMASTER; OHTSUKA, 1982).

### 1.2.1 Tratamento conservador

O tratamento conservador é o mais frequentemente empregado na EIA (WEINSTEIN et al., 2003). Durante muitos anos, o uso de coletes esteve em questionamento quanto à sua capacidade de evitar a progressão da escoliose (DANIELSSON et al., 2007). No entanto, estudos recentes mostram que a eficácia do uso dos coletes é diretamente proporcional ao número de horas diárias da sua utilização (DOBBS, 2013; SANDERS et al., 2014; NEGRINI et al., 2015; KAROL et al., 2016). Os coletes proporcionam correção passiva da deformidade com a aplicação de forças externas que melhoram o alinhamento da coluna e também correção ativa, pois a musculatura paravertebral desloca a coluna no sentido de se afastar dos pontos de pressão exercidos pelo colete (Figura 5) (DOBBS, 2013).

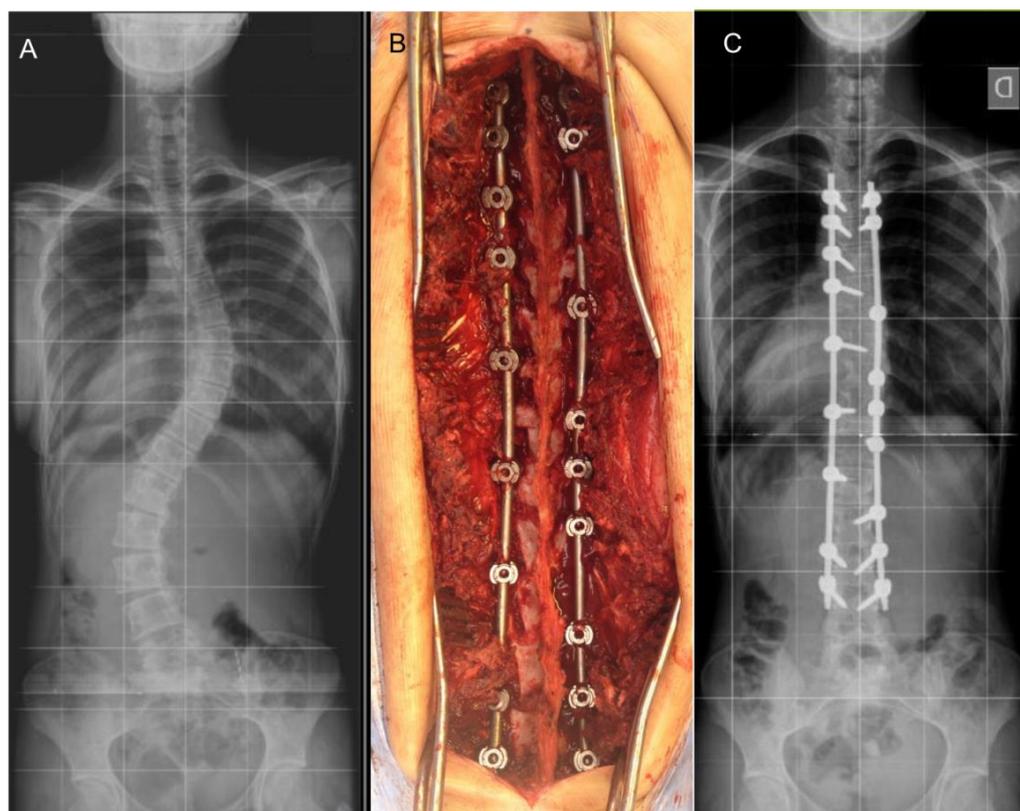


**Figura 5. Tratamento conservador da escoliose com o uso de colete.** O alinhamento correto da coluna é conseguido com o uso de órteses. Adaptado de CHENG et al., 2015.

O tratamento conservador da EC é utilizado principalmente para o controle de curvas compensatórias que se desenvolvem acima e abaixo das malformações vertebrais. O tratamento dessas curvas com o uso de órteses pode impedir que se tornem rígidas e, por conseguinte, a necessidade de cirurgia para o seu tratamento definitivo (FEKETE et al., 2016). Ainda que o uso de coletes não evite a evolução das curvas principais da EC, nem todos os pacientes apresentam curvas progressivas e respondem favoravelmente ao tratamento conservador com o uso de coletes (MCMASTER; OHTSUKA, 1982).

### 1.2.2 Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico da escoliose tem como objetivos principais impedir a progressão da deformidade e obter correção tridimensional da curvatura com equilíbrio do tronco, diminuindo as gibosidades e as assimetrias (BRIDWELL, 1999; KOTWICKI et al., 2013). Para isso, é realizada a artrodese da coluna vertebral com o uso de implantes metálicos fixados às vértebras envolvidas na deformidade. A artrodese é limitada ao menor número de vértebras possível, a fim de preservar o movimento dos segmentos e restabelecer o equilíbrio coronal e sagital do tronco (Figura 6) (TROBISCH; SUESS; SCHWAB, 2010). A cirurgia para o tratamento da escoliose idiopática está indicada para os pacientes com curvas torácicas entre 45 e 50 graus e curvas lombares acima de 40 graus (WEINSTEIN; PONSETI, 1983).



**Figura 6. Tratamento cirúrgico da escoliose idiopática.** (A) Radiografia panorâmica da coluna vertebral pré-operatória evidenciando as curvas na região torácica e lombar. (B) Fotografia intra-operatória da coluna após a correção da deformidade. (C) Radiografia panorâmica da coluna vertebral pós-operatória mostrando o alinhamento obtido com a cirurgia. Arquivo pessoal do autor.

O tratamento cirúrgico da EC é determinado principalmente pelo tipo e localização do defeito vertebral, pela idade do paciente e pela magnitude da deformidade. Os procedimentos utilizados no tratamento cirúrgico da EC normalmente envolvem artrodese da coluna, ressecção de hemivértebra, hemiepifisiodesse da convexidade e métodos de correção sem artrodese, como o uso de hastes de crescimento. Muitas vezes esses pacientes têm curvas que progridem rapidamente durante a infância e a cirurgia precoce evita que a escoliose atinja magnitudes elevadas (KASPIRIS et al., 2011). Por outro lado, a artrodese da coluna em crianças leva à restrição do crescimento da caixa torácica e à limitação do volume de expansão pulmonar (HELL; CAMPBELL; HEFTI, 2005). Nesse contexto, outras técnicas como hastes de crescimento e tutores internos do crescimento da coluna são utilizadas para o manejo da curvatura, buscam retardar a artrodese da coluna (THOMPSON; AKBARNIA; CAMPBELL, 2007).

### **1.3 Escoliose e Osteopenia**

A osteopenia se refere à diminuição da densidade mineral óssea (BMD, *bone mineral density*) diagnosticada por densitometria. Valores do *T-score*, parâmetro que compara a BMD do paciente com a média da BMD de adultos jovens, entre 1,5 e 2,5 desvios-padrão estabelecem o diagnóstico de osteopenia e valores abaixo de 2,5 desvios-padrão estabelecem o diagnóstico de osteoporose (Organização Mundial de Saúde).

A associação entre osteopenia e deformidades da coluna vertebral foi descrita pela primeira vez por Burner e colaboradores em 1982, em avaliação de radiografias do quadril de com EIA e cifose de Scheuerman (BURNER; BADGER; SHERMAN, 1982). Desde então, diversos estudos confirmaram essa relação, e a diminuição da BMD foi demonstrada não somente na coluna vertebral mas também no esqueleto apendicular (BURNER; BADGER; SHERMAN, 1982; CHENG et al., 2001; LI et al., 2008; CHIRU, 2011; DEDE et al., 2011;

LAM et al., 2011). A osteopenia ocorre em cerca de 30% dos pacientes com EIA e pode ser encontrada mesmo em pacientes com curvas pequenas recém diagnosticadas (CHENG et al., 2000). Além disso, a baixa BMD nesse grupo de pacientes pode ser correlacionado com o maior risco de progressão da deformidade (YIP et al., 2016).

Os mecanismos que levam à osteopenia nos pacientes com escoliose não estão completamente elucidados e talvez sejam relacionados também à etiologia da EIA. Apesar de diversos estudos terem demonstrado a prevalência de diminuição da BMD na escoliose idiopática, poucos estudos sobre a qualidade óssea em escolioses de outras etiologias são encontrados na literatura. Em 2009, Zhu e colaboradores demonstraram pela primeira vez redução na densidade e conteúdo mineral ósseo de paciente com EC e EIA. Os autores demonstraram diminuição da BMD através de densitometria óssea do fêmur proximal e da coluna lombar e também por análise microtomográfica de amostras de tecido ósseo obtidas durante a cirurgia para a correção das deformidades (ZHU et al., 2009). Esse foi o primeiro trabalho a demonstrar diminuição da BMD em pacientes com escoliose de outras etiologias que não a idiopática, e seus achados levantaram a hipótese de que a osteopenia seja um fator em comum nas escolioses de diferentes etiologias.

Embora a osteopenia resulte de diversos mecanismos celulares alterados, a diminuição da capacidade de diferenciação de células estromais derivadas de medula óssea em osteoblastos e concomitante aumento da diferenciação adipogênica é um dos mecanismos já descritos como possivelmente relacionado com a patogenia da doença (WANG et al, 2016).

## 1.4 Modelos celulares

O estudo de doenças em nível celular pode ser uma ferramenta importante para a compreensão da sua fisiopatologia. Células isoladas do paciente por carregar o material genético podem recapitular *in vitro* alterações funcionais do tecido alvo. Para as doenças do sistema musculoesquelético, as células estromais da medula óssea são um alvo informativo quanto à sua capacidade de regeneração e à manutenção da homeostase tecidual (MARTÍN et al., 2016).

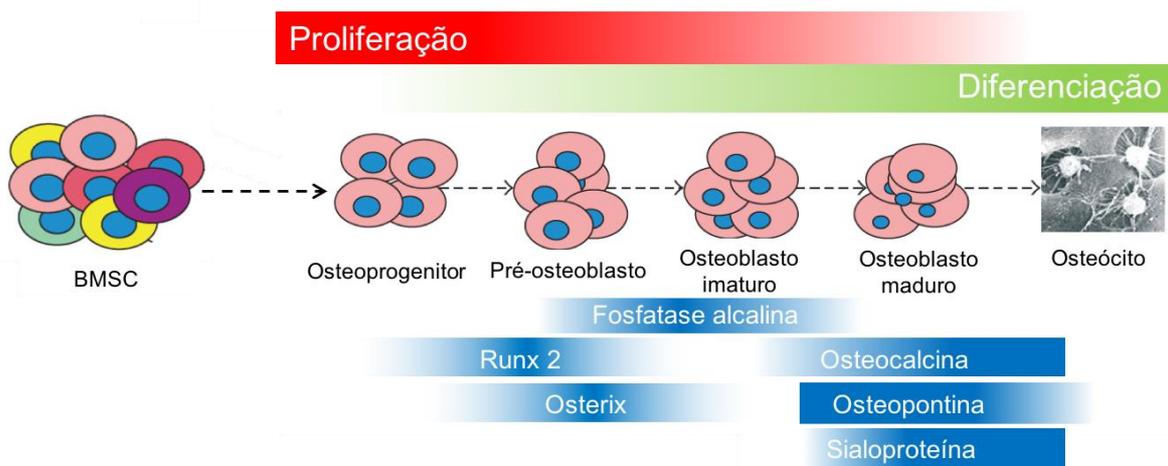
### 1.4.1 Células estromais derivadas da medula óssea

As células estromais da medula óssea (*bone marrow stromal cells*, BMSC) constituem um grupo de células que se caracterizam pela capacidade de autorrenovação, isto é, podem multiplicar e manter seu estado indiferenciado, proporcionando reposição ativa de sua população. As BMSC participam da formação óssea intramembranosa e endocondral (KULAR et al., 2012; XIAO et al., 2016) e podem se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (SPENCER; GIMBLE; LOPEZ, 2011). Além disso, são capazes de gerar osso e medula óssea quando transplantadas *in vivo* em sítios heterotópicos, criando até mesmo o compartimento estromal perivascular (BIANCO et al., 2010). Por essas propriedades, acredita-se que nessa população celular estejam contidos progenitores multipotentes para as linhagens esqueléticas (cartilagem, osso, adipócitos da medula óssea) e células estromais de sustentação à hematopoiese (DOMINICI et al., 2006). As BMSC podem ser isoladas em cultura por aderência ao plástico e caracterizadas pela expressão de proteínas de superfície como CD105, CD73 e CD90 e pela ausência de expressão de marcadores hematopoéticos e linfóides como CD34, CD45, CD14 e CD19 e de moléculas HLA. Elas representam menos de 0,01% da população de células mononucleares da medula óssea (DOMINICI et al., 2006).

#### 1.4.2 BMSC no remodelamento ósseo

O osso é um tipo de tecido conjuntivo dinâmico, formado e remodelado continuamente durante a vida a fim de proporcionar seu crescimento, adaptação mecânica, renovação tecidual e homeostase mineral (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001). O remodelamento ósseo é um processo altamente coordenado entre dois tipos celulares principais: os osteoclastos, originados da linhagem hematopoética, que reabsorvem o tecido ósseo danificado, e os osteoblastos, oriundos das BMSC, que sintetizam osteoide a fim de remodelar e reconstituir a superfície óssea. Por esse processo, a homeostase mineral é regulada e o osso é renovado (FROST, 2001; PAPACHRONI et al., 2009). O controle acoplado da atividade desses dois tipos celulares é regulado por hormônios e moléculas sinalizadoras locais, e é de fundamental importância para a manutenção da integridade do esqueleto durante a vida. O desequilíbrio da atividade dessas células leva ao desenvolvimento de doenças como a osteoporose e a osteopetrose (PHAN; XU; ZHENG, 2004).

A diferenciação de BMSC em osteoblastos envolve a ativação de fatores de transcrição específicos (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002). Esse processo engloba três fases de maturação celular: preosteoblastos, osteoblastos e osteócitos (PITTENGER et al., 1999). Diferentes fatores de transcrição como SOX9, MSX2, RUNX2 e OSTERIX regulam a diferenciação osteogênica, promovendo a proliferação e maturação dos osteoblastos. Fatores endócrinos e parácrinos como paratormônio e BMP, além de fatores exógenos como compressão mecânica e a ação da gravidade, também atuam no sentido de induzir as BMSC a se diferenciarem na linhagem osteogênica (Figura 7) (RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016).



