



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Gustavo Borges Laurindo de Azevedo

Associação do polimorfismo rs12916536 do gene *FBN1* e a suscetibilidade à escoliose idiopática do adolescente

Ribeirão Preto - SP

2021

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Gustavo Borges Laurindo de Azevedo

Associação do polimorfismo rs12916536 do gene *FBN1* e a suscetibilidade à escoliose idiopática do adolescente

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

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

Ribeirão Preto - SP

2021

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

Azevedo, Gustavo Borges Laurindo de

Associação do polimorfismo rs12916536 do gene *FBN1* e a suscetibilidade à escoliose idiopática do adolescente, 2021.112 p.: il.

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

Orientador: Defino, Helton Luiz Aparecido;

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

Versão Original

1. Escoliose idiopática do adolescente. 2. Fibrilina-1. 3. Polimorfismo genético.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Azevedo, Gustavo Borges Laurindo de

Título: Associação do polimorfismo rs12916536 do gene FBN1 e a suscetibilidade à escoliose idiopática do adolescente.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus orientadores, pelo incentivo, ajuda e ensinamentos essenciais para a realização desta tese.

À Professora Doutora Jamila Perini, excelente pesquisadora, por toda a sua ajuda e esforço, incansável em suas análises e sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Doutor Helton Defino, exemplo de cirurgião e pesquisador, que abriu as portas da USP-RP e me recebeu como aluno da pós-graduação.

À Professora Doutora Maria Eugênia Leite Duarte, pesquisadora, amiga e grande incentivadora do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

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

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia pelo apoio oferecido durante a elaboração desta tese, em especial ao meu amigo Helcio Mendonça Pereira, colega de pós-graduação, pela ajuda e parceria durante o período do doutorado.

Aos meus pais, Tania Azevedo e Carlos Fernando Azevedo, a quem devo minha formação cultural e ética, nos quais eu me espelho e tenho como grandes exemplos de médicos, professores e pesquisadores.

À minha amada companheira Ana Carolina Bastos Pereira, pela cumplicidade e apoio incondicional nesta etapa da minha vida profissional.

Aos pacientes e profissionais do Instituto Nacional de Traumatologia Ortopedia.

Muito Obrigado a todos!

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

"O que eu faço é uma gota no oceano. Mas sem ela o oceano ficaria menor".

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Azevedo, Gustavo Borges Laurindo de. Associação do polimorfismo rs12916536 do gene *FBN1* e a suscetibilidade à escoliose idiopática do adolescente. 2021. Tese. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Ribeirão Preto, 2021.

A escoliose idiopática afeta aproximadamente 4% da população e é a causa mais comum de desvios da coluna. Fatores intrínsecos e extrínsecos podem estar associados com o desenvolvimento da escoliose idiopática do adolescente (EIA), incluindo alterações genéticas. Dentre os genes candidatos associados ao desenvolvimento da EIA destaca-se o que codifica a fibrilina-1 (*FBN1*), uma glicoproteína da matriz extracelular, essencial para a organização das microfibrilas extracelulares em células do músculo esquelético e fibroblastos dérmicos, responsáveis por distúrbios do tecido conjuntivo, como a escoliose. Variantes raras e polimorfismos no gene *FBN1* já foram associados com a EIA em populações chinesas e norte americanas. Até então não existiam dados da população brasileira. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o papel potencial do polimorfismo *FBN1* rs12916536 no desenvolvimento e gravidade da EIA, além de correlacionar a variação do ângulo de Cobb em relação às características demográficas dos pacientes. Foi realizado um estudo analítico do tipo caso controle, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa institucional. Amostras de DNA de 563 voluntários (185 casos com EIA e 378 controles) foram analisadas usando um ensaio de discriminação alélica TaqMan validado. Um modelo de regressão logística multivariada avaliou a associação entre o polimorfismo *FBN1* rs12916536 e EIA, utilizando razões de chance (OR) ajustados com seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%. Uma análise de regressão linear avaliou a variação do ângulo de Cobb de acordo com a idade e o índice de massa corporal (IMC). No grupo de pacientes com EIA houve predomínio do sexo feminino (12:1), baixo IMC ou normal (90%), 58% apresentavam ângulo de Cobb maior que 45° e 74% eram esqueleticamente maduros (Risser IV-V). A idade foi um fator de risco (4 vezes) para a progressão da curva (0,72° por ano). A frequência alélica do polimorfismo *FBN1* rs12916536 A foi de 40% nos controles e 31% nos casos de EIA, sendo estatisticamente diferente entre os dois grupos ($P=0,004$). Os genótipos *FBN1* rs12916536 GA+AA foram associados a um menor risco de suscetibilidade a EIA (OR=0,58; IC95%=0,35-0,98), após ajuste pela idade, sexo e IMC. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas na distribuição do polimorfismo com a gravidade da doença (Cobb <45° ou ≥45°). Como conclusão, a idade foi um fator de risco para progressão da curva escoliótica e o polimorfismo *FBN1* rs12916536 foi um fator de proteção para suscetibilidade a EIA.

Palavras-chave: Escoliose idiopática do adolescente. Fibrilina-1. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Azevedo, Gustavo Borges Laurindo de. Association of the rs12916536 polymorphism of the *FBN1* gene and the susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis. 2021. Thesis. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Ribeirão Preto, 2021.

Adolescent idiopathic scoliosis affects around 4% of the population and is the main cause of spine deformity. Intrinsic and extrinsic factors are associated with AIS including genetic variants. Among the several candidate genes for AIS, *FBN1*, which encodes fibrillin 1 protein, stands out for its role in extracellular matrix and microfibrils structure in cells of the musculoskeletal system and dermal fibroblasts. Rare variants and polymorphisms of *FBN1* gene have been associated with AIS development in Chinese and north American population. So far, no this relationship has not been studied in Brazilian population. Thus, this study aimed to evaluate the potential role of the *FBN1* rs12916536 polymorphism in AIS development or severity and the variation in Cobb angle in relation to patient's characteristics. DNA from 563 subjects (185 AIS patients and 378 controls) were genotyped using a validated TaqMan allelic discrimination assay. A multivariate logistic regression model evaluated the association between polymorphism and AIS, using the adjusted odds ratios (OR) with their respective 95% confidence intervals (95% CI). A linear regression analysis evaluated the variation in Cobb angle according to the patient's age and body mass index (BMI). Among the AIS group there was a predominance of females (12:1), low or normal BMI (90%), 58% had a Cobb angle greater than 45° and 74% were skeletally mature. Age was a risk factor (4-fold) for curve progression (0.72° per year) higher than BMI ($P < 0.001$). The allelic frequency of the rs12916536 G>A polymorphism was 40% in controls and 31% in AIS cases; and this difference was statistically significant ($P = 0.004$). *FBN1* rs12916536 GA+AA genotypes were associated with a lower risk of AIS susceptibility (OR = 0.58 and 95% CI = 0.35-0.98), after adjustment for age, sex and BMI. However, no significant differences were detected in polymorphism distribution with the severity of the disease (Cobb $< 45^\circ$ or $\geq 45^\circ$). Age was a risk factor for progression of the scoliotic curve and *FBN1* rs12916536 polymorphism a protective factor for AIS susceptibility.

Keywords: Adolescent idiopathic scoliosis, Fibrillin-1, Genetic Polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMO – Densidade mineral óssea

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EIA – Escoliose idiopática do adolescente

FBN1 – Fibrilina 1

FBN2 – Fibrilina 2

GWAS – Estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide association studies*)

IC – Intervalo de Confiança

IMC – Índice de massa corporal

INTO – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

OR – Odds Ratio

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism*)

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β – Fator de crescimento tecidual Beta (*Tissue Growth Factor Beta*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos casos.....	50
Tabela 2. Análise de regressão linear do Cobb com a idade e o IMC.....	51
Tabela 3. Comparação dos dados demográficos entre os casos e controles.....	54
Tabela 4. Características demográficas da população de estudo.....	55
Tabela 5. Análise de associação do polimorfismo do gene <i>FBN1</i>	57
Tabela 6. Análise de associação do polimorfismo com Cobb abaixo de 45°	58
Tabela 7. Análise de associação do polimorfismo com Cobb acima de 45°	59
Tabela 8. Análise de associação do polimorfismo entre os grupos de Cobb.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alinhamento normal da coluna vertebral nos planos frontal e sagital.....	24
Figura 2. Método de Cobb	25
Figura 2. Espectro clínico e radiográfico de apresentação da EIA.....	27
Figura 3. Desenho esquemático das proteínas fibrilinas.....	34
Figure 4. Radiografia panorâmica de coluna em PA.....	43
Figure 5. Radiografia panorâmica da bacia (Risser IV)	44
Figure 7. Radiografia panorâmica da bacia (Risser I)	44
Figura 6. Determinação dos diferentes genótipos do polimorfismo <i>FBN1</i>	46
Figura 9. Relação entre o ângulo de Cobb e a idade	52
Figura 10. Relação entre o ângulo de Cobb e a idade até 25 anos.....	53
Figura 11. Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo <i>FBN1</i>	56

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
2. Fundamentação teórica.....	23
3. Justificativa.....	37
4. Objetivos.....	39
5. Material e Métodos.....	41
6. Resultados.....	48
7. Discussão.....	61
8. Conclusão.....	67
9. Referências Bibliográficas.....	69
10. Anexos.....	87

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O termo escoliose refere-se aos desvios da coluna no plano frontal, apresentando curvas no plano coronal superiores a 10°, pelo método de Cobb, acompanhadas de rotação vertebral (COBB, 1948). A escoliose idiopática, causa mais frequente de escoliose, desenvolve-se em pacientes sem alterações prévias, sem que sejam detectadas deformidades morfológicas nas vértebras, que expliquem a curvatura anormal da coluna (WINTER et al. 1995). A escoliose idiopática do adolescente (EIA), classificada de acordo com a idade de seu desenvolvimento, inicia após os dez anos de idade (JAMES, 1954). A apresentação clínica da EIA é altamente variável, com curvas na coluna torácica ou lombar e a convexidade pode ser à direita ou à esquerda, com curvas compensatórias acima e abaixo da maior curva (GRAUERS et al. 2016).

Dentre os fatores de risco, o sexo feminino é a principal característica associada à evolução da EIA (TAN et al. 2009), localização da curva na coluna torácica, início precoce da deformidade, baixo grau de maturidade esquelética, idade (BUSSCHER et al. 2010), ângulo de Cobb superior a 30° no momento do diagnóstico (SOUCACOS et al., 2000; HORNE et al., 2014; AGABEGI et al., 2015) e osteopenia (YIP et al. 2016). Entretanto, nenhum desses parâmetros são capazes de predizer com acurácia quais pacientes irão progredir para quadros graves da doença (YIP et al. 2016). Além disso, as curvas maiores de 30° tendem a aumentar cerca de 1° por ano, mesmo após a parada do crescimento (WEINSTEIN& PONSETI, 1983; WEINSTEIN et al., 2003; DANIELSSON et al., 2013; AGABEGI et al., 2015).

Os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese e desenvolvimento da EIA tem sido estudado há muitos anos e ainda assim, a etiologia da doença permanece desconhecida (KIKANLOO *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2020). Algumas hipóteses já foram propostas e tentam explicar o surgimento da EIA, como os erros metabólicos, as alterações

biomecânicas, no sistema nervoso, no crescimento ósseo e fatores genéticos (BURWELL *et al.*, 2016; PENG *et al.*, 2020).

A compreensão dos processos biológicos que levam ao desenvolvimento da EIA abre novas perspectivas para o entendimento da fisiopatologia e a possibilidade de novos tratamentos que corrijam as deficiências presentes nestes pacientes. A suscetibilidade hereditária à EIA justifica o interesse crescente em identificar polimorfismos genéticos associados ao risco aumentado de desenvolvimento da doença ou à sua progressão (PENG *et al.*, 2020). Variantes raras no gene que codifica a fibrilina 1 (*FBN1*) foram associados com o desenvolvimento e risco de progressão da EIA em pacientes norte americanos e chineses (BUCHAN *et al.*, 2014). As alterações nas proteínas fibrilinas podem causar alterações na regulação das vias de ativação de fatores de crescimento, como o TGF- β (NOWAK *et al.*, 2014). A glicoproteína da matriz extracelular, *FBN1*, está amplamente expresso nos elementos estruturais de microfibrilhas de tecidos elásticos e não elásticos, que podem estar alterados em doenças do tecido conjuntivo, como por exemplo a escoliose (GAO *et al.*, 2011; REYES-HERNÁNDEZ *et al.*, 2016). Pacientes com EIA apresentaram menor expressão de *FBN1* e o polimorfismo *FBN1* rs12916536 foi associado com aumento do risco individual de EIA na população chinesa e norte americana (SHENG *et al.*, 2019).

Até o presente momento não existiam dados na população brasileira referente a associação de polimorfismos no gene *FBN1* e a suscetibilidade ou gravidade da EIA. A identificação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças permite a formulação de hipóteses etiológicas, ajuda a ter uma melhor compreensão da sua fisiopatologia, contribuindo para determinar o diagnóstico, o prognóstico, e até pode nortear um tratamento individualizado.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. Fundamentação teórica

2.1 Coluna vertebral e escoliose

A coluna vertebral é composta por 33 vértebras que formam o pilar de sustentação do tronco, estendendo-se do crânio até a pelve, desempenhando diversas funções, incluindo a proteção à medula espinhal e o suporte estrutural ao tórax e abdome (FROST et al. 2019). Seu alinhamento apresenta curvaturas fisiológicas no plano sagital – lordose cervical, cifose torácica, lordose lombar e cifose sacral (**Figura 1**). Já no plano frontal, a coluna vertebral não possui curvaturas em condições normais (ROUSSOULY & NNADI, 2010).

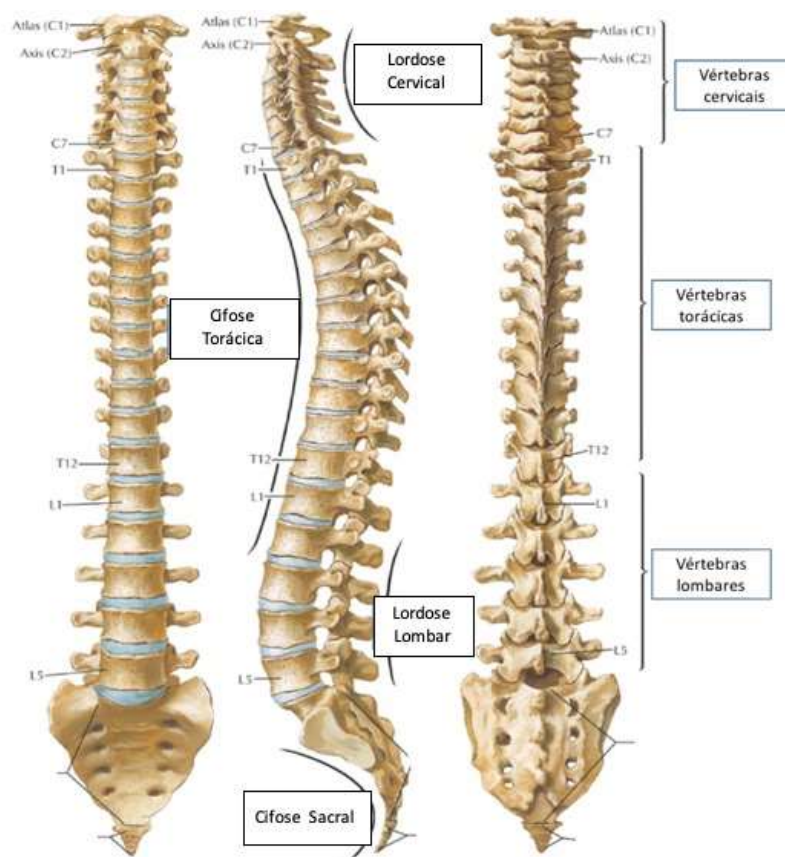


Figura 7. Alinhamento normal da coluna vertebral nos planos frontal e sagital. Fonte: Adaptado de The Netter Collection of Medical Illustrations, 2006, painel 153.