**Figura 7. Ilustração do perfil de expressão gênica durante a diferenciação das BMSC na linhagem osteogênica.** A diferenciação e a proliferação celular são reguladas por diferentes genes durante a cascata de diferenciação das BMSC na linhagem osteoblástica. Adaptado de LUU et al., 2011.

## **2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

O Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO) é um órgão da administração pública vinculado ao Ministério da Saúde, e constitui centro de referência no tratamento ortopédico de alta e média complexidade. Em 2016, o Centro de Atendimento Especializado da Coluna realizou 485 cirurgias das quais 20% foram cirurgias para a correção de deformidades. As deformidades progridem durante o período de espera, exigindo procedimentos cirúrgicos maiores e mais complexos.

Assim, embora o tratamento da escoliose tenha como objetivo corrigir as deformidades da coluna vertebral, a osteopenia não é levada em consideração como um fator importante a ser incluído na abordagem inicial da doença. Ainda, os mecanismos celulares responsáveis pelo comprometimento da qualidade óssea nesses pacientes ainda estão sob investigação. O estudo das BMSC de pacientes com escoliose poderá contribuir para a melhor compreensão do seu potencial de formação óssea e colaborar para o melhor entendimento da etiologia da EIA e EC. Além disso, o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos com o desenvolvimento da osteopenia poderia trazer novas perspectivas terapêuticas para melhorar a qualidade óssea desses pacientes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Principal**

Caracterizar o potencial de diferenciação osteogênica de células estromais derivadas da medula óssea de pacientes com escoliose congênita e escoliose idiopática do adolescente.

#### **3.2 Objetivo Específicos**

1. Isolar BMSC de pacientes com EC, EIA e de indivíduos sem escoliose;
2. Avaliar a frequência na medula óssea e o potencial clonogênico de BMSC de pacientes com EC, EIA e de controles saudáveis;
3. Caracterizar o perfil imunofenotípico de BMSC isoladas de pacientes com EC, EIA e de controles saudáveis;
4. Analisar a potencial proliferativo das BMSC durante a expansão celular *in vitro* de pacientes com EC, EIA e de controles saudáveis;
5. Avaliar o potencial de diferenciação *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica de BMSC de pacientes com EC, EIA e de controles saudáveis;
6. Avaliar o potencial osteogênico de BMSC através de ensaio *in vivo* de pacientes com EC, EIA e de controles saudáveis.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Participantes da pesquisa**

Foram selecionados para participar do estudo pacientes tratados no INTOno período de Agosto de 2015 a Agosto de 2017, que concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (Anexo B). Foram convidados para participar do estudo:

1. Pacientes de ambos os sexos e com qualquer idade, com escoliose congênita ou idiopática, diagnosticados por exame clínico e radiografias simples da coluna vertebral nas incidências anteroposterior e perfil e submetidos a tratamento cirúrgico no Centro de Doenças da Coluna Vertebral do Instituto.
2. Pacientes com até 40 anos de idade com fraturas de ossos longos, bacia ou da coluna vertebral.

Foram excluídos do estudo pacientes com neoplasias malignas e/ou em tratamento com imunossupressores ou quimioterápicos, e pacientes com sorologia positiva para HIV, Hepatite B ou C, história de doença osteometabólica e evidência de deformidade da coluna vetebral nos pacientes sem diagnóstico de EC/EIA.

### **4.2 Coleta dos fragmentos ósseos**

Os fragmentos ósseos utilizados para o isolamento de BMSC foram coletados durante os procedimentos cirúrgicos para o tratamento de EC ou EIA (grupos escoliose) ou de fraturas secundárias a traumas (grupo controle).

Nos pacientes com escoliose ou com lesão traumática na coluna vertebral, os fragmentos ósseos foram retirados dos processos transversos e espinhosos das vértebras do

segmento da coluna a ser artrodesado. Nos pacientes do grupo controle as amostras de tecido ósseo foram coletadas da região posterior da crista ilíaca durante abordagem posterior do quadril para o tratamento cirúrgico de fratura da pelve ou do foco de fratura de tíbia durante exposição no tratamento cirúrgico.

### **4.3 Isolamento e expansão de células estromais da medula óssea**

Após a coleta, os fragmentos ósseos foram transportados em frascos estéreis para o Centro de Tecnologia Celular do INTO. No fluxo laminar, os fragmentos ósseos foram lavados em solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio (CMF) para dissociação da medula óssea. Após a sedimentação das espículas ósseas, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 200g por 5 min. O *pellet* celular foi ressuspenso em meio de expansão celular contendo  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -Minimum Essential Medium, LGC Biotecnologia), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) e 1% de antibióticos (penicilina G sódica 100 U/ml e estreptomicina 100  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich).

Para contagem de células mononucleares, uma alíquota da suspensão celular foi homogeneizada com solução de ácido acético a 2% (1:1, v:v) a fim de induzir a lise de hemácias. Após contagem em câmara de Neubauer,  $3,0 \times 10^5$  células mononucleares foram plaqueadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>, em triplicata, para a realização do ensaio de eficiência de formação de colônias (CFE). Para expansão celular, foram plaqueadas  $4,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Após três dias, as culturas foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS, Sigma-Aldrich) para remoção das células não aderentes com troca do meio de cultivo. Durante a expansão celular nos 11 dias seguintes, o meio de cultivo foi trocado a cada três dias com as células foram mantidas em incubadoras com 5% CO<sub>2</sub> e a 37°C. Para a realização dos experimentos as células foram expandidas até no máximo a passagem quatro.

#### **4.4 Ensaio de eficiência de formação de colônias**

Após 14 dias do isolamento das BMSC, as unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F) foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS (Sigma-Aldrich) por 15 minutos e coradas com solução aquosa de cristal violeta a 1% (Sigma-Aldrich). Após lavagem em água corrente e secagem à temperatura ambiente (T.A.), as colônias contendo mais de 50 células foram quantificadas manualmente e tiveram seus diâmetros mensurados com auxílio de régua milimetrada. O número de CFU-F foi normalizado pelo número de células mononucleares plaqueadas ( $2,0 \times 10^5$  células).

#### **4.5 Análise do tempo de duplicação celular (*population doubling time*, PDT)**

O tempo necessário para as duplicações celulares foi avaliado durante a fase de expansão celular *in vitro*. Para o cálculo foram considerados o número de células plaqueadas, o número de células obtidas ao final de cada passagem e o intervalo de tempo compreendido em cada passagem. Foi utilizada solução de azul de tripan (0,4% em PBS, Sigma-Aldrich) para a exclusão de células mortas nas contagens celulares. O tempo de um ciclo de duplicação celular foi calculado através da fórmula:  $PDT = \Delta T \times \log(2) / (\log N_f - \log N_i)$ , onde  $\Delta T$  é o intervalo de tempo em dias,  $N_f$  é o número de células final e  $N_i$  é o número de células inicial. Para esses cálculos, foi utilizado o *Doubling Time Software* v1.0.10, BMSC em <http://www.doubling-time.com/compute.php> (KIM et al., 2011; HAIL et al., 2012).

#### **4.6 Imunofenotipagem por citometria de fluxo**

Para realização da citometria de fluxo, foram utilizadas  $8,0 \times 10^4$  células por tubo de análise. As células foram incubadas com tampão de (solução de PBS com 3% de SFB) por 30 min a 4°C. Após centrifugação a 200g por 5 min, os *pellets* celulares foram incubados com os seguintes anticorpos: anti-CD90 Percp-Cy5.5, anti-CD73 APC (todos da BD Biosciences) e

anti-CD146 PE (Clone SHM-57, Biolegend); anti-CD34 FITC (Dako) e anti-CD45 Percp-Cy5.5 (clone D3/9, Immunostep). Após incubação por 30 min a 4°C, protegido da luz, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão para leitura no citômetro de fluxo BD Accuri (BD Biosciences). A análise foi realizada no *software* do BD Accuri C6. Foram considerados para a análise pelo menos 20.000 eventos dentro da região de interesse.

#### **4.7 Ensaios de diferenciação *in vitro***

##### **4.7.1 Diferenciação osteogênica**

Um total de de  $1,3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo 1 mL de  $\alpha$ -MEM com 20% SFB e antibióticos por poço. Após confluência até formação de monocamada, as células foram incubadas em meio osteogênico composto de  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de SFB, 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato, 5  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico 2-fosfato e  $10^{-6}$  M de dexametasona (todos da Sigma-Aldrich). A troca de meio foi realizada a cada 3 dias, e o ensaio foi conduzido até o 14º dia. Como controle experimental, células também foram mantidas em meio de expansão celular ( $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de SFB) durante os 14 dias do ensaio. As células foram mantidas em incubadoras com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. O ensaio de diferenciação foi realizado em triplicatas e a visualização dos focos de mineralização foi realizada a coloração pelo vermelho de alizarina.

Para detecção de matriz mineralizada as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 15 min à TA. Após lavagem com água destilada, as células foram incubadas com vermelho de alizarina 40 mM (Sigma-Aldrich) por 30 minutos em agitação branda. Por fim, as células foram lavadas 5 vezes com água destilada. As células foram inspecionadas em microscópio óptico (TS100, Nikon) e as fotomicrografias foram adquiridas com câmera digital Nikon Digital Sight DS-U3 (Nikon).

#### 4.7.2 Diferenciação adipogênica

Um total de  $1,3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo 1 mL de  $\alpha$ -MEM com 20% SFB e antibióticos. Após confluência total da monocamada, as células foram incubadas em meio adipogênico composto de  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% SFB, 0,5 mM de isobutilmetilxantina,  $10^{-8}$  M de dexametasona, 200 mM de indometacina (todos da Sigma-Aldrich) e 10 mM de insulina (Humulin®, Lilly) por 21 dias. A troca de meio foi realizada a cada 3 dias. O ensaio de diferenciação foi realizado em triplicatas. As células foram mantidas em incubadoras com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C e o acúmulo lipídico intracitoplasmático foi avaliado pela coloração de *Oil Red O*. Após fixação com paraformaldeído a 4% em PBS (15 minutos, à TA), as células foram incubadas com propilenoglicol P.A. (Sigma-Aldrich) por 2 minutos e com solução de *Oil Red O* a 0,5% (em propilenoglicol, Sigma-Aldrich) por mais 20 minutos à TA. O excesso de corante foi removido em lavagem com solução de propilenoglicol a 85%, seguida por três lavagens em água destilada. As fotomicrografias foram adquiridas em microscópio óptico TS100 (Nikon), equipado com câmera digital Nikon Digital Sight DS-U3 (Nikon).

#### 4.7.3 Diferenciação condrogênica

Para a indução da diferenciação condrogênica,  $1,0 \times 10^5$  células foram ressuspensas em 10  $\mu$ L de  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% SFB e plaqueadas em placas de 96 poços. Após 30 minutos, o meio de cultivo foi trocado por meio condrogênico StemPro® (Gibco, Life Technologies). As células foram mantidas em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 21 dias, sendo o meio trocado a cada três dias. A detecção de proteoglicanos sulfatados foi realizada pela coloração com azul de alcian.

As esferas celulares formadas durante o processo de diferenciação condrogênica foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% por 1 hora à T.A. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 6 µm de espessura. Em seguida, os cortes foram corados por 30 minutos em solução de azul de alcian 1% (Santa Cruz Biotechnology) em ácido acético 3% (pH 2,5). As fotomicrografias foram adquiridas em microscópio óptico Eclipse E600 (Nikon), equipado com câmera digital Nikon Digital Sight DS-U3 (Nikon).

#### **4.8 Ensaio de diferenciação osteogênica *in vivo***

Um total de  $1,0 \times 10^6$  células foram ressuspensas em 1 mL de  $\alpha$ -MEM com 20% SFB, misturadas a 30 mg de hidroxiapatita/tricalciofosfato em pó (Osteoset® T, Wright Medical) e incubadas por 12 horas em microtubo fechado em estufa a 5% CO<sub>2</sub> e a 37°C. Após descartar o sobrenadante, 15 µL de fibrinogênio humano (3,2 mg/mL em PBS) e 15 µL de trombina humana (100 U/mL em solução 0,1% w/v de albumina bovina) (ambos da Sigma) foram adicionados ao agregado de células. Aguardadas 3 horas para a polimerização da fibrina, os agregados de células e hidroxiapatita foram moldados em pequenas esferas e implantados no tecido subcutâneo do dorso de camundongos imunodeficientes (C57BL/6.Cg-Foxn1nu/NTAcUnib) com oito semanas de idade. A indução anestésica foi realizada em câmara de indução com concentração alveolar mínima de isoflurano (BioChimico) de 5,0% e a manutenção foi realizada com 2,0% através de máscara facial acoplada a vaporizador universal (Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Durante a anestesia foram avaliados os parâmetros: reflexo podal de retirada, tônus muscular, frequências cardíaca e respiratória. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da instituição, registrados sob o número 002/2014 (Anexo E). Após 12 semanas, os animais foram eutanasiados por anestesia profunda, os implantes foram coletados e fixados por 24 h em solução de paraformaldeído a 4% em PBS e preparados para análise histológica.

#### 4.9 Análise histológica

Após a fixação os implantes foram submetidos a descalcificação por três dias em solução de ácido nítrico 10%. Em seguida, foram lavados em água corrente e desidratados em gradiente crescente de álcool (80%, 90%, 95% e 100%), clarificados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos obtidos com 6  $\mu\text{m}$  de espessura foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de álcool (100%, 95%, 70% e água destilada) e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As fotomicrografias foram adquiridas em microscópio óptico Eclipse E600 (Nikon) equipado com câmera digital Nikon Digital Sight DS-U3 (Nikon).

#### 4.10 Análise estatística

Para a detecção de *outliers* dentro de cada grupo experimental, foi realizado o teste de Grubbs no *software* GrahPad disponibilizado *online* em <https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>.

A distribuição da amostra foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores numéricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Comparações entre os grupos controle, EC e EIA foram realizadas por One-Way ANOVA seguido por pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Foi adotado intervalo de confiança de 95% para consideração de significância estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6.

## 5. RESULTADOS

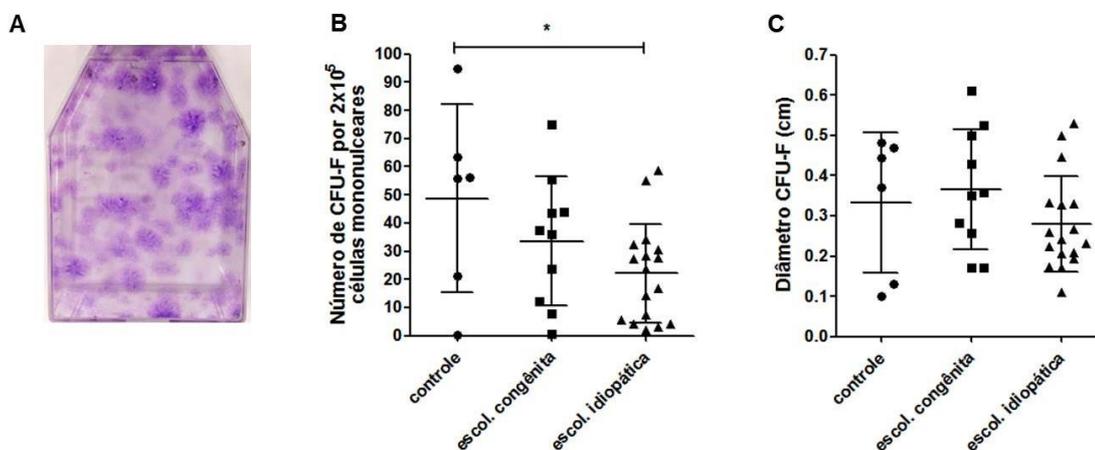
Foram coletadas amostras de 36 pacientes, distribuídos segundo o grupo experimental a que pertenciam. O grupo escoliose congênita (EC) foi constituído por onze participantes (sete do sexo feminino e quatro do sexo masculino), com idade média de  $16,6 \pm 5,5$  anos de idade. A média do ângulo de Cobb da maior curvatura da coluna foi de  $64,5 \pm 20,04$  graus. O grupo escoliose idiopática do adolescente (EIA) foi formado por 19 participantes (17 do sexo feminino e dois do sexo masculino), com idade média de  $21,0 \pm 3,2$  anos de idade. A média do ângulo de Cobb da maior curvatura da coluna foi de  $69,7 \pm 18,0$  graus. Por fim, o grupo controle foi composto por seis participantes (dois do sexo feminino e quatro do sexo masculino), com idade média de  $26,7 \pm 7,7$  anos. Três pacientes apresentavam fratura vertebral, dois, fratura da pelve e um, fratura da tíbia (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características dos participantes da pesquisa

Grupo	Sexo	Idade	Sítio da fratura	Tipo de malformação vertebral	Ângulo de Cobb
<b>Controle</b>					
	masculino	31	Fratura de Pelve	--	--
	feminino	18	Fratura de Pelve	--	--
	masculino	23	Fratura de tibia	--	--
	feminino	31	Fratura de vértebra	--	--
	masculino	36	Fratura de vértebra	--	--
	masculino	17	Fratura de vértebra	--	--
<b>Escoliose congênita</b>					
	masculino	14	--	Hemivértebra L1	47
	feminino	23	--	Hemivértebra T6	68
	masculino	9	--	Hemivértebra L3	50
	feminino	14	--	Hemivértebra L1	62
	feminino	14	--	Hemivértebra T3	84
	feminino	16	--	Hemivértebra T9 + barra óssea	51
	feminino	25	--	Hemivértebra T8	93
	masculino	21	--	Barra óssea + hemivértebras torácicas	97
	masculino	15	--	Hemivértebra L4	40
	feminino	23	--	Hemivértebra L3	73
	feminino	9	--	Hemivértebra T9	45
<b>Escoliose idiopática do adolescente</b>					
	feminino	21	--	--	66
	feminino	21	--	--	64
	feminino	19	--	--	59
	feminino	19	--	--	67
	feminino	24	--	--	110
	feminino	23	--	--	60
	feminino	27	--	--	75
	feminino	22	--	--	63
	feminino	15	--	--	107
	feminino	28	--	--	55
	feminino	21	--	--	66
	masculino	22	--	--	55
	feminino	18	--	--	63
	feminino	17	--	--	50
	feminino	20	--	--	62
	feminino	22	--	--	70
	feminino	21	--	--	78
	masculino	22	--	--	51
	feminino	18	--	--	103

## 5.2 Frequência das células estromais da medula óssea (BMSC)

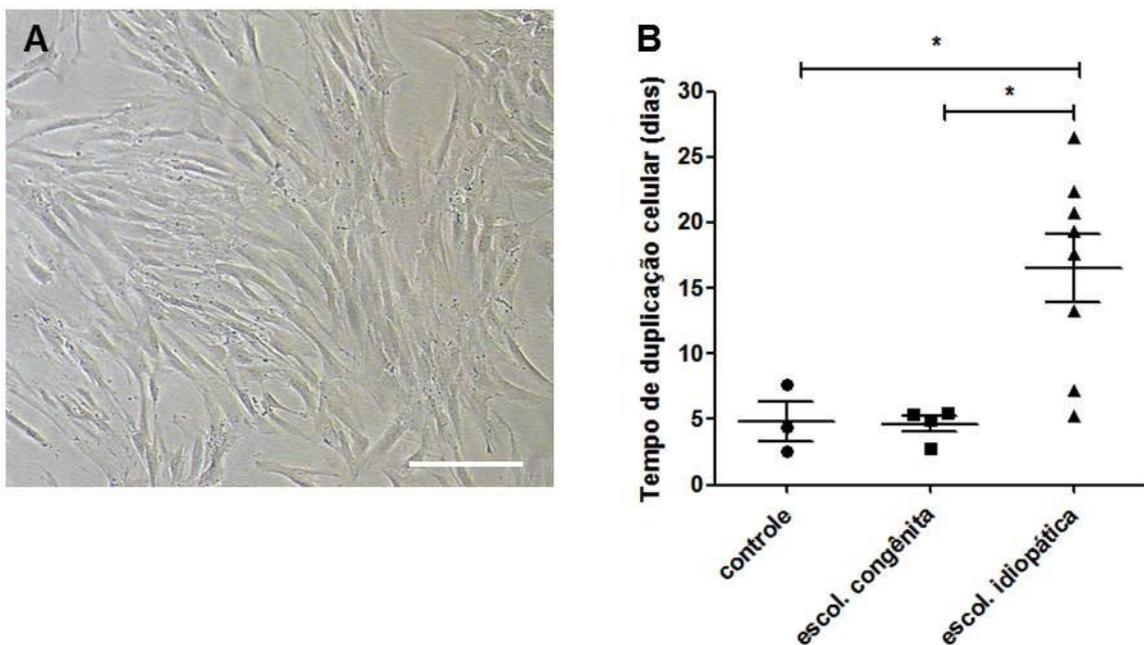
Para a determinação da frequência de BMSC nos grupos controle, EC e EIA foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F) após o isolamento celular (Figura 8A). A quantidade média de CFU-F foi de  $48,7 \pm 33,3$  no grupo controle,  $33,5 \pm 22,9$  no grupo EC e  $22,1 \pm 17,4$  no grupo EIA, sendo encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e EIA ( $p < 0,05$ ) (Figura 8B). O potencial de clonogênico das BMSC foi avaliado pela mensuração do diâmetro das CFU-F. A média do diâmetro das CFU-F foi de  $0,33 \pm 0,17$  cm no grupo controle,  $0,36 \pm 0,15$  cm no grupo EC e  $0,28 \pm 0,12$  cm no grupo EIA, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 8C,  $p = 0,29$ ).



**Figura 8. Ensaio de eficiência de unidades formadoras de colônias fibroblastoides.** (A) Aspecto macroscópico das CFU-F coradas com cristal violeta, após 14 dias em cultura. (B) Número de CFU-F por  $2 \times 10^5$  células mononucleares plaqueadas por garrafa de  $25 \text{ cm}^2$ . (C) Diâmetro das CFU-F. Dados representados como média  $\pm$  DP. \*  $p < 0,05$ .

### 5.3 Caracterização da proliferação *in vitro* das BMSC

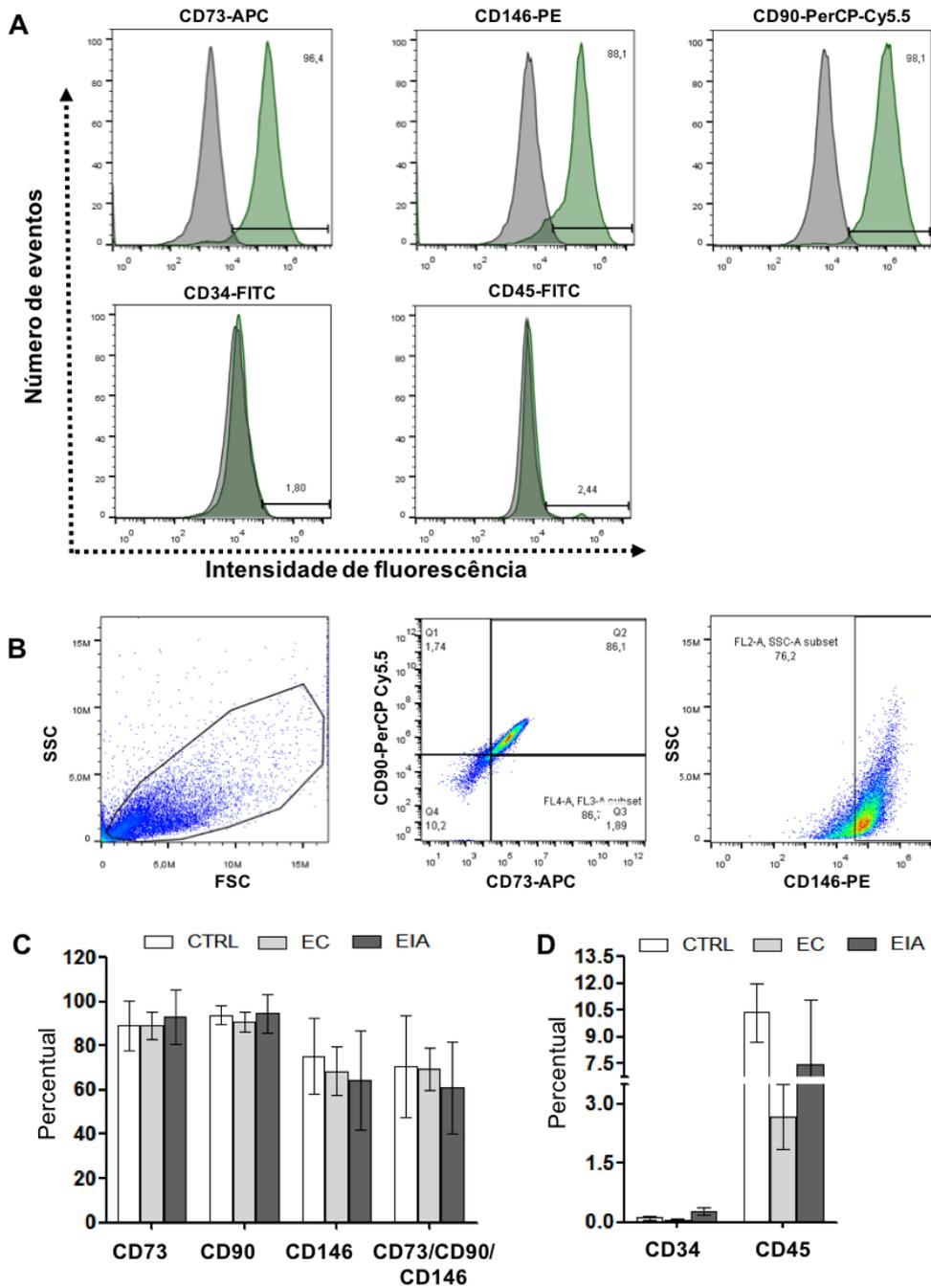
BMSC isoladas de EC, EIA e de pacientes do grupo controle demonstraram morfologia celular fibroblastoide em cultura (Figura 9A). Para avaliar o potencial proliferativo dessas células *in vitro*, foi calculado o tempo de duplicação celular (*population doubling time*, PDT). O PDT das BMSC do grupo EIA ( $16,5 \pm 7,4$  dias) foi significativamente maior em comparação ao PDT das BMSC do grupo controle ( $4,9 \pm 2,6$  dias) e do grupo EC ( $4,7 \pm 1,3$  dias) ( $p < 0,05$ ) (Figura 9B).



**Figura 9. Análise do tempo de duplicação das BMSC.** (A) Fotomicrografia demonstrando a morfologia fibroblastoide de BMSC do grupo controle na passagem 2. (B) Tempo de duplicação celular. Dados representados como média  $\pm$  DP. Em A, barra de escala equivale a 100  $\mu$ m. \*  $p < 0,05$ .

#### 5.4 Perfil imunofenotípico das BMSC

Para caracterizar as células isoladas da medula óssea, investigamos o perfil de marcadores de superfície nos diferentes grupos experimentais através de citometria de fluxo, para a presença das proteínas CD73, CD90, CD146 (característicos de BMSC) além de CD34 e CD45 (expressos por células hematopoiéticas). Nas células isoladas de pacientes do grupo controle, as células expressando CD73, CD90 e CD146 foram  $89,0 \pm 11,2\%$ ,  $93,9 \pm 4,2\%$  e  $73,3 \pm 17,1\%$ , respectivamente, sendo que  $70,5 \pm 23,0\%$  das células expressavam os três marcadores simultaneamente. Das células obtidas de pacientes com EC,  $89,2 \pm 6,4\%$  expressavam CD73,  $90,9 \pm 4,3\%$  expressavam CD90,  $68,5 \pm 10,9\%$  expressavam CD146 e  $69,6 \pm 9,6\%$  da população celular expressavam CD73/CD90/CD146. As células do grupo EIA expressavam CD73 em  $93,3 \pm 12,4\%$  de sua população, CD90 em  $94,6 \pm 8,8\%$ , CD146 em  $64,4 \pm 22,6\%$  e os três marcadores simultaneamente em  $61,3 \pm 20,8\%$ . Em relação aos antígenos da linhagem hematopoiética, foi observada a presença do CD34 em  $0,1 \pm 0,1\%$  das células no grupo controle,  $0,05 \pm 0,05\%$  no grupo EC e  $0,28 \pm 0,28\%$  no grupo EIA. CD45 foi detectado em  $10,4 \pm 2,8\%$  no grupo controle,  $2,7 \pm 1,8\%$  no grupo EC e  $7,4 \pm 10,9\%$  no grupo EIA. A frequência dos diferentes marcadores de superfície encontra-se resumida na Figura 10.