O termo escoliose, derivado do grego *skolios* (curva), refere-se aos desvios da coluna no plano frontal. De acordo com a *Scoliosis Research Society*, o diagnóstico de escoliose é feito quando as radiografias evidenciam curvas no plano coronal superiores a 10° acompanhadas de rotação vertebral. Esta aferição é usualmente realizada pelo método de Cobb, que consiste na mensuração do ângulo formado por linhas perpendiculares às placas terminais das primeira e última vértebras compreendidas na curva (**Figura 2**) (COBB, 1948).

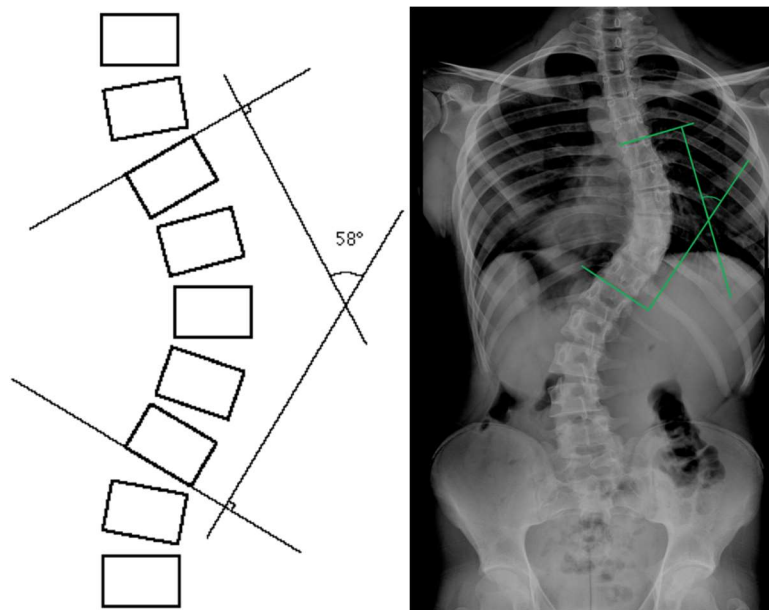


Figura 8. Método de Cobb utilizado para a mensuração das curvaturas da coluna vertebral na escoliose. (a) Desenho esquemático demonstrando as linhas que formam o ângulo de Cobb. A partir das placas superiores da primeira e inferior da última vértebra compreendidas na curva, traçam-se linhas perpendiculares. 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).

2.2 Escoliose idiopática

A escoliose idiopática, causa mais frequente de escoliose, desenvolve-se em pacientes sem alterações prévias, sem que sejam detectadas deformidades morfológicas nas vértebras que expliquem a curvatura anormal da coluna (WINTER et al. 1995). Caracteriza-se por ser uma deformidade tridimensional, com inclinação da coluna no plano frontal, rotação vertebral no plano axial e diminuição da cifose torácica no plano sagita (Stuart L Weinstein et al. 2008).

A escoliose idiopática afeta cerca de 3-4% da população e é a causa mais comum de desvios da coluna. É responsável por cerca de 80% de todos os casos de escoliose e é mais comum no sexo feminino, sendo que as curvas acima de 30° chegam a ser dez vezes mais frequentes em mulheres (WANG et al. 2012). Pode ser classificada de acordo com a idade de seu desenvolvimento, sendo denominada infantil quando ocorre até os três anos de idade, juvenil quando surge entre três e dez anos e escoliose idiopática do adolescente (EIA) quando se inicia após os dez anos de idade (JAMES, 1954).

2.3 Escoliose idiopática do adolescente

A EIA pode levar ao desenvolvimento de artrose degenerativa da coluna com maior prevalência de dor em seus portadores em relação à população normal (THÉROUX et al. 2015). Em casos mais severos ocorre comprometimento da função cardiopulmonar (PEHRSSON et al. 1991a; SEOKWON HUH et al 2015) e diminuição da expectativa de vida (PEHRSSON et al. 1991b; HELENIUS et al. 2014). A apresentação clínica da EIA é altamente variável, sendo que as curvas podem ter localização na coluna torácica ou lombar, e a convexidade pode ser à direita ou à esquerda, com curvas compensatórias acima e abaixo da maior curva (**Figura 3**). O padrão mais comumente encontrado é o de

uma curva torácica de convexidade à direita, com a presença de curva compensatória lombar esquerda (GRAUERS et al. 2016).



Figura 9. Espectro clínico e radiográfico de apresentação da EIA. A gravidade e localização das curvas tem grande variação entre os pacientes. Fonte: arquivo pessoal do autor.

O sexo feminino é a principal característica associada à evolução da EIA (TAN et al. 2009) e as curvas progressivas são cerca de cinco vezes mais frequentes em meninas do que em meninos (SOUACOS et al. 1998; KONIECZNY et al. 2013). Estima-se que menos de 10% dos pacientes diagnosticados com EIA tenham curvas evolutivas que atinjam 45° até a maturidade esquelética (ASHER & BURTON 2006). As curvas maiores de 50° tendem a aumentar cerca de 1 grau/ano mesmo após a parada do crescimento (WEINSTEIN & PONSETI, 1983; WEINSTEIN et al., 2003; DANIELSSON et al., 2013; AGABEGI et al., 2015). Outras características associadas à progressão da EIA incluem a localização da curva na coluna torácica, início precoce da deformidade, baixo grau de maturidade esquelética (BUSSCHER et al. 2010) e osteopenia (YIP et al. 2016). Mesmo com a avaliação destas características, os parâmetros atualmente utilizados não são capazes de

predizer com acurácia quais pacientes terão piora da escoliose e quais terão curvas não progressivas (YIP et al. 2016).

O tratamento da EIA é determinado pela gravidade da curva e seu potencial de progressão. A maior parte dos pacientes não desenvolve curvas acima de 45° e apresentam pouca limitação de sua capacidade física (DANIELSSON, 2013). O uso de coletes ortopédicos durante o crescimento diminui a taxa de progressão da EIA e constitui a principal forma de tratamento (KUROKI, 2018). Os coletes são indicados para os pacientes com curvas acima de 20° que ainda estejam em crescimento. O colete ortopédico corrige as curvas da escoliose, permitindo o crescimento da coluna de forma alinhada e melhorando a distribuição das forças que atuam nas vértebras. O tratamento com o uso de colete ortopédico não regride a escoliose, mas é capaz de impedir a sua progressão e, em muitos casos, evitar a indicação do tratamento cirúrgico (DOBBS, 2013). Nos casos em que a escoliose progride além de 45-50°, há indicação da correção cirúrgica da escoliose (WEINSTEIN AND PONSETI 1983; LONSTEIN AND CARLSON 1984; JE 2006; AJIT JADA et al. 2017).

2.4 Aspectos etiológicos da escoliose idiopática do adolescente

Alterações do controle neuromuscular (VELDHUIZEN et al. 2000), assincronia entre o crescimento do sistema nervoso central e o musculoesquelético (PORTER, 2001), alterações da sensibilidade proprioceptiva (BARRACK et al. 1984; WU et al 2020). e alterações hormonais (MOREAU et al. 2004), já foram descritas em pacientes com EIA. No entanto, não se sabe se alterações encontradas são causadoras ou secundárias à deformidade (I. A. F. Stokes et al. 1996; Smit 2020) SMIT 2020. Além disso, as anomalias encontradas em pacientes com EIA são variadas e não estão universalmente presentes nestes pacientes, o que dificulta o entendimento de sua fisiopatologia. A hipermobilidade

articular é um achado frequente e pode ser um dos fatores relacionados ao seu desenvolvimento, por conferir instabilidade à coluna vertebral em crescimento (CZAPROWSKI, 2014).

Aspectos ligados ao crescimento esquelético também podem estar relacionados ao desenvolvimento da EIA, e os pacientes com a doença, em geral, são mais altos que os controles da mesma idade e apresentam menor índice de massa corporal (IMC) (GRIVAS et al. 2009; HERSHKOVICH et al. 2014). O baixo IMC é mais frequente em meninas com menarca mais tardia, outra característica frequentemente nas pacientes com EIA e que pode estar relacionada a distúrbios hormonais (MAO et al. 2011). O baixo IMC também foi associado com pior prognóstico comparado com os pacientes que não responderam ao tratamento conservador (GOODBODY et al., 2016). E diversos trabalhos sugerem que o baixo IMC pode estar associado à patogênese da EIA (CHEUNG et al., 2003; RAMÍREZ et al., 2013; GOODBODY et al., 2016; JEON et al., 2018; MIYAGI et al., 2020).

A osteopenia, caracterizada pela baixa densidade mineral óssea (DMO), constitui outro aspecto comum nos pacientes com deformidades da coluna, incluindo a EIA (CHENG & GUO 1997, EUN et al. 2017). Estudos recentes demonstram que a gravidade da osteopenia se correlaciona com a evolução da escoliose e os pacientes com baixa DMO frequentemente apresentam curvas progressivas (YIP et al. 2016). Os pacientes com EIA também apresentam diminuição dos níveis séricos de cálcio e vitamina D, e essa diminuição também está ligada à gravidade da escoliose (HERDEA et al. 2020). O metabolismo ósseo parece estar alterado nos pacientes com EIA, que apresentam níveis elevados de marcadores de atividade de osteoclastos em relação a pacientes controle (CHEUNG et al. 2006; CHIRU 2011; ISHIDA et al. 2016).

Além dos diversos aspectos biológicos, a atuação de fatores biomecânicos durante o crescimento da coluna influencia o desenvolvimento e a taxa de progressão da

deformidade. A alteração do eixo de transmissão de cargas pela coluna causada pela escoliose leva a um ciclo vicioso em que ocorre a assimetria do crescimento do corpo vertebral, causando o encunhamento das vértebras, com maior desenvolvimento do lado convexo em relação ao lado côncavo. Esse mecanismo perpetua a deformidade e pode ser um dos fatores responsáveis pela progressão das curvas durante a fase de crescimento da adolescência (STOKES et al., 1996, STOKES et al. 2017).

Apesar dos inúmeros trabalhos que estudam a fisiopatologia da EIA, o desenvolvimento da doença ainda é pouco compreendido. Nos últimos anos, com o avanço das técnicas de sequenciamento de DNA, a predisposição genética tem sido um dos aspectos mais estudados e grande parte das pesquisas buscam detectar alterações nos genes relacionados à fisiologia do crescimento, diferenciação tecidual e homeostase dos tecidos musculoesqueléticos (KIKANLOO et al. 2019).

2.5 Fatores genéticos da escoliose idiopática do adolescente

A grande frequência de pacientes com história familiar positiva para escoliose é a mais antiga evidência acerca da contribuição genética para o desenvolvimento da EIA. Garland, em 1934, relatou a ocorrência da doença em cinco gerações da mesma família (GARLAND, 1934). Em 1968 e depois em 1973, também foi observado por grupos independentes maior prevalência de escoliose em determinadas famílias, sugerindo a participação de fatores hereditários na etiologia da EIA (WYNNE-DAVIES 1968, RISEBOROUGH & WYNNE-DAVIES, 1973). Além disso, a grande diferença entre a concordância da ocorrência de EIA em gêmeos monozigóticos (73%) em relação à gêmeos dizigóticos (36%) reforça a participação genética e ambiental no desenvolvimento da EIA (KESLING & REINKER 1997; GRAUERS et al. 2012).

A ocorrência da EIA não segue um padrão de herança Mendeliano e a incapacidade de se identificar os genes causadores da EIA suporta a ideia de que seja uma doença de herança poligênica complexa, com a participação de fatores genéticos e ambientais, influenciando tanto no surgimento quanto na progressão da deformidade (WARD et al. 2010a; TANG et al. 2012).

O genoma humano é composto por cerca de três bilhões de pares de bases, presentes nas moléculas de DNA, localizado no interior dos núcleos de cada célula do corpo (CRAIG VENTER et al. 2001). A sequência de bases do genoma de dois indivíduos é igual em aproximadamente 99,5% das posições de pares de bases (A, T, C e G), e a pequena diferença genética entre os indivíduos contribuem para as características (fenótipos) únicas de cada indivíduo (LANDER et al. 2001).

Os polimorfismos genéticos são variações que ocorrem naturalmente na sequência de DNA, aproximadamente a cada 500 pares de bases nitrogenadas. O tipo mais comum de polimorfismo genético é o que ocorre a alteração de apenas um nucleotídeo, denominado polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNP). Os SNPs podem influenciar a expressão de genes e/ou a função das proteínas, determinando características individuais únicas, incluindo a suscetibilidade a determinadas doenças e a resposta a medicamentos. Estima-se que o número de SNPs no genoma humano seja superior a 10 milhões, e o registro dos polimorfismos em grandes bancos de dados permite o estudo das variações genéticas e a associação com a ocorrência de doenças de herança complexa (KARKI et al. 2015), como a EIA (PENG et al., 2020).

Estudos de associação genômica ampla (*genome-wide association studies, GWAS*) permitem a identificação de regiões do genoma associadas ao desenvolvimento de doenças. Estes estudos avaliam a frequência de milhares de SNPs distribuídos em todo o genoma e buscam diferenças entre a frequência dos SNPs no genoma de pacientes com

determinada característica ou doença e de indivíduos controles, que não tenham o traço estudado (SCHAID et al. 2018). A análise dos SNPs avaliados por GWAS possibilita a identificação de “genes candidatos” que podem atuar na fisiopatologia da doença em estudo.

Estudos prévios de GWAS já identificaram SNPs associados com a EIA em genes envolvidos com o sistema musculoesquelético, como músculos, cartilagem, osso e discos vertebrais ((TAKAHASHI et al., 2011; SHARMA et al., 2011; KOU et al., 2013; BUCHAN et al., 2014; OGURA et al., 2015; SHARMA et al., 2015; ZHAO et al., 2015; ZHU et al., 2015; OGURA et al., 2016; ZHU et al., 2017; KHANSHOUR et al., 2018; KOU et al., 2019). No entanto, as associações muitas vezes não são replicadas quando testadas em populações distintas, o que dificulta o entendimento dos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento da doença (OGURA et al. 2013).