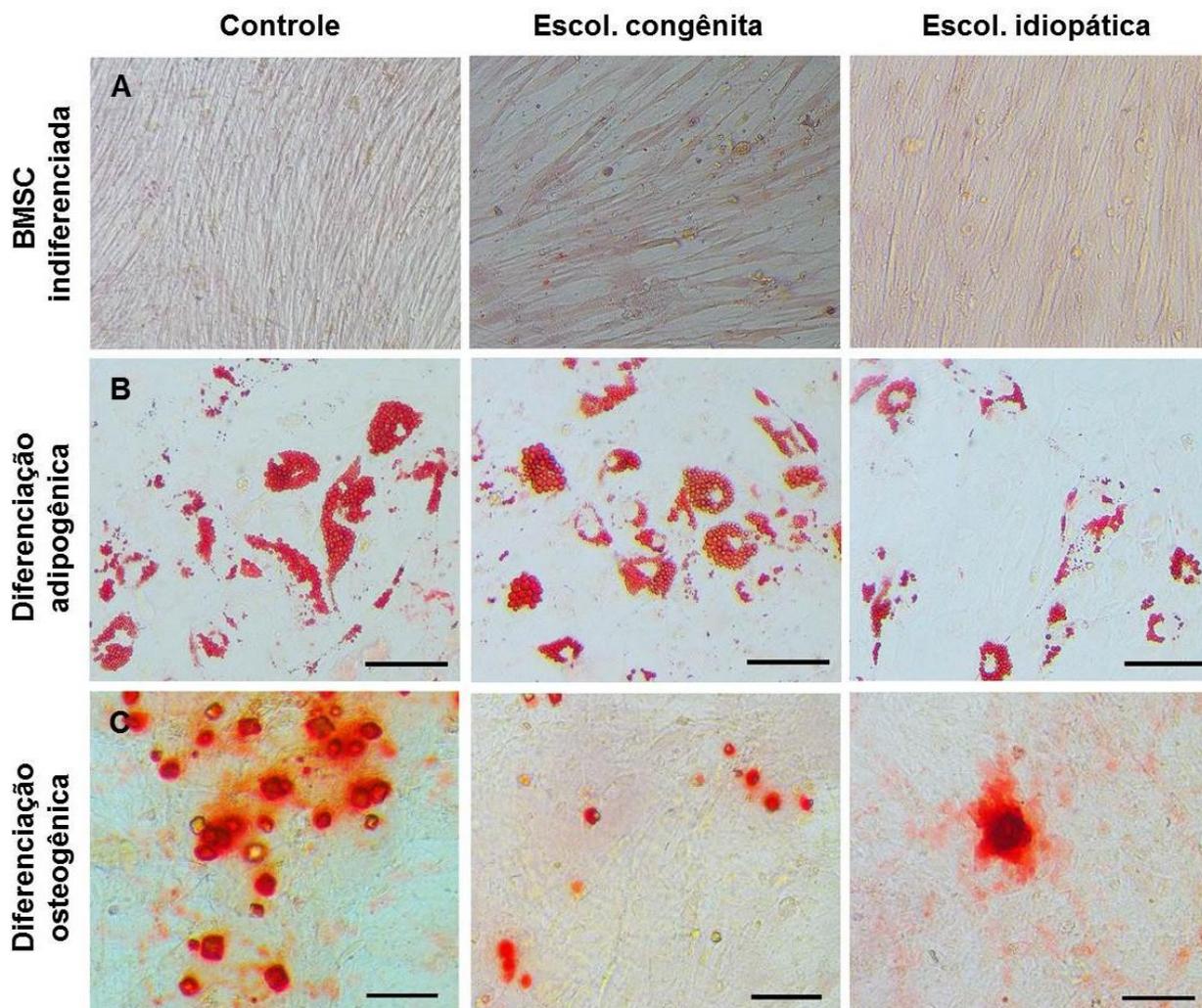


**Figura 10. Imunofenotipagem das BMSC.** (A) Histogramas representativos demonstrando a expressão (curvas em verde) das proteínas de superfície CD73, CD146, CD90, CD34 e CD45 em comparação ao controle negativo (curvas em cinza). (B) Gráficos representativos *dot plot* demonstrando seleção da população duplo positiva para CD73/CD90 e, em sequência, da população triplo positiva para CD73/CD90/CD146. (C) Frequência dos marcadores CD73, CD90 e CD 146 nos grupos controle, EC e escoliose idiopática. (D) Frequência dos marcadores CD34 e CD45 nos grupos controle, EC e escoliose idiopática. Barras representam médias  $\pm$  DP. BMSC controle n=4; BMSC/EC n=5; BMSC/EIA n=9.

## 5.5 Potencial de diferenciação *in vitro* das BMSC

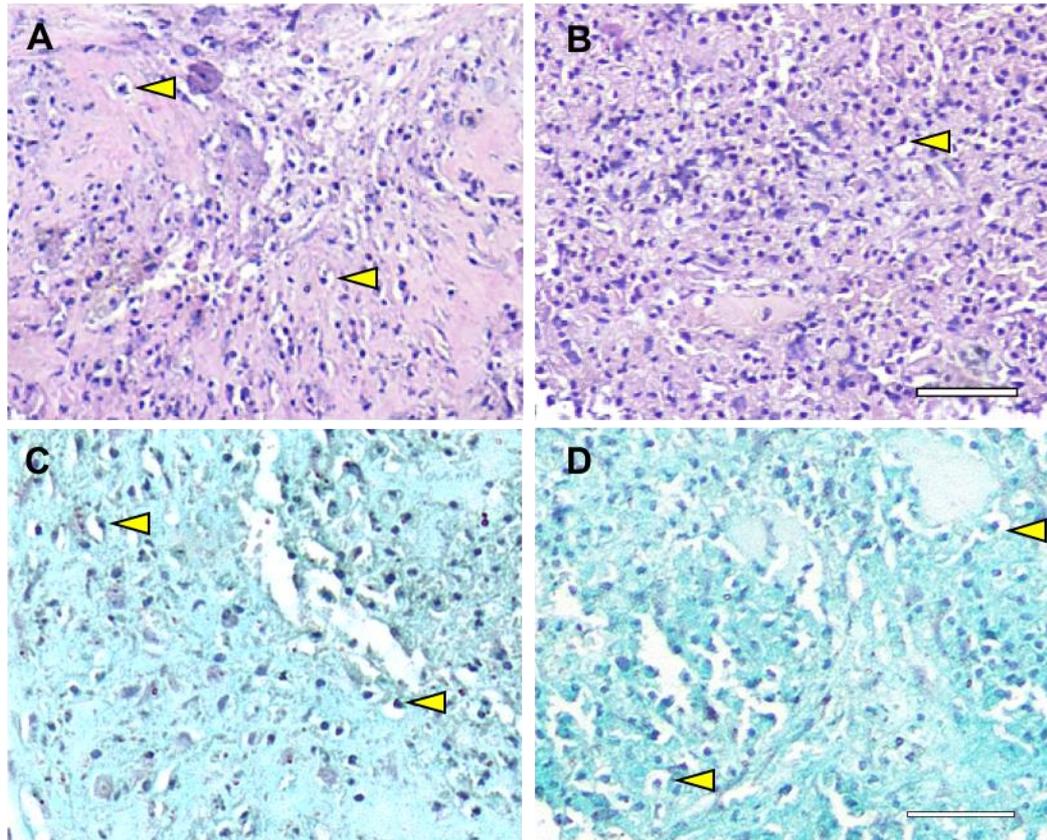
Para a determinação do potencial de diferenciação das BMSC dos três grupos experimentais, foram realizados ensaios de diferenciação *in vitro* para as seguintes linhagens celulares: osteogênica, adipogênica e condrocítica.

A diferenciação adipogênica ocorreu nos três grupos após a coloração pelo *Oil Red O* evidenciada por gotículas de cor alaranjada indicando a presença de lipídios no interior da célula (Figura 11B). A diferenciação osteogênica foi evidenciada após a coloração com vermelho de alizarina através da identificação de depósitos de sais de cálcio (Figura 11C). Todas as BMSC (duas amostras do grupo controle, três do grupo EC e uma do grupo EIA), submetidas aos protocolos de diferenciação osteogênica e adipocítica demonstraram capacidade de diferenciação em adipócitos e osteoblastos.



**Figura 11. Diferenciação osteogênica e adipocítica *in vitro* das BMSC em adipócitos e osteoblastos.** (A) Morfologia de BMSC em confluência na terceira passagem. (B) Coloração pelo *Oil Red O* após três semanas de indução adipogênica. (C) Coloração pelo vermelho de alizarina após duas semanas de indução osteogênica. Barras de escala em correspondem a 100  $\mu\text{m}$ .

Para verificar o potencial de diferenciação condrogênica das BMSC, células derivadas de dois pacientes com EIA e de um paciente com EC foram induzidas por 21 dias à diferenciação tridimensional em esferas condrogênicas. Foi utilizada a coloração azul de alcian para a identificação de proteoglicanos sulfatados na matriz extracelular das esferas. Ao final do processo de indução da diferenciação as três amostras testadas foram positivas para proteoglicanos sulfatados (Figura 12).



**Figura 12. Diferenciação *in vitro* das BMSC na linhagem condrogênica.** Fotomicrografias representativas da diferenciação condrogênica *in vitro* induzidas por 21 dias. A localização das células no interior de lacunas (cabeça de setas) e a positividade da matriz extracelular para glicosaminoglicanos confirmam a indução do fenótipo nas BMSC/EIA (A e C) e BMSC/EC (B e D). A e B: coloração pela H&E; C e D: coloração pelo azul de alcian. Barras de escala equivalem a 200  $\mu$ m. BMSC/EC n=1; BMSC/EIA n=2.

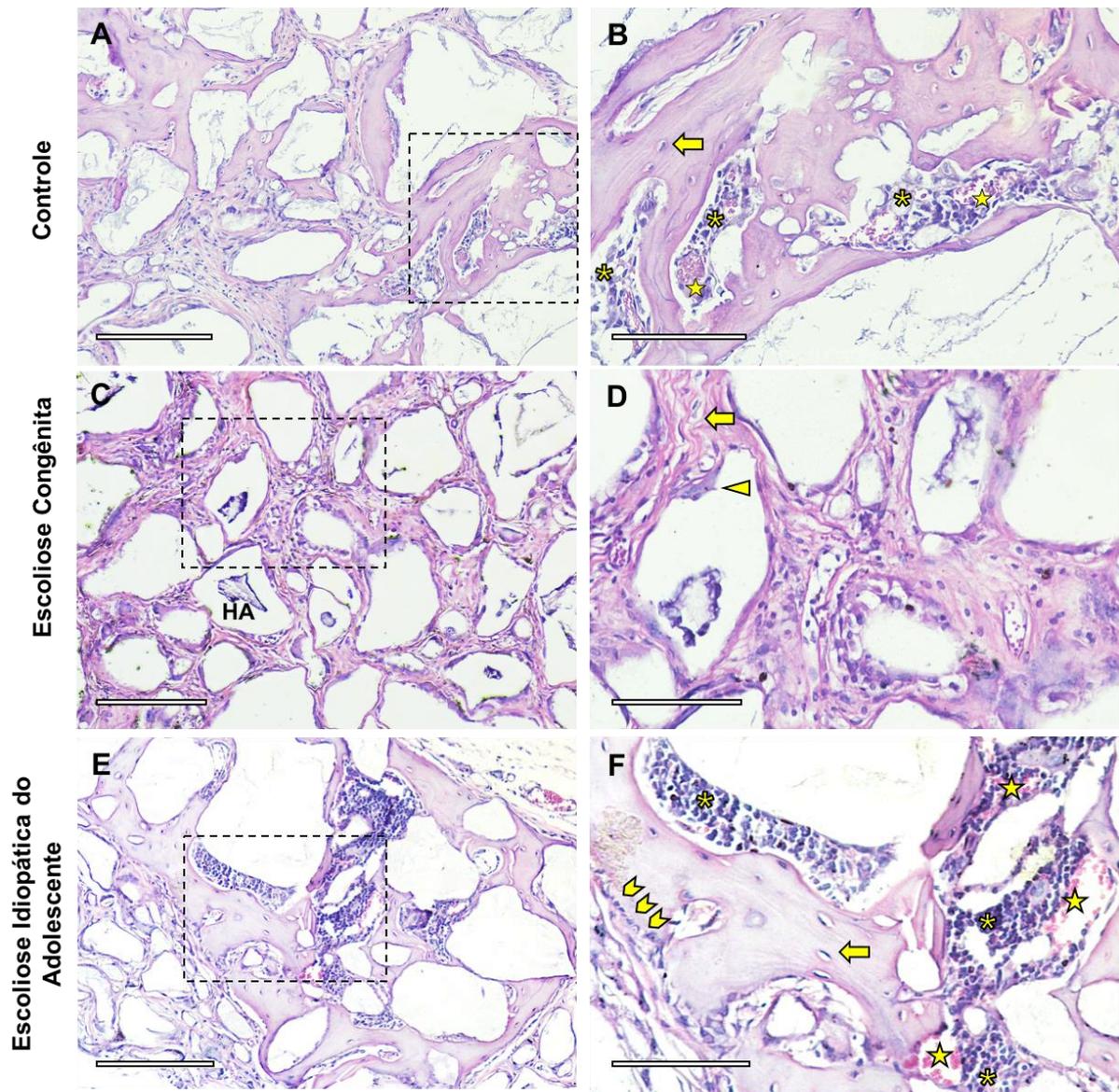
### 5.6 Avaliação da diferenciação *in vivo* das BMSC

Além dos ensaios de diferenciação *in vitro*, para testar o potencial de diferenciação osteogênica *in vivo*, BMSC dos três grupos experimentais foram introduzidas em associação com hidroxiapatita no tecido subcutâneo do dorso de camundongos imunodeficientes.

Após 12 semanas em uma das amostras do grupo controle houve formação de tecido ósseo com osteócitos embebidos na matriz mineralizada, vasos sanguíneos e sítios de hematopoiese (Figura 13A e B).

Nos dois implantes realizados com BMSC de pacientes com EC não houve formação de tecido ósseo. Os cristais de hidroxiapatita mostravam relação apenas com tecido conjuntivo rico em fibras colágenas contendo células gigantes multinucleadas e vasos neoformados (Figura 13 C e D).

Das três amostras de EIA, em duas houve formação de tecido ósseo. O tecido neoformado *in vivo* reproduziu a microarquitetura do osso esponjoso, evidenciada por trabéculas ósseas interconectadas dispostas em torno dos cristais de hidroxiapatita, atividade de formação comprovada pela presença de revestimento da superfície por matriz osteóide em relação com osteoblastos cuboidais e ainda pela formação de estroma de sustentação da medula óssea contendo sítios de hematopoiese. O conjunto desses achados histológicos comprova a capacidade das células transplantadas em recapitular o microambiente da medula óssea (Figura 13 E e F).



**Figura 13. Diferenciação osteogênica *in vivo* das BMSC.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos dos implantes de hidroxiapatita e BMSC após 12 semanas de inserção no tecido subcutâneo do dorso de camundongos imunodeficientes. (A) Amostra do grupo controle evidenciando formação óssea. (B) Detalhe em maior aumento dos osteócitos no interior de lacunas e aprisionados na matriz mineralizada, vasos neoformados (estrela) e sítios de hematopoiese (asterisco). (C) Amostra do grupo EC evidenciando a formação de tecido conjuntivo fibroso em relação com os cristais de hidroxiapatita (HA). (D) Detalhe em maior aumento das fibras colágenas (seta) e célula gigante multinucleada (cabeça de seta). (E) Amostra do grupo EIA evidenciando formação óssea exuberante. (F) Detalhe em maior aumento dos osteócitos (seta), osteoblastos (cabeça de seta), vasos neoformados (estrela) e sítios de hematopoiese (asterisco). Barras de escala em A, C e E correspondem a 100  $\mu$ m. Barras de escala em B, D e F correspondem a 200  $\mu$ m. BMSC controle n=2; BMSC/EC n=2; BMSC/EIA n=3.

## 6. DISCUSSÃO

Durante o período de crescimento, o esqueleto se desenvolve e é esculpido até alcançar o formato e tamanho observados na maturidade. Da primeira infância até o final da adolescência, a atividade de formação predomina sobre a de reabsorção óssea, resultando em aumento da massa óssea (BACHRACH et al., 1999; HENRY; FATAYERJI; EASTELL, 2004). Dependendo do sítio do esqueleto, o crescimento linear ósseo ocorre em diferentes velocidades. Enquanto o crescimento do esqueleto apendicular é prevalente antes da puberdade, o conteúdo mineral e a densidade mineral óssea aumentam em até seis vezes na coluna vertebral nessa fase da vida (BASS et al., 1999; BRADNEY et al., 2000). Logo, a puberdade é um período crítico do desenvolvimento para que deficiências na síntese de matriz óssea possam se manifestar. A importância do estirão de crescimento durante a puberdade para a progressão da deformidade na EIA é bem caracterizada (BUSSCHER; WAPSTRA; VELDHUIZEN, 2010; COILLARD; CIRCO; RIVARD, 2013).

Desde de a primeira observação de Burner e colaboradores, em 1982, sobre a redução da BMD em pacientes com deformidades na coluna, diversos trabalhos demonstraram a ocorrência de osteopenia em pacientes com EIA. A osteopenia foi diagnosticada tanto na coluna vertebral quanto no esqueleto apendicular (CHENG et al., 2000, 2006; CHEUNG et al., 2006), em pelo menos 30% desses pacientes (TAHVILDARI; ERFANI, 2014). Apesar de ser considerada uma doença multifatorial e de causas ainda pouco conhecidas, sabe-se que a osteopenia nos pacientes com EIA é primária e não secundária à deformidade da coluna vertebral (CHENG; GUO, 1997). A osteopenia pode ter como causa alterações no desenvolvimento e no metabolismo do tecido ósseo (CHEUNG et al., 2006; LAM et al., 2011). Além disso, o valor prognóstico que a BMD apresenta na progressão da curva da EIA sugere que o desenvolvimento e a progressão da doença tenham uma base metabólica (YIP et al., 2016).

Os relatos da literatura sobre a BMD em pacientes com escoliose de outras etiologias que não a EIA ainda são escassos. O único estudo realizado em amostras de osso da crista ílica de pacientes com EC mostrou redução no número de trabéculas e no volume mineral ósseo desses pacientes em relação a pacientes com EIA (ZHU et al., 2009). Como a EC ocorre por alterações nos precursores vertebrais (somitos), teoricamente, o metabolismo ósseo não estaria alterado neste grupo de pacientes. As deformidades precoces na EC possivelmente limitam o desenvolvimento pulmonar resultando em menor nível de atividade física e osteopenia.

A formação, o desenvolvimento e a homeostase do tecido ósseo são processos que dependem do equilíbrio da atividade de duas linhagens celulares: as células formadoras de osso (osteoblastos) e as células reabsortivas do osso (osteoclastos) (FROST, 2001). Esses tipos celulares são derivados de linhagens celulares diferentes. As células formadoras de osso derivam das BMSC e os osteoclastos são derivados da linhagem hematopoética (TITORENCU et al., 2014).

Admite-se que a osteopenia possa ser causada por um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, levando à redução da massa óssea total. Na osteoporose, a menor capacidade de formação óssea resulta, em parte, de um número reduzido da população de osteoblastos e de seus precursores (BYERS et al., 1997; RODRÍGUEZ et al., 1999; WOLF; PENDERGRASS, 1999; PARFITT et al., 2009). No ensaio de CFU-E, o número de colônias formadas por um número definido de células da medula óssea plaqueadas representa a enumeração *in vitro* de um subgrupo de células da medula óssea com potencial clonogênico (KUZNETSOV et al., 2009). A população de células que formam as CFU-F é heterogênea e contém células-tronco esqueléticas (SSC, *skeletal stem cells*) multipotentes, capazes de formar cartilagem, osso, estroma de suporte à hematopoese e adipócitos, além progenitores comprometidos apenas com as linhagens osteogênica, condrogênica ou adipogênica

(FRIEDENSTEIN, 1980). Apesar de não haver marcadores que possam separar prospectivamente CFU-F multipotenciais de CFU-F mais comprometidas, o ensaio de CFU-E atualmente é a abordagem mais próxima para a determinação da concentração de SSC na medula óssea (BIANCO P. e ROBEY P.G., 2004).

Nossos dados demonstraram que a medula óssea vertebral de pacientes portadores de EIA apresenta menor número de CFU-F em relação a pacientes do grupo controle sem escoliose. A redução do número de CFU-F em pacientes com EIA pode ter como consequência a redução do número de osteoblastos presentes nas unidades de remodelação óssea (BMU, *bone modeling units*) e, por conseguinte, gerar um balanço negativo da formação, levando à osteopenia. Os resultados do ensaio de CFE não demonstraram diferenças nos diâmetros das colônias, sugerindo que a frequência, mas não o potencial clonogênico de células progenitoras esqueléticas, possa estar relacionada à EIA. Já foi reportado que baixa CFE está relacionada com a redução da densidade mineral óssea em receptores de transplante de medula óssea (GALOTTO et al., 1999).

Nossos resultados constituem o primeiro relato sobre CFU-E em BMSC isoladas de pacientes com EIA e EC e a descrever alterações na sua frequência em pacientes com EIA. Em um estudo sobre qualidade óssea em EIA, em modelo de galinhas pinealectomizadas (obtido por remoção da glândula pineal), foi observado que a osteopenia está relacionada com a redução da população de osteoblastos e não com o aumento da população de osteoclastos (KONO et al., 2011; ISHIDA et al., 2016). Esses achados sugerem que a redução do potencial proliferativo de osteoblastos, da disponibilidade de suas células progenitoras ou ainda do potencial de diferenciação de sua progênie poderiam contribuir para a patogenia da redução da massa óssea.

Nossos dados também demonstraram que o tempo de duplicação populacional das BMSC EIA é maior em relação às BMSC de pacientes controle e de EC. Embora as BMSC

sejam capazes de proliferar de forma a gerar um número suficiente de células por um período de tempo relativamente curto (COLTER et al., 2000; SEKIYA et al., 2002), as BMSC tendem a diminuir sua capacidade proliferativa como consequência da ausência da atividade de telomerase *in vitro* (BANFI et al., 2002). O aumento do PDT das BMSC EIA é indicativo de senescência precoce em relação às células dos outros grupos controle e EC. Entretanto, para confirmar essa possibilidade, seria ainda necessário analisar outros marcadores de senescência celular como expressão das proteínas de controle do ciclo celular p16 e p21 (STEIN et al., 1999), tamanho de telômeros (SHAWI; AUTEXIER, 2008) ou caracterizar a atividade de  $\beta$ -galactosidase (ITAHANA; CAMPISI; DIMRI, 2007).

Há mais de dez anos a Sociedade Internacional de Terapia Celular adotou critérios mínimos para definir características de BMSC cultivadas *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). Foram estabelecidos como padrão para essas células: capacidade de aderência ao plástico do frasco de cultivo celular, a expressão de moléculas CD (*cluster of differentiation*) na superfície celular como CD105, CD73 e CD90 e a ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, e CD79a ou CD19; e de moléculas de superfície HLA-DR, além da capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica *in vitro*. Em 2007, Sacchetti e colaboradores demonstraram que células reticulares da medula óssea expressando CD146 eram capazes de dar suporte à formação do sistema hematopoético e de gerar ossículos ectópicos em camundongos imunodeficientes (SACCHETTI et al., 2007). Em nosso estudo, observamos que células isoladas dos três grupos experimentais apresentaram padrão similar de expressão de CD73, CD90, CD146, CD34 e CD45. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos com BMSC isoladas de vértebras (AHRENS et al., 2004; RISBUD et al., 2006; BRODANO et al., 2013).

Em relação ao potencial de diferenciação das BMSC, verificamos que todas as células testadas apresentaram capacidade de diferenciação *in vitro* para as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Apesar do ensaio *in vitro* ser considerado um dos pré-requisitos para caracterizar funcionalmente as BMSC, a reprodutibilidade e precisão desses achados devem ser confirmados por outros métodos (BONEWALD et al., 2003). Para isso, realizamos ensaios de diferenciação osteogênica *in vivo* através do transplante de BMSC com partículas de hidroxiapatita em animais imunodeficientes. A formação heterotópica de tecido ósseo ocorreu no grupo controle e EIA. Contudo, BMSC de dos dois pacientes EC não formaram osso *in vivo*. Esse achado pode ser explicado por limitações no número de ensaios realizados, pela variabilidade na capacidade osteogênica de BMSC de diferentes doadores (PHINNEY et al., 1999) ou, ainda, representar deficiência no potencial osteogênico dessas células.

A diferenciação das BMSC em osteoblastos é um processo que pode ser dividido em quatro etapas consecutivas: comprometimento das BMSC com a linhagem osteogênica, proliferação celular, produção e mineralização da matriz óssea (TAIPALEENMÄKI et al., 2012). Esse processo é altamente regulado, e cada estágio da diferenciação é caracterizado pela expressão de fatores de transcrição específicos. BMSC comprometidas com a linhagem osteogênica dão origem às células osteoprogenitoras, que se diferenciam em pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócitos e em células de revestimento (OREFFO et al., 2005). A expressão do fator de transcrição RUNX-2, essencial para os processos iniciais de diferenciação osteogênica, encontra-se reduzida em pacientes com EIA e BMD reduzida (WANG et al., 2014). Além disso, Zhuang e colaboradores em análise de *microarray* de BMSC de pacientes com EIA demonstraram alteração na expressão de genes relacionados às vias de sinalização de MAPK, Notch e de adesão celular, dentre outras (ZHUANG et al., 2016). Esses resultados corroboram outros achados do mesmo autor em 2011 que demonstraram alterações no nível de proteínas

relacionadas com o metabolismo celular, com a sinalização de cálcio e com modulação da ossificação endocondral (LOONES; MORANGE, 1998; ZHUANG et al., 2011). Mais recentemente, em 2017, Wang e colaboradores analisaram amostras ósseas obtidas de crista ilíaca de pacientes com EIA e controles, demonstrando diminuição da expressão de *RUNX-2* e aumento de expressão de *TRAP*, sugerindo como provável mecanismo para a diminuição da massa óssea, a redução da diferenciação osteogênica e o aumento de atividade osteoclástica, respectivamente.

A redução do potencial funcional de BMSC de EC em formar osso *in vivo* pode ser explicada por alterações na regulação de suas vias de diferenciação com implicações diretas sobre a BMD. Em 2009, Zhu e colaboradores foram os primeiros a reportar menor BMD em pacientes com EC em comparação com indivíduos saudáveis. Além da redução de BMD, a microarquitetura óssea desses pacientes mostrou-se alterada em relação a controle saudáveis e a pacientes de EIA, traduzida por redução da espessura e número de trabéculas do osso esponjoso (ZHU et al., 2009).

Embora os mecanismos moleculares que contribuem para a osteopenia e para as alterações da qualidade óssea na EIA e EC ainda sejam desconhecidos, a relação biológica entre EC e EIA tem sido recentemente considerada. Em estudo publicado em 2002, foi reportado que de 237 crianças com EC, em 17% das famílias havia casos de escoliose idiopática (PURKISS et al., 2002). Mais recentemente, foi demonstrado que mutações em *ptk7*, um regulador da via de sinalização de Wnt, podem contribuir para a patogenia de EIA e EC (HAYES et al., 2014). Sendo a osteopenia apontada como um traço em comum a ambas, nosso estudo sinaliza para a possibilidade de que BMSC/SSC possam estar envolvidas em ambas as condições. Apesar das limitações, podemos propor que a osteopenia associada a EIA resultaria de menor frequência e capacidade proliferativa das BMSC, apesar da manutenção de sua capacidade funcional. Por

outro lado, na EC, o mecanismo proposto seria menor potencial funcional, em termos de diferenciação osteogênica, sem alterações na frequência e capacidade proliferativa das BMSC.

## 7. CONCLUSÕES

O potencial osteogênico de células estromais isoladas da medula óssea de pacientes de EIA é comparável ao de pacientes sem escoliose. Contudo, essas células encontram-se em número reduzido na medula óssea vertebral e apresentam potencial proliferativo reduzido *in vitro*. Em contrapartida, as células estromais isoladas da medula óssea de pacientes de EC são encontradas em frequência similar ao de pacientes sem escoliose, mas não preservam o mesmo grau de funcionalidade em ensaios de diferenciação osteogênica *in vivo*. Tais observações são compatíveis com a hipótese de que deficiências quantitativas e qualitativas de BMSC possam estar implicadas, respectivamente, na patogenia da EIA e da EC.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRENS, N.; TORMIN, A.; PAULUS, M.; ROOSTERMAN, D.; SALAMA, A.; KRENN, V.; NEUMANN, U.; SCHEDING, S. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. **Transplantation**, v. 78, n. 6, p. 925–9, 2004.

ALEXANDER, P. G.; CHAU, L.; TUAN, R. S. Role of nitric oxide in chick embryonic organogenesis e dysmorphogenesis. **Birth Defects Research Part A: Clinical e Molecular Teratology**, v. 79, n. 8, p. 581–594, ago. 2007.

ALLAM, A. M.; SCHWABE, A. L. Neuromuscular scoliosis. **PM e R**, v. 5, n. 11, p. 957–963, 2013.