Alterações de proteínas da MEC já foram descritas em diversas doenças do sistema musculoesquelético, como displasia espondiloepifisária, distrofias musculares (como por exemplo Duchenne), colagenopatias, fibrilinosopatias, como as síndromes de Marfan, Loeys–Dietz, arnodactilia congênita, entre outras (TSIPOURAS et al., 1992; MILLER et al., 1996; LOEYS et al., 2001; FAIVRE et al., 2003; ARBUSTINI et al., 2005; MATT et al., 2009; GAO et al., 2011; NOWAK et al., 2014; REYES-HERNÁNDEZ et al., 2016; OXFORD et al. 2019; PHOKAEW et al., 2020). Estas alterações da MEC configuram perda das características biomecânicas normais dos tecidos musculoesqueléticos e este mecanismo também pode estar relacionado ao risco de desenvolvimento da EIA (WISE et al. 2020).

A melhor compreensão da fisiopatologia de doenças que cursam com escoliose, similar à EIA, pode ajudar a identificar os mecanismos que levam ao desenvolvimento da deformidade idiopática. Nesse contexto, as alterações da matriz extracelular (MEC), como a fibrilina 1 (FBN1), encontradas tanto na EIA quanto em outras doenças que manifestam

deformidade da coluna podem ser os fatores predisponentes para o desenvolvimento da escoliose (TSIPOURAS et al. 1992; LOEYS et al. 2001; FAIVRE et al. 2003; ARBUSTINI et al. 2005; BUCHAN et al. 2014; SHENG et al. 2019; WISE et al. 2020; PHOKAEW et al. 2020).

2.6 Fibrilina 1

A glicoproteína FBN1 (**Figura 4**), principal componente estrutural da MEC, se liga a outras proteínas formando filamentos denominados microfibrilas, presentes em diversos tecidos como pele, músculos, cartilagem, rins, ossos, cristalino e pulmões. As fibrilinas exercem importante papel na regulação do metabolismo ósseo, participando da regulação da diferenciação de osteoblastos (BIERY et al. 1999; SCHRENK ET AL. 2018).

A FBN1 também participa da regulação da via de sinalização TGF- β , mediando a sua liberação da MEC e assim regulando a sua biodisponibilidade. As proteínas TGF- β são fatores de crescimento tecidual que atuam em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, migração e ciclo celular. As alterações na via de sinalização TGF- β estão relacionadas à diversas doenças do sistema cardiovascular e musculoesquelético além de comprometimento do metabolismo ósseo e consolidação de fraturas (MATT et al. 2009; NOWAK et al. 2014; SCHRENK ET AL. 2018).

A proteína FBN1 é amplamente expressa nos elementos estruturais de microfibrilhas de tecidos elásticos e não elásticos, e sua expressão é alterada em doenças do tecido conjuntivo, como por exemplo a escoliose (GAO et al., 2011; REYES-HERNÁNDEZ et al., 2016).

A proteína é codificada pelo gene de mesmo nome, *FBN1*, localizado no cromossomo 15q21.1 (**Figura 4**), apresentando 200kb e 65 éxons (BIERY et al. 1999; SCHRENK et al. 2018).

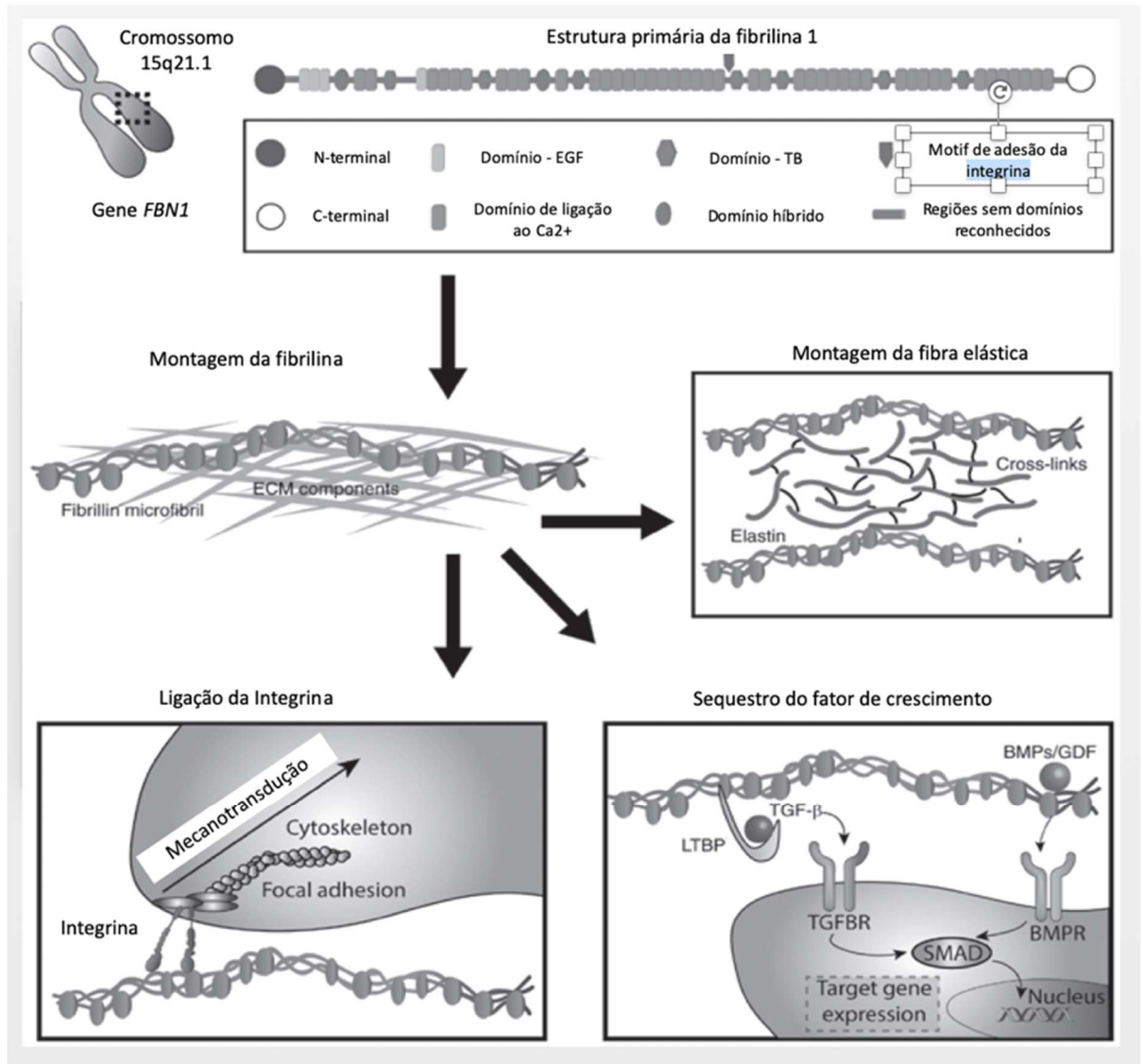


Figura 10. Desenho esquemático representando a localização no cromossomo, organização e funções primárias das proteínas fibrilinas. Adaptado de SCHRENK et al. 2018.

2.7 Polimorfismos no gene *FBN1* e escoliose idiopática do adolescente

Em 2014, Buchan e colaboradores realizaram sequenciamento do exoma de 91 pacientes de origem europeia portadores de EIA com curvas superiores a 40° buscando identificar genes associados com as formas graves da doença. Ao comparar o genoma dos pacientes com EIA com indivíduos controles (n = 337) foram identificados 13.000 genes, com pelo menos uma “variante rara”, definidas como formas variantes dos genes não registradas na dbSNP, banco de dados público internacional que cataloga os polimorfismos

genéticos humanas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Dentre os genes descritos, o *FBN1* foi o mais significativo, apresentando um risco de aproximadamente 10 vezes (OR = 10,4, 95% IC 95% = 2,7– 39,5) para o desenvolvimento da EIA. Além disso, as variantes raras de *FBN1* também estiveram diretamente associadas à gravidade das curvas e a maior estatura. Os pacientes com variantes raras do *FBN1* apresentaram curvas em média 20° maiores do que os pacientes selvagens (sem as alterações genéticas). Os achados foram replicados em outra coorte de 344 pacientes europeus e 370 chineses, sugerindo que as alterações no gene *FBN1* podem estar associadas ao desenvolvimento da EIA em populações de diferentes ancestralidades (BUCHAN et al. 2014). Até o momento de iniciarmos este trabalho não existiam dados em populações miscigenadas, como a população brasileira.

Além das variantes raras no gene *FBN1*, polimorfismos, que apresentam frequências maiores que 1% nas diferentes populações também foram associados com a EIA. Recentemente, Sheng e colaboradores (2019) avaliaram a frequência de 106 SNPs nos genes *FBN1* e *FBN2* em 960 mulheres chinesas com EIA (idade média $14,3 \pm 3,2$) e 1499 controles. Foi observada associação significativa entre a presença do polimorfismo rs12916536 G>A do gene *FBN1* e a ocorrência da EIA, sendo um fator de proteção (OR = 0,81 e IC 95% = 0,72 –0,90). Os pacientes com EIA apresentavam frequência significativamente menor do alelo variante *FBN1* rs12916536 A (39,7%) quando comparado ao grupo controle (45%). Além disso, os autores analisaram a expressão do gene *FBN1* em amostras de tecido muscular de 66 pacientes com EIA, submetidos ao tratamento cirúrgico e encontraram diminuição significativa da expressão do RNAm de *FBN1*. Os resultados mostraram ainda associação inversa entre a expressão tecidual do *FBN1* e a gravidade da curva da escoliose, contudo não houve diferença de expressão do *FBN1* entre os diferentes genótipos do SNP rs12916536. Os resultados deste trabalho sugerem que o SNP

rs12916536 do gene *FBN1* contribuem tanto para o desenvolvimento quanto para a progressão da curva (SHENG et al. 2019).

Até o momento não existiam dados da população brasileira avaliando a influência do polimorfismo rs12916536 G>A do gene *FBN1* com o desenvolvimento da EIA. O entendimento da fisiopatologia e da progressão da EIA constitui um grande desafio àqueles que se dedicam ao estudo desta complexa doença. A identificação dos genes e seus polimorfismos associados com o desenvolvimento e à progressão da EIA cria novas possibilidades de estratégias diagnósticas e terapêuticas, identificando indivíduos em risco ou que não irão responder ao tratamento conservador, e até identificando processos biológicos que levam à deformidade.

A identificação de marcadores genéticos associados com a progressão da EIA pode ajudar no tratamento e aconselhamento de pacientes em estágios iniciais da doença, pela determinação mais acurada do prognóstico de progressão de sua deformidade. Esta abordagem já foi realizada previamente com um teste diagnóstico que seria capaz de, a partir da análise de um painel de 53 polimorfismos genéticos, identificar o risco de progressão da escoliose em pacientes recém diagnosticados (WARD et al. 2010b) . No entanto, quando utilizado em populações distintas o teste não foi capaz de prever o risco de progressão da escoliose e foi descontinuado. Recentemente, um algoritmo incluindo dados clínicos e análise de polimorfismos genéticos foi validado para determinar o prognóstico da EIA em pacientes chineses (XU et al. 2019). Até o momento não existem dados da população brasileira o que justifica a realização deste estudo.

3. Justificativa

A EIA é a causa mais frequente de deformidade da coluna e atinge em torno de 4% da população. Embora muitas alterações biológicas tenham sido demonstradas em pacientes portadores de EIA, tais alterações não são uniformemente encontradas, o que dificulta o entendimento de sua fisiopatologia. Múltiplas teorias etiológicas desenvolvidas a partir de anomalias observadas em paciente com EIA tentam explicar a sua ocorrência, porém a variedade e inconstância dos achados fazem com que não existam meios precisos de se determinar o prognóstico de pacientes com curvas em estágios iniciais. Além disso, os fatores que levam alguns pacientes a apresentarem curvas progressivas não são compreendidos.

O desconhecimento acerca da fisiopatologia da doença tem como resultado a escassez de possibilidades terapêuticas, que se limitam à observação, uso de coletes e exercícios e ao tratamento cirúrgico nos casos graves. A melhor compreensão dos eventos patológicos que antecedem a deformidade da coluna abre a possibilidade de intervenções precoces com o objetivo de corrigir as alterações moleculares subjacentes.

Estudos genéticos de pacientes com EIA já identificaram múltiplas associações de variantes genéticas com o desenvolvimento da doença. No entanto, os achados apresentam ampla variação entre populações diferentes, o que dificulta a identificação dos genes predispostos e seus polimorfismos associados a suscetibilidade à EIA.

As análises genéticas de populações diferentes são essenciais para a confirmação de associações encontradas e para o entendimento da força dessas associações. Neste contexto, os resultados deste estudo podem corroborar achados de outras populações, constituindo substrato fundamental para o entendimento dos mecanismos celulares que levam ao surgimento e progressão da escoliose.

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1. Objetivo primário

Avaliar a influência do polimorfismo rs12916536 do gene *FBN1* na suscetibilidade e gravidade da escoliose idiopática do adolescente em uma amostra de pacientes brasileiros.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar os parâmetros radiográficos para classificação da EIA, de acordo com a indicação cirúrgica;
- Descrever os dados demográficos e clínicos dos pacientes com EIA;
- Avaliar a variação do ângulo de Cobb em função da idade e do IMC do paciente.
- Determinar a frequência alélica e genotípica do polimorfismo estudado em pacientes com EIA e em indivíduos sem doença na coluna vertebral;
- Avaliar a magnitude de associação do polimorfismo *FBN1* rs12916536 com o desenvolvimento da EIA e com os subgrupos de indicação cirúrgica.

MATERIAL E MÉTODOS

5. Material e Métodos

5.1. Tipo de estudo, população e aspectos éticos

Trata-se de um estudo analítico do tipo caso controle envolvendo pacientes com escoliose idiopática do adolescente, atendidos pelo Centro de Doenças da Coluna do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) no Rio de Janeiro. O critério de inclusão foi o diagnóstico de EIA estabelecido em consulta clínica com confirmação após análise de radiografias. Somente pacientes com exame neurológico normal e sem sinais ou história que sugerisse escoliose de outras etiologias foram incluídos no estudo.

Após concordarem em participar do estudo e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**anexo I**), todos os pacientes ou os seus responsáveis preencheram o termo de consentimento informado e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INTO – parecer 637.973 (**anexo II**) e foi realizada o preenchimento de formulário com características clínicas e radiográficas dos pacientes (**anexo III**).

Os pacientes foram submetidos à coleta de células da mucosa oral por *swab* estéril para posterior análise genética e foram avaliados quanto ao peso e altura para o cálculo do IMC.

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

5.2. Avaliação radiográfica

As radiografias panorâmicas de coluna foram analisadas pelo pesquisador principal quanto ao tipo de curva e a gravidade da escoliose, determinada pelo valor do ângulo de Cobb da maior curva na coluna torácica e na coluna lombar (**Figura 5**). O grau de maturidade esquelética foi classificado segundo os estágios de Risser da ossificação da apófise da crista ilíaca. Estágio zero – ausência de ossificação da apófise da crista ilíaca; estágio I – até 25% de ossificação; estágio II – de 25% a 50% de ossificação; estágio III – de 50% a 75% de ossificação; estágio IV de 75% a 100% de ossificação da apófise com cartilagem de crescimento ainda visível; estágio V – ossificação completa da apófise. (**Figuras 6 e 7**).