ASCANI, E.; BARTOLOZZI, P.; LOGROSCINO, C. A.; MARCHETTI, P. G.; PONTE, A.; SAVINI, R.; TRAVAGLINI, F.; BINAZZI, R.; DI SILVESTRE, M. Natural history of untreated idiopathic scoliosis after skeletal maturity. **Spine**, v. 11, n. 8, p. 784–9, out. 1986.

ASHER, M. a; BURTON, D. C. Adolescent idiopathic scoliosis: natural history e long term treatment effects. **Scoliosis**, v. 1, n. 1, p. 2, 2006.

BACHRACH, L. K.; HASTIE, T.; WANG, M.-C.; NARASIMHAN, B.; MARCUS, R. Bone Mineral Acquisition in Healthy Asian, Hispanic, Black, e Caucasian Youth: A Longitudinal Study<sup>1</sup>. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 12, p. 4702–4712, dez. 1999.

BAJARD, L.; OATES, A. C. Breathe in e Straighten Your Back: Hypoxia, Notch, e Scoliosis. **CELL**, v. 149, p. 255–256, 2012.

BANFI, A.; BIANCHI, G.; NOTARO, R.; LUZZATTO, L.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Replicative Aging e Gene Expression in Long-Term Cultures of Human Bone Marrow Stromal Cells. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 6, p. 901–910, dez. 2002.

BANTZ, M. E. W. Valproic Acid e Congenital Malformations: A Case Report. **Clinical Pediatrics**, v. 23, n. 6, p. 352–353, 1 jun. 1984.

BARRACK, R. L.; WHITECLOUD, T. S.; BURKE, S. W.; COOK, S. D.; HARDING, A. F. Proprioception in idiopathic scoliosis. **Spine**, v. 9, n. 7, p. 681–5, out. 1984.

BASS, S.; DELMAS, P. D.; PEARCE, G.; HENDRICH, E.; TABENSKY, A.; SEEMAN, E. The differing tempo of growth in bone size, mass, e density in girls is region-specific. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 6, p. 795–804, 15 set. 1999.

BIANCO P. E ROBEY P.G. Skeletal stem cells. In: LANZA P.P. (Ed.). **Handbook of Adult e Fetal Stem Cells**. 1st. ed. San Diego: Academic Press, 2004. p. 415–424.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SAGGIO, I.; RIMINUCCI, M. Mesenchymal stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, e significance in incurable skeletal disease. **Human gene therapy**, v. 21, n. 9, p. 1057–66, set. 2010.

BONEWALD, L. F.; HARRIS, S. E.; ROSSER, J.; DALLAS, M. R.; DALLAS, S. L.; CAMACHO, N. P.; BOYAN, B.; BOSKEY, A. Von Kossa Staining Alone Is Not Sufficient to Confirm that Mineralization In Vitro Represents Bone Formation. **Calcified Tissue International**, v. 72, n. 5, p. 537–547, 1 maio 2003.

BRADNEY, M.; KARLSSON, M. K.; DUAN, Y.; STUCKEY, S.; BASS, S.; SEEMAN, E. Heterogeneity in the growth of the axial e appendicular skeleton in boys: implications for the pathogenesis of bone fragility in men. **Journal of bone e mineral research : the official journal of the American Society for Bone e Mineral Research**, v. 15, n. 10, p. 1871–8, 1 out. 2000.

BRIDWELL, K. H. Surgical treatment of idiopathic adolescent scoliosis. **Spine**, v. 24, n. 24, p. 2607–2616, 1999.

BRODANO, G. B.; TERZI, S.; TROMBI, L.; GRIFFONI, C.; VALTIERI, M.; BORIANI, S.; MAGLI, M. C. Mesenchymal stem cells derived from vertebrae (vMSCs) show best biological properties. **European Spine Journal**, v. 22, n. SUPPL.6, p. 979–984, 2013.

BUNNELL, W. P. The natural history of idiopathic scoliosis before skeletal maturity. **Spine**, v. 11, n. 8, p. 773–6, out. 1986.

BURNER, W. L.; BADGER, V. M.; SHERMAN, F. C. Osteoporosis e acquired back deformities. **Journal of pediatric orthopedics**, v. 2, n. 4, p. 383–5, 1982.

BUSSCHER, I.; WAPSTRA, F. H.; VELDHUIZEN, A. G. Predicting growth e curve progression in the individual patient with adolescent idiopathic scoliosis: design of a prospective longitudinal cohort study. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 11, p. 93, 2010.

BYERS, R. J.; DENTON, J.; HOYLAND, J. A.; FREEMONT, A. J. Differential patterns of osteoblast dysfunction in trabecular bone in patients with established osteoporosis. **6J Clin Pathol**, v. 50, p. 760–764, 1997.

CHENG, J. C.; GUO, X. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A primary problem or secondary to the spinal deformity? **Spine**, v. 22, n. 15, p. 1716–21, 1997.

CHENG, J. C. Y.; HUNG, V. W. Y.; LEE, W. T. K.; YEUNG, H. Y.; LAM, T. P.; NG, B. K. W.; GUO, X.; QIN, L. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis--longitudinal monitoring of bone mineral density until skeletal maturity. **Studies in health technology e informatics**, v. 123, p. 47–51, 2006.

CHENG, J. C. Y.; QIN, L.; CHEUNG, C. S. K.; SHER, A. H. L.; LEE, K. M.; NG, S. W. E.; GUO, X. Generalized Low Areal e Volumetric Bone Mineral Density in Adolescent Idiopathic Scoliosis. **Journal of Bone e Mineral Research**, v. 15, n. 8, p. 1587–1595, 1 ago. 2000.

CHENG, J. C. Y.; TANG, S. P.; GUO, X.; CHAN, C. W.; QIN, L. Osteopenia in Adolescent Idiopathic Scoliosis. **Spine**, v. 26, n. February, p. C1–C5, 2001.

CHEUNG, C. S. K.; LEE, W. T. K.; TSE, Y. K.; LEE, K. M.; GUO, X.; QIN, L.; CHENG, J. C. Y. Generalized Osteopenia in Adolescent Idiopathic Scoliosis--Association With Abnormal Pubertal Growth, Bone Turnover, e Calcium Intake? **Spine**, v. 31, n. 3, p. 330–338, 1 fev. 2006.

- CHIRU, M. Adolescent Idiopathic Scoliosis e Osteopenia. **A Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 1, p. 17–22, 2011.
- CHOUDHRY, M. N.; AHMAD, Z.; VERMA, R. The Open Orthopaedics Journal Adolescent Idiopathic Scoliosis. **The Open Orthopaedics Journal**, v. 10, n. 16, p. 143–154, 2016.
- CLARK, E. M.; TAYLOR, H. J.; HARDING, I.; HUTCHINSON, J.; NELSON, I.; DEANFIELD, J. E.; NESS, A. R.; TOBIAS, J. H. Association between components of body composition e scoliosis: a prospective cohort study reporting differences identifiable before the onset of scoliosis. **Journal of bone e mineral research : the official journal of the American Society for Bone e Mineral Research**, v. 29, n. 8, p. 1729–36, ago. 2014.
- COBB, J. R. Outline for the study of scoliosis. **Outline for the study of scoliosis**, p. 261–275, 1948.
- COILLARD, C.; CIRCO, A.; RIVARD, C. Correlation between maturation, growth spurt, e the progression of adolescent idiopathic scoliosis. **Scoliosis**, v. 8, p. O12, 2013.
- COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M.; PROCKOP, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 7, p. 3213–3218, 2000.
- COPLEY, L. A.; DORMANS, J. P. Cervical spine disorders in infants e children. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 6, n. 4, p. 204–14, 1998.
- DANIELSSON, A. J. Natural history of adolescent idiopathic scoliosis: a tool for guidance in decision of surgery of curves above 50°. **Journal of children's orthopaedics**, v. 7, n. 1, p. 37–41, fev. 2013.
- DANIELSSON, A. J.; HASSERIUS, R.; OHLIN, A.; NACHEMSON, A. L. A Prospective Study of Brace Treatment Versus Observation Alone in Adolescent Idiopathic Scoliosis. **Spine**, v. 32, n. 20, p. 2198–2207, 2007.
- DEBNATH, U. K.; GOEL, V.; HARSHAVARDHANA, N.; WEBB, J. K. Congenital scoliosis - Quo vadis? **Indian journal of orthopaedics**, v. 44, n. 2, p. 137–47, abr. 2010.
- DEDE, O.; AKEL, I.; DEMIRKIRAN, G.; YALCIN, N.; MARCUCIO, R.; ACAROGLU, E. Is decreased bone mineral density associated with development of scoliosis? A bipedal osteopenic rat model. **Scoliosis**, v. 6, n. 1, p. 24, jan. 2011.
- DOBBS, M. B. Effects of Bracing in Adolescents with Idiopathic Scoliosis. p. 1512–1521, 2013.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

FEKETE, T. F.; HASCHTMANN, D.; HEYDE, C. E.; KLEINSTÜCK, F.; JESZENSZKY, D. Kongenitale Fehlbildungen der Wirbelsäule im Wachstum: Wann konservativ behandeln, wann operativ? **Orthopade**, v. 45, n. 6, p. 518–526, 2016.

FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro e retransplantation in vivo. **Haematology e blood transfusion**, v. 25, p. 19–29, 1980.

FROST, H. M. Why should many skeletal scientists e clinicians learn the Utah paradigm of skeletal physiology? **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 2, n. 2, p. 121–130, 2001.

FU, K.-M. G.; SMITH, J. S.; SHAFFREY, C. I. Anatomy e Physiology of Congenital Spinal Lesions. In: BENZEL, E. C. (Ed.). **Spine Surgery, Techniques, Complication Avoidance e Management**. 3rd. ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. p. 71–82.

GALOTTO, M.; BERISSO, G.; DELFINO, L.; PODESTA, M.; OTTAGGIO, L.; DALLORSO, S.; DUFOUR, C.; FERRARA, G. B.; ABBONDANDOLO, A.; DINI, G.; BACIGALUPO, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. **Experimental hematology**, v. 27, n. 9, p. 1460–6, set. 1999.

GOLDBERG, C. J.; MOORE, D. P.; FOGARTY, E. E.; DOWLING, F. E. Adolescent idiopathic scoliosis: natural history e prognosis. **Stud Health Technol Inform**, v. 91, p. 59–63, 2002.

HAIL, N.; CHEN, P.; KEPA, J. J.; BUSHMAN, L. R. Evidence supporting a role for dihydroorotate dehydrogenase, bioenergetics, e p53 in selective teriflunomide-induced apoptosis in transformed versus normal human keratinocytes. **Apoptosis**, v. 17, n. 3, p. 258–268, 20 mar. 2012.

HAWES, M. C.; O'BRIEN, J. P. Scoliosis The transformation of spinal curvature into spinal deformity: pathological processes e implications for treatment. **Scoliosis**, v. 1, n. 3, 2006.

HAYES, M.; GAO, X.; YU, L. X.; PARIA, N.; HENKELMAN, R. M.; WISE, C. A.; CIRUNA, B. ptk7 mutant zebrafish models of congenital e idiopathic scoliosis implicate dysregulated Wnt signalling in disease. **Nature Communications**, v. 5, p. 4777, 2014.

HELL, A. K.; CAMPBELL, R. M.; HEFTI, F. Neues Therapiekonzept für Kinder mit Thoraxinsuffizienz-Syndrom aufgrund von Wirbelsäulenfehlbildungen. **Klinische Padiatrie**, v. 217, n. 5, p. 268–273, set. 2005.

HENRY, Y. M.; FATAYERJI, D.; EASTELL, R. Attainment of peak bone mass at the lumbar spine, femoral neck e radius in men e women: relative contributions of bone size e volumetric bone mineral density. **Osteoporosis International**, v. 15, n. 4, p. 263–273, 1 abr. 2004.

HENSINGER, R. N. Etiology e Associations. **Spine**, v. 34, n. 17, p. 1745–1750, 2009.

INGALLS, T. H.; CURLEY, F. J. The New England Journal of Medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 257, n. 23, p. 1121–1127, 1957.

ISHIDA, K.; AOTA, Y.; MITSUGI, N.; KONO, M.; HIGASHI, T.; KAWAI, T.; YAMADA, K.; NIIMURA, T.; KANEKO, K.; TANABE, H.; ITO, Y.; KATSUHATA, T.; SAITO, T. Relationship between bone density e bone metabolism in adolescent idiopathic scoliosis. **Scoliosis e Spinal Disorders**, n. 2015, p. 1–5, 2016.

ITAHANA, K.; CAMPISI, J.; DIMRI, G. P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 371, p. 21–31, 2007.

JAMES, J. IDIOPATHIC SCOLIOSIS. **The Journal of Bone e Joint Surgery**, v. 36 B No. 1, p. 35–49, 1954.

KAROL, L. A.; VIROSTEK, D.; FELTON, K.; JO, C.; BUTLER, L. The Effect of the Risser Stage on Bracing Outcome in Adolescent Idiopathic Scoliosis. **The Journal of Bone e Joint Surgery**, v. 98, n. 15, p. 1253–1259, 3 ago. 2016.

KASPIRIS, A.; GRIVAS, T. B.; WEISS, H.-R.; TURNBULL, D. Surgical e conservative treatment of patients with congenital scoliosis: a search for long-term results. **Scoliosis**, v. 6, n. 12, 2011.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast e osteoclast differentiation. **Oral diseases**, v. 8, n. 3, p. 147–59, maio 2002.

KIM, M. J.; SHIN, K. S.; JEON, J. H.; LEE, D. R.; SHIM, S. H.; KIM, J. K.; CHA, D.-H.; YOON, T. K.; KIM, G. J. Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells e Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells. **Cell e Tissue Research**, v. 346, n. 1, p. 53–64, 11 out. 2011.

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. 2013.

KONO, H.; MACHIDA, M.; SAITO, M.; NISHIWAKI, Y.; KATO, H.; HOSOGANE, N.; CHIBA, K.; MIYAMOTO, T.; MATSUMOTO, M.; TOYAMA, Y. Mechanism of osteoporosis in adolescent idiopathic scoliosis: Experimental scoliosis in pinealectomized chickens. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 4, p. 387–393, 2011.

KOTWICKI, T.; CHOWANSKA, J.; KINEL, E.; CZAPROWSKI, D.; TOMASZEWSKI, M.; JANUSZ, P. Optimal management of idiopathic scoliosis in adolescence Detection e screening of idiopathic scoliosis. **Adolescent Health, Medicine e Therapeutics Adolescent Health Medicine e Therapeutics**, v. 4, p. 59–73, 2013.