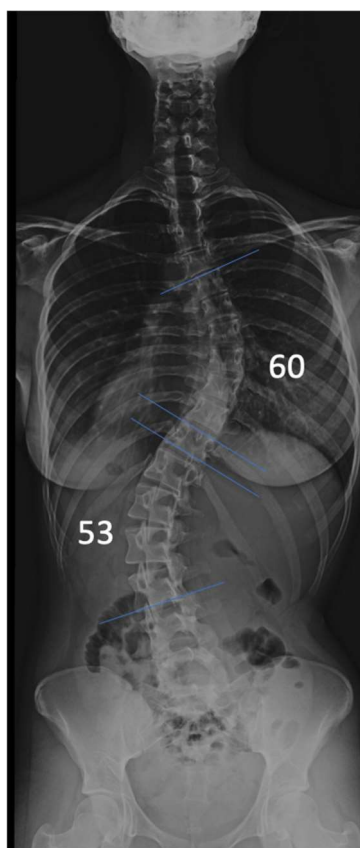


Figure 11. Radiografia panorâmica de coluna em PA. Linhas azuis marcam os *plateaus* superiores e inferiores das vértebras limites das curvas torácica e lombar.



Figure 12. Radiografia panorâmica de bacia evidenciando ossificação da apófise da crista ilíaca entre 75% e 100% com presença da cartilagem de crescimento (estágio de Risser IV).

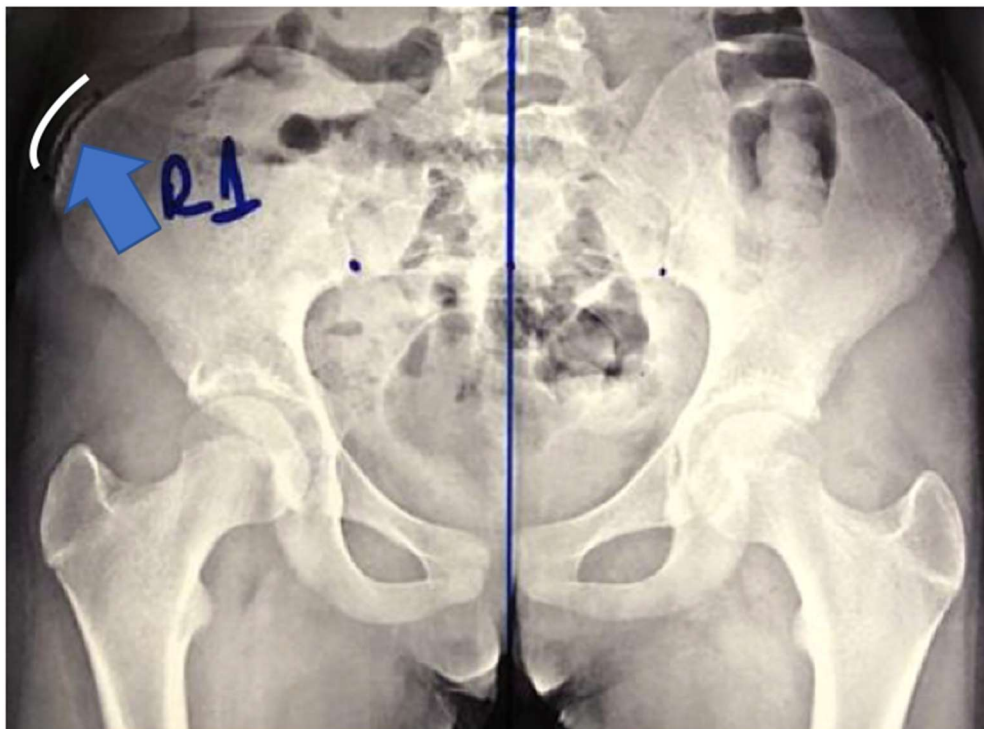


Figure 13. Radiografia panorâmica de bacia evidenciando ossificação da apófise da crista ilíaca entre 0-25% (estágio de Risser I).

5.3. Análise do polimorfismo de *FBN1*

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de mucosa oral, utilizando um kit comercial (Invisorb® Spin, Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Em resumo, a extração de DNA foi realizada pela lise das células, juntamente com a incubação com Proteinase K. Foram utilizados colunas e tampões específicos para purificação e isolamento do DNA. Após as lavagens e centrifugações necessárias, o DNA foi isolado com um tampão de eluição.

A análise do polimorfismo rs12916536 G>A do gene *FBN1* foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o sistema TaqMan. Para todos os ensaios, as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 8 ul, com 30 ng de DNA. A detecção dos genótipos foi realizada no aparelho 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (**Figura 8**).

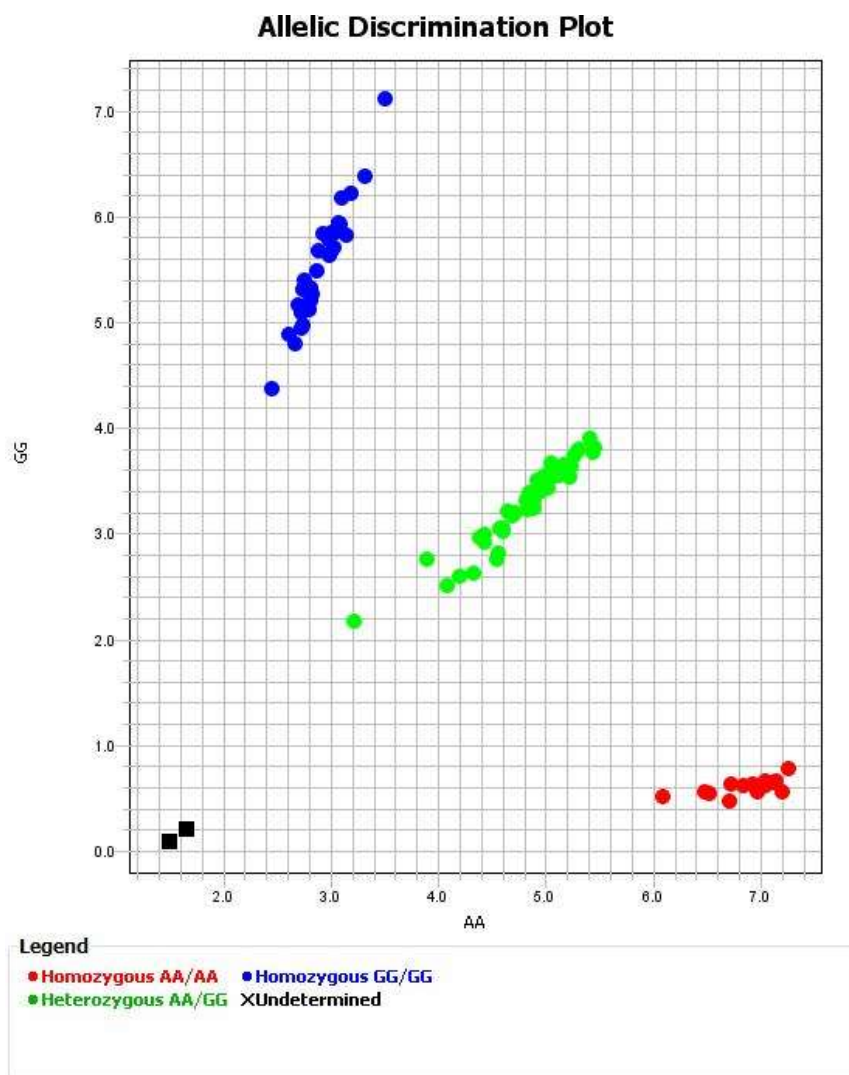


Figura 14. Determinação dos diferentes genótipos do polimorfismo do gene *FBN1* rs12916536 utilizando o sistema TaqMan por PCR em tempo real. O quadrado em preto representa o controle negativo. Os círculos em azul são os genótipos homozigotos selvagem (*FBN1* rs12916536 GG); em vermelho os homozigotos variantes (*FBN1* rs12916536 AA) e, em verde, os indivíduos com genótipo heterozigoto (*FBN1* rs12916536 GA).

5.4 Análise estatística

A normalidade da população foi avaliada pelo teste de Shapiro – Wilk ou pelo teste Kolmogorov – Smirnov. As diferenças entre as médias das variáveis contínuas foram avaliadas usando o teste t-student enquanto as diferenças entre as proporções das variáveis categóricas pelo teste Chi-quadrado χ^2 , sendo considerado um grau de significância de 5%.

Foi realizada análise de regressão linear utilizando o ângulo de Cobb e a idade ou IMC para avaliar a variação do ângulo de Cobb em relação à idade e ao IMC do paciente.

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene *FBN1* rs12916536 foram determinadas por contagem direta dos alelos e analisadas pelo teste de Fisher ou teste χ^2 , após constatar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Para avaliar a magnitude de associação entre o polimorfismo estudado e o desenvolvimento e gravidade da EIA, as razões de chances brutas e ajustadas (OR) com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram estimadas usando o método de regressão logística multivariada não condicional. O modelo de ajuste empregado para controlar os possíveis fatores de confundimento da análise, considerou a importância biológica de cada variável e o grau de significância estatística na análise univariada, na qual entraram no modelo as variáveis com nível de significância menor ou igual a 0,25 ($P \leq 0,25$), porém permaneceram apenas as quais apresentaram nível de significância de 0,05 ($P \leq 0,05$) após saída do modelo.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA, versão 20.0) e um nível de significância de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

6. Resultados

Os resultados desta tese foram submetidos à revista *BMC Musculoskeletal Disorders* (A1, fator de impacto 2,054) no dia 22 de outubro de 2021 (**Anexo IV**).

6.1 Demografia e dados clínicos dos casos de escoliose

Dentre os 185 pacientes com EIA, a grande maioria era do sexo feminino (92,4%), com idade abaixo dos 18 anos (62,8%) e com IMC abaixo de 24,9 kg/m² (89,6%) (**Tabela 1**). A média de idade foi de 18,6 ± 6,7 (mínimo 10 e máximo 48 anos), o peso 52,7 ± 11,9 (mínimo 33,0 e máximo 110 kg), a altura 1,61 m ± 0,08 (mínimo 1,37 e máximo 1,88 m) e do IMC foi de 20,4 kg/m² ± 4 (mínimo 14 e máximo 39,9 kg/m²). A proporção de mulheres afetados em relação aos homens foi de 12,2:1.

Considerando o grau de maturidade esquelética (escala de Risser), a grande maioria (73,7%) era maduro (IV e V). A média do ângulo de Cobb da maior curva foi de 47,7° ± 16,3 (mínimo 11 e máximo 110,0°). Cinquenta e oito por cento dos pacientes apresentaram curvas acima de 45°, parâmetro utilizado para a indicação do tratamento cirúrgico (**Tabela 1**).

Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos 185 pacientes com escoliose idiopática do adolescente.

Variáveis	Casos de Escoliose N (%)
Idade^{a,b} (anos)	
≤ 18	115 (62,8)
19 a 28	51 (27,9)
≥ 29	17 (9,3)
Sexo	
Feminino	171 (92,4)
Masculino	14 (7,6)
IMC^c (kg/m²)	
≤ 18,50	64 (35,2)
18,51 a 24,9	99 (54,4)
25,0 a 29,9	12 (6,6)
≥ 30	7 (3,8)
Escala de Risser^d	
Imaturo (0-III)	46 (26,3)
Maduro (IV-V)	129 (73,7)
Cobb (graus)^e	
< 45	74 (42,0)
≥ 45	102 (58,0)

^aInformação obtida de 183 casos. ^bValores categorizados de acordo com a distribuição por quartil da população total do estudo (N=563). ^cInformação obtida de 182 casos. ^dInformação obtida de 175 casos. ^eInformação obtida de 176 casos.

Foi realizado uma análise de regressão linear para comparar a influência da idade e do IMC dos pacientes em relação ao ângulo de Cobb. Na comparação dos coeficientes de regressão padronizados β , que determina a contribuição ligada as variáveis independentes, foi observado que a idade ($P < 0,001$) contribuiu 4 vezes ($\beta = 0,29/0,08$) mais do que o IMC para o aumento do ângulo de Cobb (**Tabela 2**). Foi observado um aumento médio do ângulo de Cobb de $0,72^\circ$ a cada um ano de vida. As linhas de regressão relativa, com intervalos de confiança de 95% para os valores médios estimados do ângulo de Cobb, são apresentados na **Figura 9**.

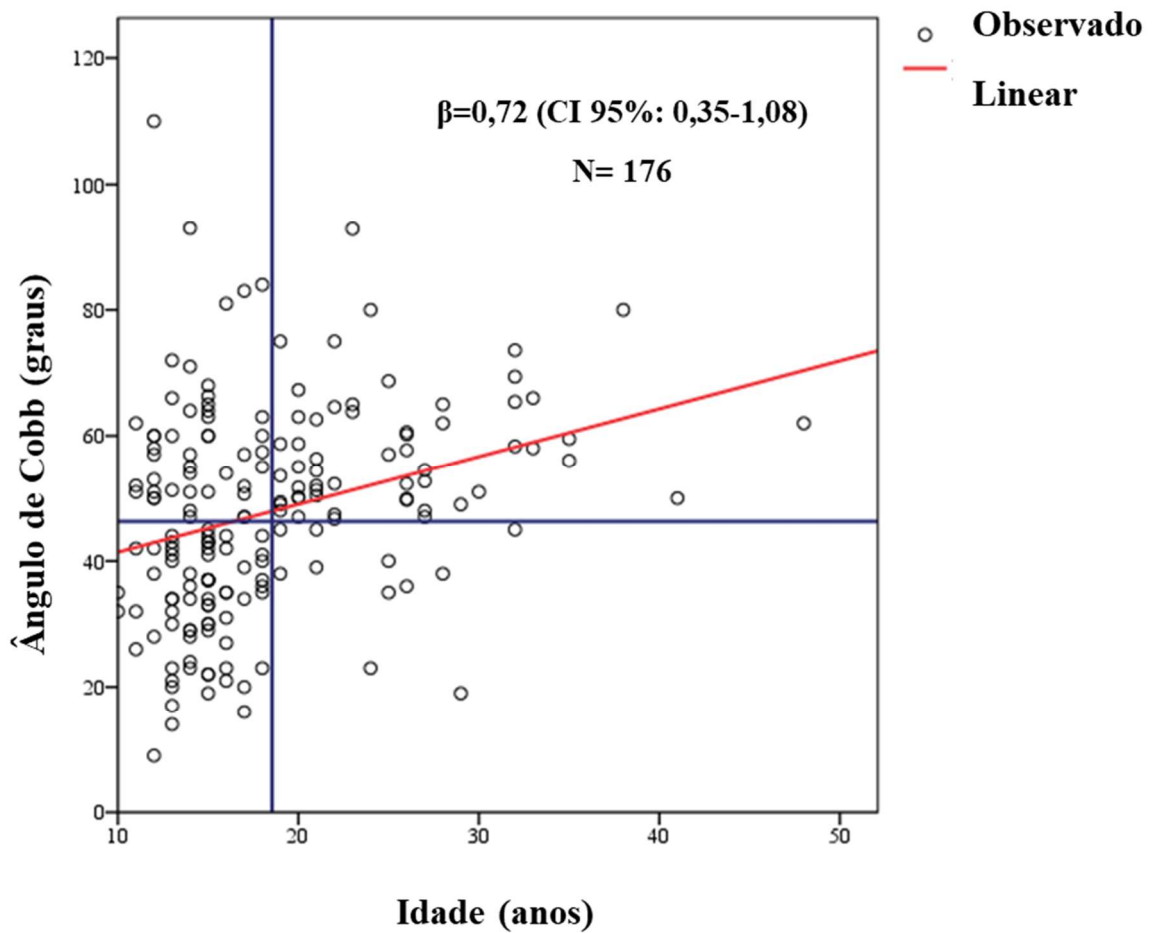
Considerando apenas os pacientes com até 25 anos de idade, foi observado um aumento médio significativo ($P = 0,001$) do ângulo de Cobb de $1,49^\circ$ (IC 95% = $0,58 - 2,40$; $r^2 = 0,07$) a cada um ano de vida (**Figura 10**).