KULAR, J.; TICKNER, J.; CHIM, S. M.; XU, J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 863–873, 2012.

KUZNETSOV, S. A.; MANKANI, M. H.; BIANCO, P.; ROBEY, P. G. Enumeration of the colony-forming units-fibroblast from mouse e human bone marrow in normal e pathological conditions. **Stem cell research**, v. 2, n. 1, p. 83–94, jan. 2009.

LAM, T. P.; SURG, F. O.; WING, V.; HUNG, Y.; YEUNG, H. Y.; TSE, Y. K.; QIN, L.; CHUN, J.; CHENG, Y. Abnormal Bone Quality in Adolescent. **Spine**, v. 36, n. 15, p. 1211–1217, 2011.

LEVY, B. J.; SCHULZ, J. F.; FORNARI, E. D.; WOLLOWICK, A. L. Complications associated with surgical repair of syndromic scoliosis. **Scoliosis**, v. 10, n. 1, p. 14, 2015.

LI, X.-F.; LI, H.; LIU, Z.-D.; DAI, L.-Y. Low bone mineral status in adolescent idiopathic scoliosis. **European Spine Journal**, v. 17, n. 11, p. 1431–1440, 2008.

LODER, R. T.; HERNANDEZ, M. J.; LERNER, A. L.; WINEBRENER, D. J.; GOLDSTEIN, S. A.; HENSINGER, R. N.; LIU, C. Y.; SCHORK, M. A. The induction of congenital spinal deformities in mice by maternal carbon monoxide exposure. **Journal of pediatric orthopedics**, v. 20, n. 5, p. 662–6, jan. 2000.

LOMBARDI, G.; AKOUME, M.-Y.; COLOMBINI, A.; MOREAU, A.; BANFI, G. Biochemistry of adolescent idiopathic scoliosis. **Advances in clinical chemistry**, v. 54, p. 165–82, jan. 2011.

LONSTEIN, J. E.; CARLSON, J. M. The prediction of curve progression in untreated idiopathic scoliosis during growth. **The Journal of bone e joint surgery. American volume**, v. 66, n. 7, p. 1061–71, set. 1984.

LOONES, M. T.; MORANGE, M. Hsp e chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo. **Cell stress & chaperones**, v. 3, n. 4, p. 237–44, dez. 1998.

LUU, H. H.; WAGNER, E. R.; LUTHER, G.; ZHU, G.; LUO, Q.; SHI, Q.; KIM, S. H.; GAO, J. L.; HUANG, E.; GAO, Y.; YANG, K.; WANG, L.; TEVEN, C.; LUO, X.; LIU, X.; LI, M.; HU, N.; SU, Y.; BI, Y.; HE, B. C.; TANG, N.; LUO, J.; CHEN, L.; ZUO, G.; RAMES, R.; HAYDON, R. C.; HE, T. C. Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. **Sarcoma**, v. 2011, n. February, 2011.

MALLO, M.; WELLIK, D. M.; DESCHAMPS, J. **Hox genes e regional patterning of the vertebrate body plan** **Developmental Biology**, 2010.

MARTÍN, F.; SÁNCHEZ-GILABERT, A.; TRISTÁN-MANZANO, M.; BENABDELLAH, K. Stem Cells for Modeling Human Disease. In: Tomizawa M. **Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic**. 1st. ed. InTech, 2016. p. 257-272.

MASSA, V.; CABRERA, R. M.; MENEGOLA, E.; GIAVINI, E.; FINNELL, R. H. Valproic acid-induced skeletal malformations: associated gene expression cascades. **Pharmacogenetics e genomics**, v. 15, n. 11, p. 787–800, nov. 2005.

MCMASTER, M. J.; OHTSUKA, K. The natural history of congenital scoliosis. A study of two hundred e fifty-one patients. **The Journal of bone e joint surgery. American volume**, v. 64, n. 8, p. 1128–47, out. 1982.

MCMASTER, M. J.; SINGH, H. Natural history of congenital kyphosis e kyphoscoliosis. A study of one hundred e twelve patients. **The Journal of bone e joint surgery. American volume**, v. 81, n. 10, p. 1367–83, out. 1999.

MENEGOLA, E.; BROCCIA, M. L.; PRATI, M.; GIAVINI, E. Morphological alterations induced by sodium valproate on somites e spinal nerves in rat embryos. **Teratology**, v. 59, n. 2, p. 110–9, fev. 1999.

MOREAU, A.; WANG, D. S.; FORGET, S.; AZEDDINE, B.; ANGELONI, D.; FRASCHINI, F.; LABELLE, H.; POITRAS, B.; RIVARD, C.-H.; GRIMARD, G. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. **Spine**, v. 29, n. 16, p. 1772–81, 15 ago. 2004.

NEGRINI, S.; MINOZZI, S.; BETTANY-SALTIKOV, J.; CHOCKALINGAM, N.; GRIVAS, T. B.; KOTWICKI, T.; MARUYAMA, T.; ROMANO, M.; ZAINA, F. Braces for idiopathic scoliosis in adolescents. In: NEGRINI, S. (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

OREFFO, R. O. C.; COOPER, C.; MASON, C.; CLEMENTS, M. Mesenchymal Stem Cells: Lineage, Plasticity, e Skeletal Therapeutic Potential. **Stem Cell Reviews**, v. 1, n. 2, p. 169–178, 2005.

PAPACHRONI, K. K.; KARATZAS, D. N.; PAPAVALASSILOU, K. A.; BASDRA, E. K.; PAPAVALASSILOU, A. G. Mechanotransduction in osteoblast regulation e bone disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 5, p. 208–216, 2009.

PARFITT, A. M.; VILLANUEVA, A. R.; FOLDES, J.; RAO, D. S. Relations between histologic indices of bone formation: Implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. **Journal of Bone e Mineral Research**, v. 10, n. 3, p. 466–473, 2009.

PEHRSSON, K.; BAKE, B.; LARSSON, S.; NACHEMSON, A. Lung function in adult idiopathic scoliosis: a 20 year follow up. **Thorax**, v. 46, p. 474–478, 1991.

PHAN, T. C. A.; XU, J.; ZHENG, M. H. Interaction between osteoblast e osteoclast : impact in bone disease. **Histology e Histopathology**, v.19 p. 1325–1344, 2004.

PHINNEY, D. G.; KOPEN, G.; RIGHTER, W.; WEBSTER, S.; TREMAIN, N.; PROCKOP, D. J. Donor variation in the growth properties e osteogenic potential of human marrow stromal cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 424–36, 1999.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5411, p. 143–7, 1999.

PORTER, R. W. The pathogenesis of idiopathic scoliosis: uncoupled neuro-osseous growth? **European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, e the European Section of the Cervical Spine Research Society**, v. 10, n. 6, p. 473–81, dez. 2001.

PURKISS, S. B.; DRISCOLL, B.; COLE, W. G.; ALMAN, B. Idiopathic Scoliosis in Families of Children With Congenital Scoliosis. **Clinical Orthopaedics e Related Research**, n. 401, p. 27–31, 2002.

RISBUD, M. V.; SHAPIRO, I. M.; GUTTAPALLI, A.; DI MARTINO, A.; DANIELSON, K. G.; BEINER, J. M.; HILLIBRAND, A.; ALBERT, T. J.; ANDERSON, D. G.; VACCARO, A. R. Osteogenic potential of adult human stem cells of the lumbar vertebral body e the iliac crest. **Spine**, v. 31, n. 1, p. 83–89, 2006.

RODRÍGUEZ, J. P.; GARAT, S.; GAJARDO, H.; PINO, A. M.; SEITZ, G. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. **Journal of cellular biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 414–23, 1999.

ROUSSOULY, P.; NNADI, C. Sagittal plane deformity: an overview of interpretation e management. **Eur Spine J**, v. 19, p. 1824–1836, 2010

RUTKOVSKIY, A.; STENSLØKKEN, K.-O.; VAAGE, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 22, p. 95–106, 2016.

SACCHETTI, B.; FUNARI, A.; MICHIEZI, S.; DI CESARE, S.; PIERSANTI, S.; SAGGIO, I.; TAGLIAFICO, E.; FERRARI, S.; ROBESY, P. G.; RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 324–36, 19 out. 2007.

SANDERS, J. O.; KHOURY, J. G.; KISHAN, S.; BROWNE, R. H.; MOONEY, J. F.; ARNOLD, K. D.; MCCONNELL, S. J.; BAUMAN, J. A.; FINEGOLD, D. N. Predicting Scoliosis Progression from Skeletal Maturity: A Simplified Classification During Adolescence. **The Journal of Bone e Joint Surgery-American Volume**, v. 90, n. 3, p. 540–553, mar. 2008.

SANDERS, J. O.; NEWTON, P. O.; BROWNE, R. H.; KATZ, D. E.; BIRCH, J. G.; HERRING, J. A. Bracing for Idiopathic Scoliosis: How Many Patients Require Treatment to Prevent One Surgery? **The Journal of Bone e Joint Surgery-American Volume**, v. 96, n. 8, p. 649–653, 16 abr. 2014.

SEKIYA, I.; LARSON, B. L.; SMITH, J. R.; POCHAMPALLY, R.; CUI, J.; PROCKOP, D. J. Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors e Evaluate Their Quality. **Stem Cells**, v. 20, n. 6, p. 530–541, nov. 2002.

SHAWI, M.; AUTEXIER, C. Telomerase, senescence e ageing. **Mechanisms of Ageing e Development**, v. 129, n. 1-2, p. 3–10, jan. 2008.

SOMMERFELDT, D.; RUBIN, C. Biology of bone e how it orchestrates the form e function of the skeleton. **European Spine Journal**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. S86–S95, 1 out. 2001.

SPARROW, D. B.; CHAPMAN, G.; SMITH, A. J.; MATTAR, M. Z.; MAJOR, J. A.; O'REILLY, V. C.; SAGA, Y.; ZACKAI, E. H.; DORMANS, J. P.; ALMAN, B. A.; MCGREGOR, L.; KAGEYAMA, R.; KUSUMI, K.; DUNWOODIE, S. L. A mechanism for gene-environment interaction in the etiology of congenital scoliosis. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 295–306, 2012.

SPENCER, N. D.; GIMBLE, J. M.; LOPEZ, M. J. Mesenchymal stromal cells: past, present, e future. **Veterinary surgery : VS**, v. 40, n. 2, p. 129–39, fev. 2011.

STEIN, G. H.; DRULLINGER, L. F.; SOULARD, A.; DULIĆ, V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 e p16 in the mechanisms of senescence e differentiation in human fibroblasts. **Molecular e cellular biology**, v. 19, n. 3, p. 2109–17, mar. 1999.

TAHVILDARI, B. P.; ERFANI, M. Evaluation of Bone Mineral Status in Adolescent Idiopathic Scoliosis. **Clinics in Orthopedic Surgery** p. 180–184, 2014.

TAIPALEENMÄKI, H.; HOKLAND, L. B.; CHEN, L.; KAUPPINEN, S.; KASSEM, M. **Micro-RNAs: Targets for enhancing osteoblast differentiation e bone formation** **European Journal of Endocrinology**, 2012.

THOMPSON, G. H.; AKBARNIA, B. A.; CAMPBELL, R. M. Growing rod techniques in early-onset scoliosis. **Journal of pediatric orthopedics**, v. 27, n. 3, p. 354–61, abr. 2007.

TIKOO, A.; KOTHARI, M. K.; SHAH, K.; NENE, A. The Open Orthopaedics Journal Current Concepts -Congenital Scoliosis. **The Open Orthopaedics Journal**, v. 11, n. 217, p. 337–345, 2017.

TITORENCU, I.; PRUNA, V.; JINGA, V. V.; SIMIONESCU, M. Osteoblast ontogeny e implications for bone pathology: An overview. **Cell e Tissue Research**, v. 355, n. 1, p. 23–33, 2014.

TREDWELL, S. J.; SMITH, D. F.; MACLEOD, P. J.; WOOD, B. J. Cervical spine anomalies in fetal alcohol syndrome. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 7, n. 4, p. 331–334, 1982.

TROBISCH, P.; SUESS, O.; SCHWAB, F. Idiopathic scoliosis. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 107, n. 49, p. 875–83; quiz 884, 2010.

VELDHUIZEN, A. G.; WEVER, D. J.; WEBB, P. J. The aetiology of idiopathic scoliosis: biomechanical e neuromuscular factors. **European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, e the European Section of the Cervical Spine Research Society**, v. 9, n. 3, p. 178–84, jun. 2000.

WANG, C.; WANG, X.; WANG, Y. Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts e Adipocytes e its Role in Treatment of Osteoporosis. **Med Sci Monit** p. 226–233, 2016.

WANG, W.; SUN, C.; LIU, Z.; SUN, X.; ZHU, F.; ZHU, Z.; QIU, Y. 20. Transcription factor Runx2 in the low bone mineral density of girls with adolescent idiopathic scoliosis. **Orthopaedic surgery**, v. 6, n. October 2013, p. 8–14, 2014.

WANG, W.; ZHU, Z.; ZHU, F.; SUN, C.; WANG, Z.; SUN, X.; QIU, Y. Different curve pattern e other radiographical characteristics in male e female patients with adolescent idiopathic scoliosis. **Spine**, v. 37, n. 18, p. 1586–92, 15 ago. 2012.

WANG, Z.; CHEN, H.; YU, Y. E.; ZHANG, J.; CHEUK, K. Y.; NG, B. K. W.; QIU, Y.; GUO, X. E.; CHENG, J. C. Y.; LEE, W. Y. W. Unique local bone tissue characteristics in iliac crest bone biopsy from adolescent idiopathic scoliosis with severe spinal deformity. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

WEINSTEIN, S. L. Natural History. **Spine**, v. 24, n. 24, p. 2592, 1999.

WEINSTEIN, S. L.; DOLAN, L. A.; SPRATT, K. F.; PETERSON, K. K.; SPOONAMORE, M. J.; PONSETI, I. V. Health e function of patients with untreated idiopathic scoliosis: a 50-year natural history study. **JAMA**, v. 289, n. 5, p. 559–67, 5 fev. 2003.

WEINSTEIN, S. L.; PONSETI, I. V. Curve progression in idiopathic scoliosis. **The Journal of bone e joint surgery. American volume**, v. 65, n. 4, p. 447–55, abr. 1983.

WÉRY, N.; NAROTSKY, M. G.; PACICO, N.; KAVLOCK, R. J.; PICARD, J. J.; GOFFLOT, F. Defects in cervical vertebrae in boric acid-exposed rat embryos are associated with anterior shifts of hox gene expression domains. **Birth defects research. Part A, Clinical e molecular teratology**, v. 67, n. 1, p. 59–67, jan. 2003.