Tabela 2. Análise de regressão linear comparando o ângulo de Cobb com a idade e o IMC dos pacientes.

Variáveis	Coeficiente de regressão	P-valor	Coeficiente β padronizado	(IC 95 %)
		Cobb		
Idade	0.72	<0,001	0,29	0,35 – 1,08
Sexo	-6.21	0,17	-0,10	-15,12 – 2,71
IMC	0.33	0,31	0,08	-0,30 – 0,96
r^2 ajustado		0,11		
P-modelo^a		<0,001		

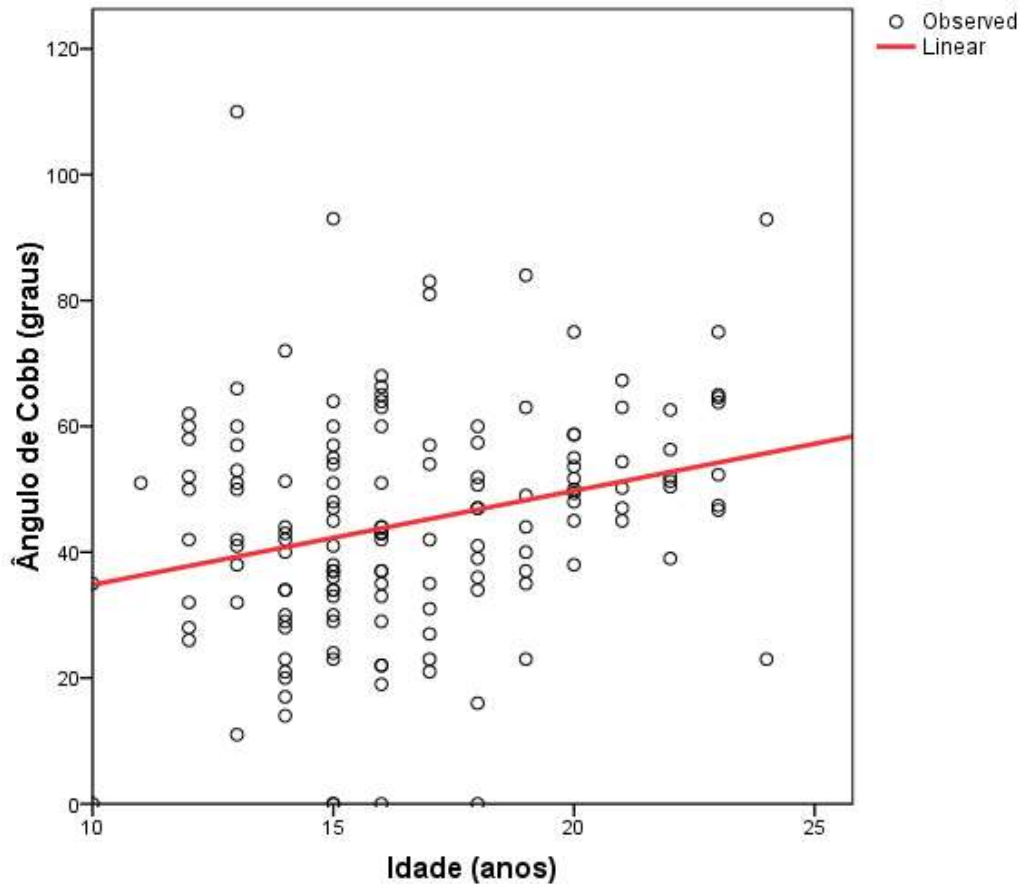
^aP-modelo calculado peço teste ANOVA. Informação obtida de 176 casos.

Figura 9. Relação entre o ângulo de Cobb e a idade dos pacientes com com escoliose idiopática do adolescente.



Legenda: Os círculos representam cada paciente. A linha vermelha é o coeficiente de correlação linear ($r^2 = 0,09$ com $P < 0,001$) e as linhas azuis são as médias de idade e do ângulo de Cobb. Informação obtida de 176 casos.

Figura 10. Relação entre o ângulo de Cobb e a idade dos casos de escoliose idiopática do adolescente, considerando os pacientes com até 25 anos.



Legenda: Os círculos representam cada paciente. A linha vermelha é o coeficiente de correlação linear ($R^2 = 0,07$ com $P = 0,001$). Informação obtida de 148 casos.

6.2 Demografia do estudo caso-controle

A comparação dos dados demográficos dos 563 indivíduos incluídos no estudo está reunida nas **Tabelas 3 e 4**. A média de idade do grupo controle foi significativamente maior que dos casos de escoliose idiopática do adolescente, já que a maioria dos voluntários foram recrutados no banco de doadores de sangue do INTO (HEMOINTO). A idade, o peso, a altura e o IMC foram significativamente diferentes entre os casos de escoliose e os controles ($P < 0,001$). Em ambos os grupos o sexo feminino foi o mais frequente.

Tabela 3. Comparação dos dados demográficos entre os casos de escoliose idiopática do adolescente e os controlos.

Variáveis	Controlos (N = 378)	Casos de escoliose (N = 185)	P-valor^a
Idade (anos)^b			
Média±DP	36,96 ± 12,59	18,60 ± 6,73	<0,001
Mediana	35	16	
Mínimo	14	10	
Máximo	69	48	
Peso (Kg)^c			
Média±DP	76,87 ± 16,57	52,69 ± 11,93	<0,001
Mediana	75,0	50,7	
Mínimo	47,0	33,0	
Máximo	125,0	110,0	
Altura (m)^c			
Média±DP	1,69 ± 0,09	1,61 ± 0,08	<0,001
Mediana	1,69	1,60	
Mínimo	1,38	1,37	
Máximo	2,05	1,88	
IMC (Kg/m²)^c			
Média±DP	26,75 ± 4,87	20,38 ± 3,97	<0,001
Mediana	26,4	20,0	
Mínimo	17,9	14,0	
Máximo	46,7	39,9	

^aP-valor calculado pelo teste t de *Student* de amostras independentes.

^bInformações obtidas de 561 indivíduos (casos de escoliose = 183). ^cInformações obtidas de 560 indivíduos (casos de escoliose = 182).

Tabela 4. Características demográficas da população de estudo (N=563).

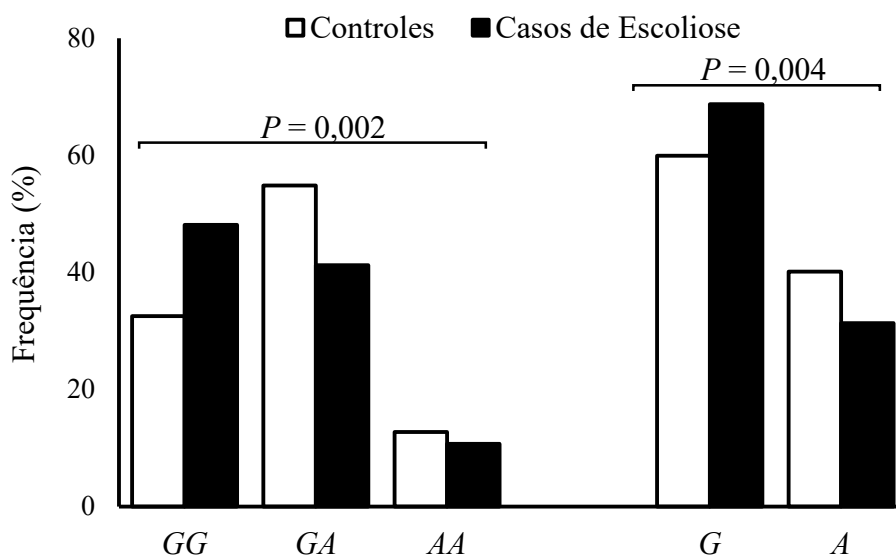
Variáveis	Controles	Casos de Escoliose
	(N = 378)	(N = 185)
	N (%)	N (%)
Idade^{a,b} (anos)		
≤ 18	23 (6,1)	115 (62,8)
19 a 28	92 (24,3)	51 (27,9)
≥ 29	263 (69,6)	17 (9,3)
Sexo		
Feminino	201 (92,7)	171 (92,4)
Masculino	177 (7,3)	14 (7,6)
IMC^c (kg/m ²)		
≤ 18,50	8 (2,1)	64 (35,2)
18,51 a 24,9	140 (37,2)	99 (54,4)
25,0 a 29,9	143 (38,0)	12 (6,6)
≥ 30	85 (22,6)	7 (3,8)

^aInformação obtida de 183 casos. ^bValores categorizados de acordo com a distribuição por quartil da população total do estudo (N=563). ^cInformação obtida de 376 controles e 182 casos.

6.3 Análise do polimorfismo do gene *FBN1*

A frequência do polimorfismo *FBN1* rs12916536 nos 563 indivíduos estudados está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A distribuição da frequência alélica e genotípica do polimorfismo está descrita na **Figura 11**. A menor frequência do alelo (*minor allele frequency* - MAF) *FBN1* rs12916536 foi, respectivamente, 31,4% e 40,1% nos casos de escoliose e nos controles. Foi observada diferença significativa na frequência dos alelos ($P = 0,004$) e dos genótipos ($P = 0,002$) do polimorfismo *FBN1* rs12916536 entre os dois grupos.

Figura 11. Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo rs12916536 no gene *FBN1* nos casos de escoliose idiopática do adolescente e nos controles.



Legenda: Número de controles = 378 e de casos com escoliose = 185. *P*-valor calculado pelo teste χ^2 ou exato de Fisher, quando necessário.

Ao avaliar a associação do polimorfismo *FBN1* rs12916536 com o desenvolvimento da escoliose idiopática do adolescente, na análise multivariada, entraram no modelo de regressão logística as variáveis que apresentaram $P \leq 0,25$ na análise univariada (idade, sexo e IMC) e prevaleceram no modelo as três variáveis, já que apresentaram um *P* valor de saída $P \leq 0,05$. Após a análise ajustada, os genótipos variantes *FBN1* rs12916536 GA+AA foram associados negativamente (fator de proteção) com o desenvolvimento da escoliose, já que o genótipo selvagem (*FBN1* rs12916536 GG) foi mais frequente nos casos de escoliose quando comparado ao grupo controle (**Tabela 5**).

Tabela 5. Análise de associação do polimorfismo do gene *FBN1* rs12916536 com a suscetibilidade da escoliose idiopática do adolescente.

<i>FBN1</i>	Controles	Casos de Escoliose	OR ajustado
rs12916536	(N = 378)	(N = 185)	(IC 95 %)
GG	123 (32,5)	89 (48,1)	1 ^a
GA	207 (54,8)	76 (41,1)	0,52 (0,30 - 0,90)
AA	48 (12,7)	20 (10,8)	0,95 (0,40 - 2,26)
GG	123 (32,5)	89 (48,1)	1 ^a
GA + AA	255 (67,5)	96 (51,9)	0.58 (0,35 - 0,98)
G	453 (59,9)	254 (68,6)	1 ^a
A	303 (40,1)	116 (31,4)	0,79 (0,54 - 1,16)

OR = razão de chances, ajustado por idade, sexo e IMC. IC = intervalo de confiança 95%. ^aGrupo de referência.

A presença do polimorfismo *FBN1* rs12916536 também foi avaliada quanto a gravidade da escoliose idiopática do adolescente, considerando o ângulo de Cobb acima e abaixo de 45°. Após análise multivariada, com o ajuste no modelo de regressão logística pelas variáveis idade, sexo e IMC, não foi observada associação do polimorfismo *FBN1* rs12916536 com os casos que apresentam ou não indicação cirúrgica para tratamento, comparando controles versus pacientes com ângulo de Cobb abaixo de 45° (**Tabela 6**) ou com pacientes com ângulo de Cobb igual ou acima de 45° (**Tabela 7**). Comparando apenas os casos de escoliose também não foi observada associação do polimorfismo *FBN1* rs12916536 com a indicação cirúrgica para tratamento da escoliose idiopática do adolescente (**Tabela 8**).

Tabela 6. Análise de associação do polimorfismo do gene *FBN1* rs12916536 com os casos de escoliose idiopática do adolescente sem indicação de tratamento cirúrgico (Cobb <45°).

<i>FBN1</i>	Controles	Escoliose com Cobb <45°	OR ajustado
rs12916536	(N = 378)	(N = 74)	(IC 95 %)
GG	123 (32,5)	37 (50,0)	1 ^a
GA	207 (54,8)	29 (39,2)	0,54 (0,22 - 1,33)
AA	48 (12,7)	8 (10,8)	2,40 (0,45 - 12,75)
GG	123 (32,5)	37 (50,0)	1 ^a
GA + AA	255 (67,5)	37 (50,0)	0,65 (0,28 - 1,55)
G	453 (59,9)	103 (69,6)	1 ^a
A	303 (40,1)	45 (30,4)	0,96 (0,51 - 1,81)

OR = razão de chances, ajustado por idade, sexo e IMC. IC = intervalo de confiança 95%. ^aGrupo de referência.

Tabela 7. Análise de associação do polimorfismo do gene *FBN1* rs12916536 com indicação de cirurgia (Cobb $\geq 45^\circ$) para o tratamento da escoliose idiopática do adolescente.

<i>FBN1</i>	Controles	Escoliose com Cobb $\geq 45^\circ$	OR ajustado
rs12916536	(N = 378)	(N = 102)	(IC 95 %)
GG	123 (32,5)	48 (47,1)	1 ^a
GA	207 (54,8)	43 (42,1)	0,68 (0,37-1,24)
AA	48 (12,7)	11 (10,8)	0,91 (0,34-2,45)
GG	123 (32,5)	48 (47,1)	1 ^a
GA + AA	255 (67,5)	54 (52,9)	0,71 (0,40-1,27)
G	453 (59,9)	139 (68,1)	1 ^a
A	303 (40,1)	65 (31,9)	0,85 (0,56-1,30)

OR = razão de chances, ajustado por idade, sexo e IMC. IC = intervalo de confiança 95%. ^aGrupo de referência.

Tabela 8. Análise de associação do polimorfismo do gene *FBN1* rs12916536 com a gravidade da escoliose idiopática do adolescente (Cobb <45° versus Cobb ≥45°).