WINTER, R. B.; LONSTEIN, J. E.; BRADFORD, D. S.; OGILVIE, J. W. **Moe's Textbook of Scoliosis e Other Spinal Deformities**. 3rd. ed. [s.l.] Saunders, 1995.

WOLF, N. S.; PENDERGRASS, W. R. The relationships of animal age e caloric intake to cellular replication in vivo e in vitro: a review. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences e medical sciences**, v. 54, n. 11, p. B502–17, nov. 1999.

XIAO, W.; WANG, Y.; PACIOS, S.; LI, S.; GRAVES, D. T. Cellular e Molecular Aspects of Bone Remodeling. **Front Oral Biol**. v. 18, p. 9–16, 2016.

YIP, B. H. K.; YU, F. W. P.; WANG, Z.; HUNG, V. W. Y.; LAM, T. P.; NG, B. K. W.; ZHU, F.; CHENG, J. C. Y. Prognostic Value of Bone Mineral Density on Curve Progression: A Longitudinal Cohort Study of 513 Girls with Adolescent Idiopathic Scoliosis. **Scientific Reports**, 2016.

ZHU, F.; QIU, Y.; YEUNG, H. Y.; LEE, K. M.; CHENG, C. J. Trabecular bone micro-architecture e bone mineral density in adolescent idiopathic e congenital scoliosis. **Orthopaedic surgery**, v. 1, n. 1, p. 78–83, fev. 2009.

ZHUANG, Q.; LI, J.; WU, Z.; ZHANG, J.; SUN, W.; LI, T.; YAN, Y.; JIANG, Y.; ZHAO, R. C.; QIU, G. Differential proteome analysis of bone marrow mesenchymal stem cells from adolescent idiopathic scoliosis patients. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18834, 2011.

ZHUANG, Q.; MAO, W.; XU, P.; LI, H.; SUN, Z.; LI, S. Identification of Differential Genes Expression Profiles e Pathways of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of Adolescent Idiopathic Scoliosis Patients by Microarray e Integrated Gene Network Analysis. **Spine**, v. 41, n. 10, p. 840–855, 2016.

## ANEXO A. Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com escoliose



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

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, \_\_\_\_\_ ou o menor sob sua responsabilidade \_\_\_\_\_ está sendo convidado (a) a conceder uma amostra de fragmento de osso ao projeto “Caracterização da formação óssea de pacientes com escoliose idiopática e congênita”. Por favor, assinale com um X se você é um conessor com escoliose:

- conessor com escoliose congênita  
 conessor com escoliose idiopática

Antes de tomar uma decisão é importante que você ou seu responsável legal, entenda as informações sobre este ato voluntário. Use o tempo que achar necessário para ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Caso tenha qualquer dúvida pergunte a quem apresentou este documento a você. Se preferir você também pode pedir ajuda para pessoas de sua confiança.

#### Quais são os objetivos dessa pesquisa?

O projeto “Caracterização da formação óssea de pacientes com escoliose idiopática e congênita” pretende ajudar na realização de pesquisas para que possamos entender melhor como ocorre a formação óssea nessas doenças.

Além de um fragmento de seu osso, precisaremos de algumas informações pessoais como a sua data de nascimento, endereço, telefone e algumas informações sobre doenças que você ou seus familiares tenham ou tiveram no passado. Estas informações serão sigilosas e em nenhum momento sua identidade será revelada. Você tem o direito de não responder às perguntas caso não se sinta à vontade para responder, por qualquer razão, sem necessidade de se justificar.

Suas informações pessoais ficarão guardadas no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, localizado na Avenida Brasil, 500 - Cep: 20940-070 - Rio de Janeiro – RJ Tel.: 55 (21) 2134-5000 (INTO/MS).

Sua participação consistirá em conceder um pequeno fragmento ósseo com cerca de 1 cm de comprimento durante o procedimento cirúrgico. A retirada de fragmentos ósseos faz parte do procedimento cirúrgico convencional para correção da curvatura da coluna e a coleta deste fragmento ósseo não acarretará risco adicional a você.

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

### **Garantia de confidencialidade e privacidade**

Caso o seu material biológico não tenha critérios de qualidade necessários para uso em pesquisa, sua amostra será descartada respeitando-se as normas sanitárias e o anonimato da sua participação. Seus dados pessoais serão codificados e mantidos em sigilo. Sua identidade também será preservada, ou seja, seu nome e informações pessoais jamais serão revelados em quaisquer formas de divulgação das pesquisas e seus resultados. É garantido o sigilo de todos os participantes.

### **Esclarecimentos e desistências**

Sempre que achar necessário, para esclarecimento de qualquer dúvida, você poderá contatar o (a), Dra. Rafaela Sartore (fone: 21 2134 5499); como também a Dra. Maria Eugênia Duarte (fone: 21 2134 5498).

Em caso de dúvida ou preocupação quanto aos seus direitos como participante do projeto, você poderá entrar em contato direto com o Comitê de Ética em Pesquisa local, por meio do telefone 21 2134 5454, endereço eletrônico cep.into@into.saude.gov.br ou no endereço Avenida Brasil, 500, 9º andar, COENP - Cep: 20940-070 - Rio de Janeiro – RJ.

### **Termo de Assinaturas**

Somente assine este documento, se consentir integralmente com os termos deste. Por favor, rubricue cada uma das folhas deste documento.

Declaro estar ciente das informações recebidas e prestadas, tendo lido (ou o documento foi lido para mim), compreendido e assinalado as opções que correspondem à minha vontade. Recebi neste ato uma das **duas vias** deste documento, datada e assinada por mim e pelo responsável do projeto e a outra via permanecerá arquivada na Divisão de Pesquisa do INTO.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome completo e assinatura do participante (se aplicável)

\_\_\_\_\_  
Nome completo e assinatura do representante legal (se aplicável)

\_\_\_\_\_  
Nome completo e assinatura do pesquisador responsável

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

## ANEXO B. Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes de trauma



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

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, \_\_\_\_\_ ou o menor sob sua responsabilidade \_\_\_\_\_ está sendo convidado (a) a conceder uma amostra de fragmento ósseo ao projeto “Caracterização da formação óssea de pacientes com escoliose idiopática e congênita”.

Antes de tomar uma decisão é importante que você ou seu responsável legal, entenda as informações sobre este ato voluntário. Use o tempo que achar necessário para ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Caso tenha qualquer dúvida pergunte a quem apresentou este documento a você. Se preferir você também pode pedir ajuda para pessoas de sua confiança.

#### **Quais são os objetivos dessa pesquisa?**

O projeto “Caracterização da formação óssea de pacientes com escoliose idiopática e congênita” pretende ajudar na realização de pesquisas para que possamos entender melhor como ocorre a formação óssea nessas doenças em comparação à formação em pacientes sem escoliose.

Você está sendo convidado a participar do estudo pois apresenta idade compatível com os pacientes portadores de escoliose e será submetido a um procedimento cirúrgico no qual existe a possibilidade de coleta de fragmentos ósseos.

Além de um fragmento de seu osso, precisaremos de algumas informações pessoais como a sua data de nascimento, endereço, telefone e algumas informações sobre doenças que você ou seus familiares tenham ou tiveram no passado. Estas informações serão sigilosas e em nenhum momento sua identidade será revelada. Você tem o direito de não responder às perguntas caso não se sinta à vontade para responder, por qualquer razão, sem necessidade de se justificar.

Sua participação consistirá em conceder um pequeno fragmento ósseo com cerca de 1 cm de comprimento durante o procedimento cirúrgico. A retirada de fragmentos ósseos faz parte do procedimento cirúrgico ao qual você será submetido e a coleta deste fragmento ósseo não acarretará risco adicional a você.

Suas informações pessoais ficarão guardadas no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, localizado na Avenida Brasil, 500 - Cep: 20940-070 - Rio de Janeiro – RJ Tel.: 55 (21) 2134-5000 (INTO/MS).

#### **Garantia de confidencialidade e privacidade**

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:



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

Caso o seu material biológico não tenha critérios de qualidade necessários para uso em pesquisa, sua amostra será descartada respeitando-se as normas sanitárias e o anonimato da sua participação. Seus dados pessoais serão codificados e mantidos em sigilo. Sua identidade também será preservada, ou seja, seu nome e informações pessoais jamais serão revelados em quaisquer formas de divulgação das pesquisas e seus resultados. É garantido o sigilo de todos os participantes.

#### **Esclarecimentos e desistências**

Sempre que achar necessário, para esclarecimento de qualquer dúvida, você poderá contatar o (a), Dra. Rafaela Sartore (fone: 21 2134 5499); como também a Dra. Maria Eugênia Duarte (fone: 21 2134 5498).

Em caso de dúvida ou preocupação quanto aos seus direitos como participante do projeto, você poderá entrar em contato direto com o Comitê de Ética em Pesquisa local, por meio do telefone 21 2134 5454, endereço eletrônico cep.into@into.saude.gov.br ou no endereço Avenida Brasil, 500, 9º andar, COENP - Cep: 20940-070 - Rio de Janeiro – RJ.

#### **Termo de Assinaturas**

Somente assine este documento, se consentir integralmente com os termos deste. Por favor, rubrique cada uma das folhas deste documento.

Declaro estar ciente das informações recebidas e prestadas, tendo lido (ou o documento foi lido para mim), compreendido e assinalado as opções que correspondem à minha vontade. Recebi neste ato uma das **duas vias** deste documento, datada e assinada por mim e pelo responsável do projeto e a outra via permanecerá arquivada na Divisão de Pesquisa do INTO.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome completo e assinatura do participante (se aplicável)

\_\_\_\_\_  
Nome completo e assinatura do representante legal (se aplicável)

\_\_\_\_\_  
Nome completo e assinatura do pesquisador responsável

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

## ANEXO C. Termo de assentimento do menor de 18 anos



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

### Termo de Assentimento do menor

*O termo de assentimento não elimina a necessidade de fazer o termo de consentimento livre e esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor.*

Você está sendo convidado para participar do projeto “Caracterização da formação óssea de pacientes com escoliose idiopática e congênita”. Seus pais, ou seus responsáveis, permitiram que você participasse.

As crianças e adolescentes que irão participar dessa pesquisa têm menos de 18 anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se não quiser participar agora ou se desistir no futuro.

A coleta de um pequeno fragmento de osso é segura. A amostra será obtida durante a cirurgia para correção da curvatura da coluna que será feita em você e não existe necessidade de tomar nenhum cuidado a mais além daqueles indicados pela própria cirurgia. Basta seguir as orientações do médico que te operará.

Você não ganhará nada em troca pela sua participação e não será pago para participar desse projeto. Ninguém saberá que você está participando, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou perguntar ao pesquisador que te selecionou para participar deste projeto. Você pode me procurar pelo telefone (21) 2134-5499 (INTO/MS).

Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir sem que ninguém fique com raiva. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar do projeto “Caracterização da formação óssea de pacientes com escoliose idiopática e congênita”, que visa entender melhor a escoliose no futuro.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento, li e concordo em participar.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

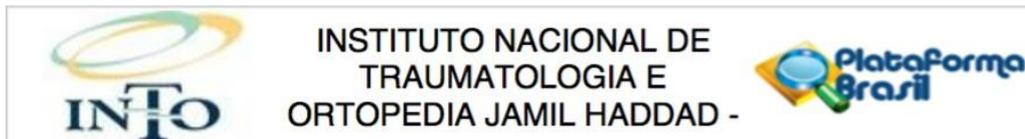
Assinatura do menor: \_\_\_\_\_

Assinatura do (a) responsável pela pesquisa: \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

## ANEXO D. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do INTO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do potencial de diferenciação osteoblástica de células estromais derivadas de medula óssea de pacientes portadores de escoliose congênita e idiopática.

**Pesquisador:** GUSTAVO BORGES LAURINDO DE AZEVEDO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 51082115.3.0000.5273

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

**Patrocinador Principal:** Instituto Nacional de Traumatologia - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.751.583

#### **Apresentação do Projeto:**

A apresentação do projeto está adequada.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo está bem definido.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios foram expostos e colocados no TCLE.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foi anexado novo TCLE para os controles.

#### **Recomendações:**

Não há

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**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



Continuação do Parecer: 1.751.583

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Senhor pesquisador, de acordo com o constante na Resolução CNS nº 466 de 2012, faz-se necessário apresentar ao CEP/INTO, através da Plataforma Brasil, a cada 06 (seis) meses o relatório de acompanhamento de sua pesquisa. Além disso, após a conclusão da pesquisa, deverá ser submetido na Plataforma Brasil, através do envio de uma Notificação, o Relatório Final e a pesquisa concluída para apreciação CEP/INTO.

Informamos que qualquer alteração realizada no protocolo de pesquisa aprovado deverá ser submetida à apreciação do CEP/INTO através do envio de uma emenda utilizando a Plataforma Brasil.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_560072.pdf	07/07/2016 12:29:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclec.docx	07/07/2016 12:29:02	Rafaela sartore da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	07/07/2016 12:27:37	Rafaela sartore da Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Escoliose2.docx	07/07/2016 12:27:12	Rafaela sartore da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Menor.docx	17/11/2015 13:20:37	Rafaela sartore da Costa	Aceito
Folha de Rosto	FR.pdf	17/11/2015 13:17:08	Rafaela sartore da Costa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**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



INSTITUTO NACIONAL DE  
TRAUMATOLOGIA E  
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -



Continuação do Parecer: 1.751.583

RIO DE JANEIRO, 28 de Setembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Marisa Peter Silva**  
**(Coordenador)**

**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

Página 03 de 03

## ANEXO E. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais do INTO

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

**COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA DO INTO**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "Utilização de BMSC humanas na celularização de enxertos ósseos homólogos para uso clínico" protocolado sob o número 002/2014, utilizando 18 (dezoito) camundongos, sob a responsabilidade do pesquisador Tito Rocha, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e foi aprovado na primeira reunião da Comissão em 14 de julho de 2014.

(We certify that the research "Use of human BMSC in cellularization of homologous bone grafts for clinical use", protocol number 002/2014, utilizing 18 (eighteen) mice, under the responsibility of the researcher Tito Rocha, agree with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Ethic Commission on Animal Use of the National Institute of Traumatology and Orthopedics, and was approved at the first meeting of the Commission on July 14, 2014).

Rio de Janeiro, 16 de julho de 2014.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Diego Pinheiro Aguiar  
Coordenador da Comissão

1