<i>FBN1</i>	Escoliose com Cobb <45°	Escoliose com Cobb ≥45°	OR ajustado
rs12916536	(N = 74)	(N = 102)	(IC 95 %)
GG	37 (50,0)	48 (47,1)	1 ^a
GA	29 (39,2)	43 (42,1)	1,12 (0,55 - 2,26)
AA	8 (10,8)	11 (10,8)	1,28 (0,42 - 3,90)
GG	37 (50,0)	48 (47,1)	1 ^a
GA + AA	37 (50,0)	54 (52,9)	1,15 (0,60 - 2,23)
G	103 (69,6)	139 (68,1)	1 ^a
A	45 (30,4)	65 (31,9)	1,14 (0,69 - 1,88)

OR = razão de chances, ajustado por idade, sexo e IMC. IC = intervalo de confiança 95%. ^aGrupo de referência.

DISCUSSÃO

7. Discussão

Diferentes estratégias são utilizadas para o estudo de doenças complexas como a EIA, resultado da interação de múltiplos genes e fatores ambientais. A identificação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças permite a formulação de hipóteses etiológicas, ajuda a ter uma melhor compreensão da sua fisiopatologia, contribuindo para determinar o diagnóstico, o prognóstico, e até pode nortear um tratamento individualizado. Os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese e desenvolvimento da EIA tem sido estudado há muitos anos e ainda assim, a etiologia da doença permanece desconhecida (KIKANLOO *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2020). Algumas hipóteses já foram propostas e tentam explicar o surgimento da EIA, como os erros metabólicos, as alterações biomecânicas, no sistema nervoso, no crescimento ósseo e genética (BURWELL *et al.*, 2016).

Em nossa amostragem, a maioria dos pacientes (~90%) apresentou IMC normal ou baixo ($\leq 18,5$), sendo que 58% tinham escoliose com curvas medidas pelo ângulo de Cobb acima de 45° , parâmetro comumente utilizado para indicar a necessidade de tratamento cirúrgico (AGABEGI *et al.*, 2015). Nossos resultados corroboram com os achados de MIYAGI *et al.*, que demonstraram que os pacientes com curvas acima de 45° apresentaram IMC mais baixo do que aqueles com curvaturas sem indicação cirúrgica (MIYAGI *et al.*, 2020). Além disso, o baixo IMC também foi associado com pior prognóstico comparado com os pacientes que não responderam ao tratamento conservador. Assim, o baixo IMC parece ser um fator de risco independente para falha do tratamento com colete ortopédico (GOODBODY *et al.*, 2016). Juntos, estes achados sugerem que o baixo IMC pode

estar associado à patogênese da doença (CHEUNG *et al.*, 2003; RAMÍREZ *et al.*, 2013; GOODBODY *et al.*, 2016; JEON *et al.*, 2018; MIYAGI *et al.*, 2020).

A gravidade da curva escoliótica também já foi associada ao sexo feminino, a idade, ao grau de maturidade esquelética e ao ângulo de Cobb superior a 30° no momento do diagnóstico (SOUCACOS *et al.*, 2000; HORNE *et al.*, 2014; AGABEGI *et al.*, 2015). No presente estudo, no grupo de pacientes com EIA houve predomínio do sexo feminino (12:1), consistente com a literatura mundial (LENKE, 2004; KONIECZNY, SENYURT & KRAUSPE, 2013; HRESKO, 2013; BUCHAN *et al.*, 2014). As mulheres apresentam um risco de aproximadamente cinco a dez vezes comparado aos homens de evoluir com deformidade progressiva da coluna e com formas mais graves da doença (KAROL *et al.*, 1993, RAGGIO, 2006). A maior parte de nossos pacientes (74%) já havia atingido a maturidade esquelética (Risser IV-V) e apresentavam curvas com indicação de tratamento cirúrgico (Cobb $\geq 45^\circ$). Estes achados refletem o perfil demográfico dos pacientes atendidos no hospital do sistema público de saúde onde o estudo foi realizado, já que é um centro de referência em tratamento de doenças ortopédicas de alta complexidade, e muitas vezes os pacientes aguardam longos períodos de espera para serem submetidos ao tratamento cirúrgico (<https://www.into.saude.gov.br/>). O atraso na avaliação e tratamento destes pacientes frequentemente diminui as chances de sucesso do tratamento conservador, pois os mesmos já chegam com curvas graves e sem indicação de uso de coletes. No presente estudo, o aumento da idade foi associado à progressão das curvas, aproximadamente 1° do ângulo de Cobb para cada ano de vida. Além disso, a idade contribuiu 4 vezes mais do que o IMC para o aumento do ângulo de Cobb. Nossos resultados corroboram com achados anteriores que mostram progressão de curvas acima de 30° em pacientes esqueleticamente

maduros, com valores de $<1^\circ$ por ano (WEINSTEIN et al., 2003; DANIELSSON et al., 2013; AGABEGI et al., 2015). Intervir precocemente é vital porque os pacientes com curvas abaixo de 30° podem ter uma qualidade de vida semelhante a uma população saudável (WEINSTEIN et al., 2003; DANIELSSON et al., 2013). e são passíveis de tratamento com coletes, o que não era o caso da maioria de nossos pacientes.

Além das características epidemiológicas e clínicas, os fatores genéticos também estão fortemente associados ao desenvolvimento da EIA e à sua progressão (PENG et al., 2020). Variantes raras no gene *FBN1* foram identificadas em pacientes norte americanos e associados com o desenvolvimento da EIA. Esses achados foram replicados em uma coorte independente de pacientes chineses, sugerindo que variantes no gene *FBN1* podem estar associadas ao risco de progressão da doença (BUCHAN et al., 2014). Variantes no gene *FBN1* também foram associadas a características esqueléticas da síndrome de Marfan, distúrbio genético autossômico dominante, que frequentemente requer intervenção cirúrgica ortopédica (PHOKAEW et al., 2020; REYES-HERNÁNDEZ et al., 2016). As alterações nas proteínas fibrilinas podem causar alterações na regulação das vias de ativação de fatores de crescimento, como o TGF- β . Estas alterações estão relacionadas a características presentes tanto nos pacientes com EIA quanto àqueles com fibrilinoses, como as síndromes de Marfan, Loeys–Dietz e arnodactilia congênita. Essas síndromes compartilham características frequentemente encontradas em pacientes com EIA, como hiper mobilidade articular, pectus excavatum e alta estatura (TSIPOURAS et al., 1992; MILLER et al., 1996; LOEYS et al., 2001; FAIVRE et al., 2003; ARBUSTINI et al., 2005; MATT et al., 2009; GAO et al., 2011; NOWAK et al., 2014; PHOKAEW et al., 2020). O

FBN1, glicoproteína da matriz extracelular, está amplamente expresso nos elementos estruturais de microfibrilhas de tecidos elásticos e não elásticos, que podem estar alterados em doenças do tecido conjuntivo, como por exemplo a escoliose (GAO et al., 2011; REYES-HERNÁNDEZ et al., 2016).

O estudo e compreensão dos processos biológicos que levam ao desenvolvimento destas características abre novas perspectivas para o entendimento da fisiopatologia destas doenças e ainda para a possibilidade de novos tratamentos que corrijam as deficiências presentes nestes pacientes. A suscetibilidade hereditária à EIA justifica o interesse crescente em identificar polimorfismos genéticos associados ao risco aumentado de desenvolvimento da doença ou à sua progressão (PENG et al., 2020).

Um estudo *in vitro* realizado com diferentes linhagens celulares identificou o polimorfismo *FBN1* rs12916536 com um papel importante na regulação da expressão do *FBN1*, atuando em um sítio específico de regulação por histona (WARD et al., 2012). Além disso, pacientes com EIA apresentaram menor expressão de mRNA de *FBN1* e polimorfismos no gene foram associadas com aumento do risco individual de EIA (SHENG et al., 2019). Os resultados do presente estudo mostram associação negativa entre o polimorfismo *FBN1* rs12916536 G>A e o risco de desenvolvimento de EIA, uma vez que a frequência dos genótipos *FBN1* rs12916536 GA+AA foi significativamente menor no grupo de pacientes com EIA quando comparado ao grupo controle. Este resultado corrobora os achados de Sheng et al, que mostraram associação do polimorfismo *FBN1* rs12916536 com o desenvolvimento da EIA em um estudo realizado com a população chinesa, envolvendo 952 pacientes e 1499 controles. Além disso, nesse mesmo estudo o nível de expressão do gene *FBN1* foi associado com a gravidade da curva (SHENG

et al., 2019). Assim, no presente estudo também avaliamos a influência do polimorfismo *FBN1* rs12916536 com gravidade da EIA, dividindo os pacientes em dois grupos, de acordo com a indicação cirúrgica (ângulo de Cobb $<45^\circ$ e $\geq 45^\circ$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição de frequência do polimorfismo *FBN1* rs12916536 entre os grupos de pacientes com curvas conservadoras e cirúrgicas. Assim, não foi observado associação do polimorfismo *FBN1* rs12916536 com a gravidade da EIA, apenas ao desenvolvimento da doença.

O tamanho da amostra foi adequado para detectar associações significativas com 80% de poder estatístico na análise do polimorfismo *FBN1* rs12916536 com a suscetibilidade da EIA, considerando todos os pacientes. Porém ao estratificar em subgrupos, de acordo com a gravidade da doença, o tamanho amostral foi reduzido, tornando-se um fator limitante para as análises estatísticas. Acreditamos que o papel dos polimorfismos do *FBN1* no desenvolvimento da EIA ainda necessite de maiores estudos para a sua compreensão.

Este estudo foi o primeiro a estudar a influência de polimorfismos no *FBN1* em pacientes brasileiros e seus dados corroboram achados encontrados em outras populações (BUCHAN et al., 2014; SHENG et al., 2019). Sendo a EIA uma doença multifatorial, com a participação de fatores genéticos e ambientais, é essencial que se estude as possíveis associações em populações distintas, incluindo a brasileira, que se destaca por sua grande heterogeneidade e miscigenação (PENA et al., 2011). Nesse contexto, a colaboração com um consórcio internacional seria fundamental para obter informações de diferentes populações, para construção de um banco de dados que possa ser utilizado em investigações futuras para determinar os fatores associados ao desenvolvimento e à progressão da EIA.

CONCLUSÃO

8. Conclusão

O polimorfismo rs12916536 do gene FBN1 mostrou-se ser um fator protetor para o desenvolvimento da EIA em nossa população. O aumento da idade confirmou-se como fator de risco independente para a progressão das curvas da escoliose. O estudo e compreensão das variantes genéticas associadas ao desenvolvimento e à progressão da EIA pode contribuir para a determinação de prognóstico destes pacientes e ainda para a formulação de tratamentos individualizados voltados a correção dos defeitos moleculares que levam a ocorrência da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

Agabegi SS, Kazemi N, Sturm PF, Mehlman CT. Natural History of Adolescent Idiopathic Scoliosis in Skeletally Mature Patients: A Critical Review. *J Am Acad Orthop Surg*. 2015; 23(12):714-23. doi: [10.5435/JAAOS-D-14-00037](https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-14-00037).

Arbustini E, Grasso M, Ansaldi S, et al. Identification of sixty-two novel and twelve known FBN1 mutations in eighty-one unrelated probands with Marfan syndrome and other fibrillinopathies. *Hum Mutat*. 2005; 26(5):494. doi: <https://doi.org/10.1002/humu.9377>

Asher M a, Burton DC. Adolescent idiopathic scoliosis: natural history and long term treatment effects. *Scoliosis*. 2006;1(1):2.

Barrack RL, Whitecloud TS, Burke SW, Cook SD, Harding AF. Proprioception in idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1984 Oct;9(7):681–5.

Biery NJ, Eldadha ZA, Moore CS, Stetten G, Spencer F, Dierz HC. Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics*. 1999;56:70–7. doi: [10.1006/geno.1998.5697](https://doi.org/10.1006/geno.1998.5697).

Buchan JG, Alvarado DM, Haller GE, Cruchaga C, Harms MB, Zhang T, et al. Rare variants in FBN1 and FBN2 are associated with severe adolescent idiopathic scoliosis. *Hum Mol Genet*. 2014;23(19):5271–82. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu224>

Burwell RG, Clark EM, Dangerfield PH, Moulton A. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS): a multifactorial cascade concept for pathogenesis and embryonic origin. *Scoliosis Spinal Disord*. 2016;11:8. doi: <https://doi.org/10.1186/s13013-016-0063-1>

Busscher I, Wapstra FH, Veldhuizen AG. Predicting growth and curve progression in the individual patient with adolescent idiopathic scoliosis: design of a prospective longitudinal cohort study. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2010 May 17 [cited 2017 Nov 28];11:93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478013>

Cheng JC, Guo X. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A primary problem or secondary to the spinal deformity? *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 1997 Aug 1 [cited 2017 Nov 27];22(15):1716–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259781>

Cheung CSK, Lee WTK, Tse YK, Lee KM, Guo X, Qin L, et al. Generalized Osteopenia in Adolescent Idiopathic Scoliosis—Association With Abnormal Pubertal Growth, Bone Turnover, and Calcium Intake? *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2017 Nov 16];31(3):330–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449907>

Cheung CSK, Lee WTK, Tse YK, Tang SP, Lee MK, Guo X, et al. Abnormal peri-pubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 598 patients. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28:2152–7. doi: [10.1097/01.BRS.0000084265.15201.D5](https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000084265.15201.D5)

Chiru M. Adolescent Idiopathic Scoliosis and Osteopenia. *A J Clin Med*. 2011;6(1):17–22.

Cobb JR. Outline for the study of scoliosis. Edwards J, editor. *Outl study scoliosis*. 1948;261–75.

Craig Venter J, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science (80-)* [Internet]. 2001 [cited 2020 Sep

1];291(5507):1304–51.

Available

from:

www.sciencemag.org/cgi/content/full/291/

Czaprowski D. Generalised joint hypermobility in caucasian girls with idiopathic scoliosis: relation with age, curve size, and curve pattern. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2014 [cited 2020 Sep 12];2014:370134. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550704>

Danielsson AJ. Natural history of adolescent idiopathic scoliosis: a tool for guidance in decision of surgery of curves above 50°. *J Child Orthop* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Nov 28];7(1):37–41. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24432057>

Dobbs MB. Effects of Bracing in Adolescents with Idiopathic Scoliosis. 2013;1512–21.

Eun I-S, Weon A, Park W, Kuen A, Suh T, Jeung A, et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphism and bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. [cited 2017 May 16]; Available from:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2899432/pdf/586_2009_Article_1145.pdf

Faivre L, Gorlin RJ, Wirtz MK, et al. In frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal dominant Weill-Marchesani syndrome. *J Med Genet* 2003; 40(1):34-6. doi:[https://doi.org/ 10.1136/jmg.40.1.34](https://doi.org/10.1136/jmg.40.1.34)

Frost BA, Camarero-Espinosa S, Foster EJ. *Materials for the Spine: Anatomy, Problems, and Solutions*. Mater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2019 Jan 14 [cited 2020 Sep 10];12(2). Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30646556>

Gao LG, Yao XP, Zhang L, Hui RT, Zhou XL. Molecular analysis for diagnosis of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124:930–4.

Garland HG. Hereditary scoliosis. *Br Med J* [Internet]. 1934 [cited 2020 Jul 18];1(3816):328. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2444298/pdf/brmedj07141-0010.pdf>

Giampietro PF. SNPping away at the genetic basis of adolescent idiopathic scoliosis. *Ann Transl Med*. 2015;3:3–6.

Goes RA, Lopes LR, Cossich VRA, de Miranda VAR, Coelho ON, do Carmo Bastos R, Domenis LAM, Guimarães JAM, Grangeiro-Neto JA, Perini JA. Musculoskeletal injuries in athletes from five modalities: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020 Feb 24;21(1):122. doi: 10.1186/s12891-020-3141-8.

Goodbody CM, Asztalos IB, Sankar WN, Flynn JM. It's not just the big kids: both high and low BMI impact bracing success for adolescent idiopathic scoliosis. *J Child Orthop*. 2016; 10(5):395-404. doi: [10.1007/s11832-016-0763-3](https://doi.org/10.1007/s11832-016-0763-3)

Grauers A, Einarsdottir E, Gerdhem P. Genetics and pathogenesis of idiopathic scoliosis [Internet]. Vol. 11, *Scoliosis and Spinal Disorders*. 2016 [cited 2018 Nov 5]. Available from:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5125035/pdf/13013_2016_Article_105.pdf

Grauers A, Rahman I, Gerdhem P. Heritability of scoliosis. *Eur Spine J*. 2012;21(6):1069–74.

Grivas TB, Burwell RG, Mihas C, Vasiliadis ES, Triantafyllopoulos G, Kaspiris A. Relatively lower body mass index is associated with an excess of severe truncal asymmetry in healthy adolescents: Do white adipose tissue, leptin, hypothalamus and sympathetic nervous system influence truncal growth asymmetry? *Scoliosis* [Internet]. 2009 Jun 30 [cited 2020 Aug 12];4:13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19566930>

Herdea A, Charkaoui A, Ulici A. Prevalence of 25-OH-Vitamin D and Calcium Deficiency in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *J Med Life* [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 30];13(2):260–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32728404>

Hershkovich O, Friedlander A, Gordon B, Arzi H, Derazne E, Tzur D, et al. Association between body mass index, body height, and the prevalence of spinal deformities. *Spine J* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2020 Sep 12];14(8):1581–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332597>

Helenius I, Mattila M, Jalanko T. Morbidity and radiographic outcomes of severe scoliosis of 90° or more: a comparison of hybrid with total pedicle screw instrumentation. *J Child Orthop*. 2014;8(4):345-352. doi:10.1007/s11832-014-0604-1.

Horne JP, Flannery R, Usman S. Adolescent idiopathic scoliosis: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2014; 89(3):193-8.

International HapMap Consortium TIH, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 18 [cited 2020 Sep 10];449(7164):851–61 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943122>

Ishida K, Aota Y, Mitsugi N, Kono M, Higashi T, Kawai T, et al. Relationship between bone density and bone metabolism in adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis Spinal Disord* [Internet]. 2016;(2015):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13013-015-0043-x>

James J. IDIOPATHIC SCOLIOSIS. *J BONE Jt Surg* [Internet]. 1954 [cited 2017 May 16];36 B No. 1:35–49. Available from: <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/jbjsbr/36-B/1/36.full.pdf>

Jada A, Mackel CE, Hwang SW, Samdani AF, Stephen JH, Bennett JT, Baaj AA. Evaluation and management of adolescent idiopathic scoliosis: a review. *Neurosurg Focus*. 2017 Oct;43(4):E2. doi: 10.3171/2017.7.FOCUS17297. PMID: 28965447.

JE L. Scoliosis: surgical versus nonsurgical treatment. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2006 [cited 2020 Jul 18];443. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16462448/>

Jeon K, Kim DI. The Association between Low Body Weight and Scoliosis among Korean Elementary School Students. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(12):2613. doi: [10.3390/ijerph15122613](https://doi.org/10.3390/ijerph15122613).

Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics [Internet]. Vol. 8, *BMC Medical Genomics*. 2015 [cited 2020 Aug 23]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4502642/pdf/12920_2015_Article_115.pdf

Kesling KL, Reinker KA. Scoliosis in twins: A meta-analysis of the literature and report of six cases. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 1997 Sep [cited 2020 Jul 18];22(17):2009–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9306532/>

Khanshour AM, Kou I, Fan Y, Einarsdottir E, Makki N, Kidane YH, Kere J, Grauers A, Johnson TA, Paria N, Patel C, Singhania R, Kamiya N, Takeda K, Otomo N, Watanabe K, Luk KDK, Cheung KMC, Herring JA, Rios JJ, Ahituv N, Gerdhem P, Gurnett CA, Song YQ, Ikegawa S, Wise CA. Genome-wide meta-analysis and replication studies in multiple ethnicities identify novel adolescent idiopathic scoliosis susceptibility loci. *Hum Mol Genet.* 2018;27(22):3986-3998.

doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx045>

Kikanloo SR, Tarpada SP, Cho W. Etiology of Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Literature Review. *Asian Spine J* [Internet]. 2019 Jun [cited 2019 Nov 3];13(3):519–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30744305>

Konieczny MR, Senyurt H, Krauspe R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J Child Orthop.* 2013;7(1):3-9. doi:10.1007/s11832-012-0457-4

Kou I, Otomo N, Takeda K, Momozawa Y, Lu HF, Kubo M, Kamatani Y, Ogura Y, Takahashi Y, Nakajima M, Minami S, Uno K, Kawakami N, Ito M, Yonezawa I, Watanabe K, Kaito T, Yanagida H, Taneichi H, Harimaya K, Taniguchi Y, Shigematsu H, Iida T, Demura S, Sugawara R, Fujita N, Yagi M, Okada E, Hosogane N, Kono K, Nakamura M, Chiba K, Kotani T, Sakuma T, Akazawa T, Suzuki T, Nishida K, Kakutani K, Tsuji T, Sudo H, Iwata A, Sato T, Inami S, Matsumoto M, Terao C, Watanabe K, Ikegawa S. Genome-wide association study identifies 14 previously unreported susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Japanese. *Nat Commun.* 2019;10(1):3685. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11596-w>

Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, et al. Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet.* 2013;

Kuroki H. Brace Treatment for Adolescent Idiopathic Scoliosis. *J Clin Med* [Internet]. 2018 [cited 2020 Aug 30];7(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6024899/>

Kouwenhoven JW, Castelein RM. The pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: review of the literature. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008; 33(26):2898-908. doi: <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181891751>

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. 2001 Feb 15 [cited 2020 Sep 12];409(6822):860–921. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011>

Lenke L. *Idiopathic scoliosis*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2004.

Loeys B, Nuytinck L, Delvaux, I, et al. Genotype and phenotype analysis of 171 patients referred for molecular study of the fibrillin-1 gene FBN1 because of suspected Marfan syndrome. *Arch Intern Med*. 2001; 161(20):2447-54. doi: <https://doi.org/10.1001/archinte.161.20.2447>

Lonstein JE, Carlson JM. The prediction of curve progression in untreated idiopathic scoliosis during growth. *J Bone Jt Surg - Ser A* [Internet]. 1984 Sep [cited 2017 May 5];66(7):1061–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6480635>

Lopes LR, de Miranda VAR, Guimarães JAM, et al. Association of TNF- α -308G > A polymorphism with susceptibility to tendinopathy in athletes: a case–control study. *BMC Sports Sci Med Rehabil*. 2021; 13(1):51. doi: <https://doi.org/10.1186/s13102-021-00276-2>.

Mak T, Cheung PWH, Zhang T, Cheung JPY. Patterns of coronal and sagittal deformities in adolescent idiopathic scoliosis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2021;22(1):44. doi: [10.1186/s12891-020-03937-4](https://doi.org/10.1186/s12891-020-03937-4).

Mao S-H, Jiang J, Sun X, Zhao Q, Qian B-P, Liu Z, et al. Timing of menarche in Chinese girls with and without adolescent idiopathic scoliosis: current results and review of the literature. *Eur Spine J* [Internet]. 2011 Feb [cited 2020 Aug 12];20(2):260–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153847>

Matt P, Schoenhoff F, Habashi J, et al. Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Circulation* 2009;120:526–32. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841981](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841981).

Miller NH, Mims A, Child DM, Milewicz SH, Sponseller P, Blanton SH. Genetic Analysis of Structural Elastic Fiber and Collagen Genes in Familial Adolescent Idiopathic Scoliosis. *J Orthop Res*. 1996;14(6):994-9. doi: <https://doi.org/10.1002/jor.1100140621>

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

Moreau A, Wang DS, Forget S, Azeddine B, Angeloni D, Fraschini F, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2004 Aug 15 [cited 2016 Sep 12];29(16):1772–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15303021>

Nowak R, Kwiecien M, Tkacz M, Mazurek U. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling in paravertebral muscles in juvenile and adolescent

idiopathic scoliosis. Biomed Res Int 2014;2014:594287. doi:
[10.1155/2014/594287](https://doi.org/10.1155/2014/594287).

Ogura Y, Kou I; Japan Scoliosis Clinical Research Group, Scoliosis J, Matsumoto M, Watanabe K, Ikegawa S. Genome-wide association study for adolescent idiopathic scoliosis. Clin Calcium. 2016;26(4):553-60.

Ogura Y, Kou I, Miura S, Takahashi A, Xu L, Takeda K, et al. A functional SNP in BNC2 is associated with adolescent idiopathic scoliosis. Am J Hum Genet. 2015; 97(2):337-42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.012>

Ogura Y, Takahashi Y, Kou I, Nakajima M, Kono K, Kawakami N, et al. A replication study for association of 53 single nucleotide polymorphisms in a scoliosis prognostic test with progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese. Spine (Phila Pa 1976). 2013 Jul;38(16):1375–9.

Oxford JT, Reeck JC, Hardy MJ. Extracellular Matrix in Development and Disease. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2021 Oct 16];20(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30626024>

Pehrsson K, Bake B, Larsson S, Nachemson A. Lung function in adult idiopathic scoliosis: a 20 year follow up. Thorax [Internet]. 1991a [cited 2017 May 5];46:474–8. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC463231/pdf/thorax00355-0006.pdf>

Pehrsson K, Bake B, Larsson S, Nachemson A. Lung function in adult idiopathic scoliosis: a 20 year follow up [Internet]. Vol. 46, Thorax. 1991b. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC463231/pdf/thorax00355-0006.pdf>

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. PLoS One. 2011; 6(2):e17063. doi:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>

Peng Y, Wang SR, Qiu GX, Zhang JG, Zhuang QY. Research progress on the etiology and pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. Chin Med J (Engl). 2020; 133(4):483-493. doi: [10.1097/CM9.0000000000000652](https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000652).

Phokaew, Rekwan Sittiwangkul 2, Kanya Suphapeetiporn 3, Vorasuk Shotelersuk. Double heterozygous variants in FBN1 and FBN2 in a Thai woman with Marfan and Beals syndromes. Eur J Med Genet. 2020;63(9):103982. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103982>.

Porter RW. The pathogenesis of idiopathic scoliosis: uncoupled neuro-osseous growth? Eur Spine J [Internet]. 2001 Dec [cited 2016 Sep 12];10(6):473–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806387>

Ramírez M, Martínez-Llorens J, Sanchez JF, Bagó J, Molina A, Gea J, Cáceres E. Body composition in adolescent idiopathic scoliosis. Eur Spine J. 2013;22(2):324-9. doi: [10.1007/s00586-012-2465-y](https://doi.org/10.1007/s00586-012-2465-y)

Reyes-Hernández OD, Palacios-Reyes C, Chávez-Ocaña S, Cortés-Malagón EM, Alonso-Themann PG, Ramos-Cano V, Ramírez-Bello J, Sierra-Martínez M. Skeletal manifestations of Marfan syndrome associated to heterozygous R2726W FBN1 variant: sibling case report and literature review. BMC Musculoskelet Disord. 2016; 15;17:79. doi: [10.1186/s12891-016-0935-9](https://doi.org/10.1186/s12891-016-0935-9).

Riseborough EJ, Wynne-Davies R. A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts. *J Bone Joint Surg Am*. 1973 Jul;55(5):974–82.

Risser JC. The classic: The iliac apophysis: an invaluable sign in the management of scoliosis. 1958. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(3):643-53. doi: <https://doi.org/10.1007/s11999-009-1096-z>

Roussouly P, Nnadi C. Sagittal plane deformity: an overview of interpretation and management. *Eur Spine J* [Internet]. 2010 Nov 22 [cited 2017 Dec 8];19(11):1824–36. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2989270/pdf/586_2010_Article_1476.pdf

Schaid DJ, Chen W, Larson NB. From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2018 [cited 2020 Sep 13];19(8):491–504. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29844615>

Schrenk S, Cenzi C, Bertalot T, Conconi MT, Di Liddo R. Structural and functional failure of fibrillin-1 in human diseases (Review). *Int J Mol Med*. 2018 Mar;41(3):1213-1223. doi: 10.3892/ijmm.2017.3343. Epub 2017 Dec 22. PMID: 29286095.

Sharma S, Gao X, Londono D, Devroy SE, Mauldin KN, Frankel JT, Brandon JM, Zhang D, Li QZ, Dobbs MB. et al. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum. Mol. Genet*. 2011; 20(7):1456-66. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq571>

Sharma S, Londono D, Eckalbar WL, Gao X, Zhang D, Mauldin K, et al. A PAX1 enhancer locus is associated with susceptibility to idiopathic scoliosis in females. *Nat Commun*. 2015; 6:6452. doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms7452>

Sheng F, Xia C, Xu L, Qin X, Tang NLS, Qiu Y, et al. New Evidence Supporting the Role of FBN1 in the Development of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2019;44(4):E225–32.

SL W. Idiopathic scoliosis. Natural history. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 1986 [cited 2020 Jul 18];11(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3810292/>

Smit TH. Adolescent idiopathic scoliosis: The mechanobiology of differential growth. *JOR Spine*. 2020 Jul 24;3(4):e1115. doi: 10.1002/jsp2.1115. PMID: 33392452; PMCID: PMC7770204.

Soucacos PN, Zacharis K, Gelalis J, Soultanis K, Kalos N, Beris A, et al. Assessment of curve progression in idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* [Internet]. 1998 Aug 27 [cited 2020 Apr 25];7(4):270–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s005860050074>

Soucacos PN, Zacharis K, Soultanis K, Gelalis J, Xenakis T, Beris AE. Risk factors for idiopathic scoliosis: Review of a 6-year prospective study. *Orthopedics* 2000; 23(8):833-8.

Stokes IA, Burwell G, Dangerfield PH. Scoliosis Biomechanical spinal growth modulation and progressive adolescent scoliosis – a test of the “vicious cycle” pathogenetic hypothesis: Summary of an electronic focus group debate of the IBSE. [cited 2017 Sep 28]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1626075/pdf/1748-7161-1-16.pdf>

Stokes IAF, Spence H, Aronsson DD, Kilmer N. Mechanical Modulation of Vertebral Body Growth. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 1996

May;21(10):1162–7. Available from: <http://journals.lww.com/00007632-199605150-00007>

Suarez-Kurtz G, Genro JP, de Moraes MO, Ojopi EB, Pena SD, Perini JA, Ribeiro-dos-Santos A, Romano-Silva MA, Santana I, Struchiner CJ. Global pharmacogenomics: Impact of population diversity on the distribution of polymorphisms in the CYP2C cluster among Brazilians. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(3):267-76. doi: <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.89>

Takahashi Y, Kou I, Takahashi A, Johnson TA, Kono K, Kawakami N, et al. A genome-wide association study identifies common variants near LBX1 associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet*. 2011;

Tan K-J, Moe MM, Vaithinathan R, Wong H-K. Curve Progression in Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2009 Apr;34(7):697–700. Available from: <http://journals.lww.com/00007632-200904010-00011>

Tang NLS, Yeung H-Y, Hung VWY, Di Liao C, Lam T-P, Yeung H-M, et al. Genetic epidemiology and heritability of AIS: A study of 415 Chinese female patients. *J Orthop Res* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2020 Sep 18];30(9):1464–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.22090>

Théroux J, Le May S, Fortin C, Labelle H. Prevalence and management of back pain in adolescent idiopathic scoliosis patients: A retrospective study. *Pain Res Manag* [Internet]. 2015 [cited 2020 Aug 24];20(3):153–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25831076>

Tsipouras P, Del Mastro R, Sarfarazi M, Lee B, Vitale E, Child AH, Godfrey M, Devereux RB, Hewett D, Steinmann B, Viljoen D, Sykes BC, Kilpatrick M, Ramirez F, the International Marfan Syndrome Collaborative Study: Genetic linkage of the Marfan syndrome, ectopia lentis, and congenital contractur

arachnodactyly to the fibrillin genes on chromosomes 15 and 5. *N Engl J Med*. 1992; 326(14):905-9. doi: [https://doi.org/ 10.1056/NEJM199204023261401](https://doi.org/10.1056/NEJM199204023261401)

Veldhuizen a G, Wever DJ, Webb PJ. The aetiology of idiopathic scoliosis: biomechanical and neuromuscular factors. *Eur Spine J* [Internet]. 2000 [cited 2017 Oct 3];9(3):178–84. Available from: http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC3611388/pdf/586_2000_Article_90178.586.pdf

Wang J, Zhou Y, Zhang Z, Li C, Zheng W, Zhang Y. Minimally invasive anterior transarticular screw fixation and microendoscopic bone graft for atlantoaxial instability. *Eur Spine J*. 2012;21(8):1568–74.

Ward K, Ogilvie J, Argyle V, Nelson L, Meade M, Braun J, et al. Polygenic inheritance of adolescent idiopathic scoliosis: A study of extended families in Utah. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2010a [cited 2020 Jul 18];152(5):1178–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20425822/>

Ward K, Ogilvie JW, Singleton M V., Chettier R, Engler G, Nelson LM. Validation of DNA-based prognostic testing to predict spinal curve progression in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010b;35(25):1455–64.

Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D930–4. doi: [10.1093/nar/gkr917](https://doi.org/10.1093/nar/gkr917).

Weinstein SL, Dolan LA, Cheng JC, Danielsson A, Morcuende JA. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet* [Internet]. 2008 May 3 [cited 2018 Nov 6];371(9623):1527–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18456103>

Weinstein SL, Dolan LA, Spratt KF, Peterson KK, Spoonamore MJ, Ponseti IV. Health and function of patients with untreated idiopathic scoliosis: a 50-year natural history study. *JAMA*. 2003; 289:559–67. doi [10.1001/jama.289.5.559](https://doi.org/10.1001/jama.289.5.559)

Weinstein SL, Ponseti I V. Curve progression in idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1983 Apr [cited 2017 Sep 28];65(4):447–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6833318>

Winter RB, Lonstein JE, Bradford DS, Ogilvie JW. *Moe's Textbook of Scoliosis and Other Spinal Deformities*. 3rd ed. Saunders; 1995.

Wise CA, Sepich D, Ushiki A, Khanshour AM, Kidane YH, Makki N, et al. The cartilage matrisome in adolescent idiopathic scoliosis. *Bone Res* [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 9];8:13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32195011>

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

Wu KW, Lu TW, Lee WC, Ho YT, Wang JH, Kuo KN, Wang TM. Whole body balance control in Lenke 1 thoracic adolescent idiopathic scoliosis during level walking. *PLoS One*. 2020 Mar 6;15(3):e0229775. doi: [10.1371/journal.pone.0229775](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229775). PMID: 32142524; PMCID: PMC7059927.

Xu L, Wu Z, Xia C, Tang N, Cheng JCY, Qiu Y, et al. A Genetic Predictive Model Estimating the Risk of Developing Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Curr Genomics* [Internet]. 2019 May [cited 2020 Sep 22];20(4):246–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32030084>

Yip BHK, Yu FWP, Wang Z, Hung VWY, Lam TP, Ng BKW, et al. Prognostic Value of Bone Mineral Density on Curve Progression: A Longitudinal Cohort Study of 513 Girls with Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Sci Rep*. 2016;6.

Zaydman AM, Strokova EL, Pahomova NY, Gusev AF, Mikhaylovskiy MV, Shevchenko AI, Zaidman MN, Shilo AR, Subbotin VM. Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: Review of the literature and new epigenetic hypothesis on altered neural crest cells migration in early embryogenesis as the key event. *Med Hypotheses* . 2021;151:110585. doi: [10.1016/j.mehy.2021.110585](https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110585).

Zhao D, Qiu G xing, Wang Y peng, Zhang J guo, Shen J xiong, Wu Z hong. Association between adolescent idiopathic scoliosis with double curve and polymorphisms of calmodulin1 gene/estrogen receptor- α gene. *Orthop Surg* [Internet]. 2009 Aug [cited 2019 Nov 26];1(3):222–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009847>

Zhao L, Roffey DM, Chen S. Genetics of adolescent idiopathic scoliosis in the post-genome-wide association study era. *Ann Transl Med*. 2015;3(Suppl 1):S35. doi: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.54>.

Zhu Z, Tang NL, Xu L, Qin X, Mao S, Song Y, Liu L, Li F, Liu P, Yi L, Chang J, Jiang L, Ng BK, Shi B, Zhang W, Qiao J, Sun X, Qiu X, Wang Z, Wang F, Xie D, Chen L, Chen Z, Jin M, Han X, Hu Z, Zhang Z, Liu Z, Zhu F, Qian BP, Yu Y, Wang B, Lee KM, Lee WYW, Lam TP, Qiu Y, Cheng JC. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Chinese girls. *Nat Commun*. 2015;6:8355. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms9355>

Zhu Z, Xu L, Leung-Sang Tang N, Qin X, Feng Z, Sun W, Zhu W, Shi B, Liu P, Mao S, Qiao J, Liu Z, Sun X, Li F, Chun-Yiu Cheng J, Qiu Y. Genome-wide association study identifies novel susceptible loci and highlights Wnt/beta-catenin

pathway in the development of adolescent idiopathic scoliosis. Hum Mol Genet.
2017;26(8):1577-1583. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx045>

ANEXOS

ANEXO I. Termo de compromisso livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Estudo da susceptibilidade genética à escoliose idiopática em brasileiros”. Você foi selecionado por apresentar escoliose idiopática na coluna, uma doença caracterizada pela presença de uma curva acentuada na coluna, ou por não possuir alteração da coluna e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com o Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia.

Os objetivos deste estudo são verificar se há uma predisposição à escoliose idiopática em brasileiros, procurando entender como essa doença se desenvolve.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em fazer um bochecho e doar saliva, sem contato direto com a mucosa (bochecha ou gengiva). Nesta saliva estarão algumas células que serão utilizadas para identificar sua característica genética. Caso você tenha escoliose com indicação de tratamento cirúrgico ou não tenha alteração na coluna, mas tenha indicação de cirurgia óssea no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, solicitamos autorização para coleta e armazenamento do material a ser descartado na sua cirurgia. Os riscos relacionados com sua participação não existem, pois não haverá influência sobre o seu tratamento.

Os benefícios relacionados com a sua participação é um maior conhecimento da escoliose idiopática na população brasileira.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados da pesquisa serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação. Todas as coletas serão numeradas e o seu nome não constará em qualquer tubo de armazenamento do material coletado.

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

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____

Pesquisador responsável: Maria Eugenia Leite Duarte

Contato com o pesquisador responsável:

Endereço: Avenida Brasil 500 – São Cristóvão – Divisão de Pesquisa - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

Telefone: 2134-5000

e-mail: mel@into.saude.gov.br

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO II. Aprovação do Comitê de Ética institucional.

INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATO - ORTOPEDIA /
INTO / SAS/ MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da susceptibilidade genética à escoliose idiopática em brasileiros

Pesquisador: Maria Eugênia Leite Duarte

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 30684114.0.0000.5273

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: 637.973

Data da Relatoria: 07/05/2014

Apresentação do Projeto:

A apresentação está adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão definidos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A descrição dos riscos e benefícios estão definidos no projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante para o nosso meio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

os termos de apresentação obrigatória foram adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

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
TRAUMATO - ORTOPEDIA /
INTO / SAS/ MS



Continuação do Parecer: 637.973

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 07 de Maio de 2014

Assinador 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:** oep.into@into.saude.gov.br

Página 02 de 02

ANEXO III. Instrumento de coleta de dados.

ID: OSE-0 _____

Material Biológico () Swab () Sangue

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

Centro Coleta: () INTO () _____

Nome: _____

Prontuário: _____ Sexo: ()feminino ()masculino

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

Idade: ____ anos e ____ meses

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

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

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

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

Nash Moe: Ápice torácico: _____ Ápice lombar : _____

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

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

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

Classificação final: _____

LSTV : _____ LTV: _____

Vértebra Sagital Estável : _____

ANEXO IV. Manuscrito submetido na revista *BMC Musculoskeletal Disorders*.

Gmail - BMC Musculoskeletal Disorders - Receipt of Manuscript 'Association of FBN1...'

03/11/2021 12:11



Gustavo Azevedo <gbla1983@gmail.com>

BMC Musculoskeletal Disorders - Receipt of Manuscript 'Association of FBN1...'

1 mensagem

BMC Musculoskeletal Disorders <bmcmusculoskeletaldisorders@biomedcentral.com> 22 de outubro de 2021 14:51
Para: gbla1983@gmail.com

Ref: Submission ID 793c89b1-2637-47da-bc5b-d4575780e0c0

Dear Dr Azevedo,

Please note that you are listed as a co-author on the manuscript "Association of FBN1 polymorphism with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study", which was submitted to BMC Musculoskeletal Disorders on 22 October 2021 UTC.

If you have any queries related to this manuscript please contact the corresponding author, who is solely responsible for communicating with the journal.

Kind regards,

Peer Review Advisors
BMC Musculoskeletal Disorders

Association of *FBN1* polymorphism with susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study

Short Title: *FBN1* polymorphisms and idiopathic scoliosis.

Gustavo Borges Laurindo de Azevedo^{1,2}, Jamila Alessandra Perini^{3,4*}, Antônio Eulálio Pedrosa Araújo Junior^{1,2}, Luis Antonio Medeiros Moliterno^{1,2}, Rodrigo Mantelatto Andrade³, João Antonio Matheus Guimarães³, Helton Luiz Aparecido Defino².

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

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

³Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Divisão de Pesquisa, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

⁴Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding Author: Jamila Alessandra Perini, Research Division, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia. Avenida Brasil, 500 zip code 20940-070, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail address: jamilaperini@yahoo.com.br / japerini@into.saude.gov.br

Abstract

Background: Fibrillin-1 (FBN1) is an extracellular matrix glycoprotein essential to the structural component of microfibrils and *FBN1* gene polymorphisms can be associated with adolescent idiopathic scoliosis (AIS) susceptibility. This study aimed to evaluate the potential role of the *FBN1* rs12916536 polymorphism in AIS development or severity and the variation in Cobb angle in relation to patient's characteristics.

Methods: DNA from 563 subjects (185 AIS patients and 378 controls) were genotyped using a validated TaqMan allelic discrimination assay. A multivariate logistic regression model evaluated the association between polymorphism and AIS, using the adjusted odds ratios (OR) with their respective 95% confidence intervals (95% CI). A linear regression analysis evaluated the variation in Cobb angle according to the patient's age and body mass index (BMI).

Results: Among the AIS group there was a predominance of females (12:1), low or normal BMI (90%), 58% had a Cobb angle greater than 45° and 74% were skeletally mature. Age was a risk factor (4-fold) for curve progression (0.72° per year) higher than BMI ($P < 0.001$). The allelic frequency of the rs12916536 G>A polymorphism was 40% in controls and 31% in AIS cases; and this difference was statistically significant ($P = 0.004$). *FBN1* rs12916536 GA+AA genotypes were associated with a lower risk of AIS susceptibility (OR = 0.58 and 95% CI = 0.35-0.98), after adjustment for age, sex and BMI. However, no significant differences were detected in polymorphism distribution with the severity of the disease (Cobb <45° or ≥45°).

Conclusion: Age was a risk factor for progression of the scoliotic curve and *FBN1* rs12916536 polymorphism a protective factor for AIS susceptibility.

Keywords: Adolescent idiopathic scoliosis, Fibrillin-1, Polymorphism.

Introduction

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS), a three-dimensional deformity of the spine, typically becomes evident near the onset of puberty, with no apparent cause and prevalence around 3% [1]. Most patients have non-progressive deformity, and factors associated with curve progression and disease development are not fully understood. Thus, several distinct pathogenesis theories have been proposed for AIS development, including biomechanical, neurological, hormonal, growth-related and genetic [2-5].

Genome-wide association studies (GWAS) have identified variants in genes related to muscle, cartilage, bone, intervertebral discs, and connective tissue development that appear to be associated with AIS susceptibility [6-17]. However, the molecular

genetic origin of AIS development remains unknown. GWAS of rare variants using exome sequence analysis identified fibrillin-1 (*FBN1*) as a susceptible gene of AIS [9]. In addition, common variants of *FBN1* were significantly associated with AIS development in Chinese [18].

The *FBN1* gene, localized at chromosome 15q21.1, comprising around 200 kb and containing 65 exons [19], codes for an extracellular matrix glycoprotein crucial to extracellular microfibrils organization in skeletal muscle cells and dermal fibroblasts. Spinal stability needs the biomechanical properties of the ligaments, discs and connective-tissue components [20, 21]. Several inherited connective tissue disorders (e.g., syndromes: Marfan, Ehlers-Danlos, Beals and Weill-Marchesani and osteogenesis imperfecta) that show clinical features of structural scoliosis were associated with rare mutations in *FBN1* [20-25]. As far as we know, no studies have investigated the association between common genetic variants of *FBN1* and AIS in Brazilians. This population is extraordinarily heterogenic and extrapolation of genetic data from well-defined ethnic groups may not be applicable to most Brazilians [26-28].

Therefore, due to the relationship between genetic variants in connective-tissue genes and scoliosis, this study was designed to investigate the association between the *FBN1* rs12916536 polymorphism and the susceptibility of AIS in Brazilians, as well as its influence on the severity of the disease. In addition, was evaluate the variation in Cobb angle in dependence to the patient's age and BMI.

Materials and Methods

Study population

The current study comprises a retrospective case-control evaluation of 563 subjects (185 AIS patients and 378 controls) from a reference center in Orthopedics. The study protocol was approved by the Human Research Ethics Committees of the *Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad* – INTO (protocol numbers 637.973 and 2.767.503), and all subjects provided written informed consent. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration. All sociodemographic and clinical data were obtained during the recruitment process between 2018 and 2020. The body mass index (BMI) was calculated as the weight status (kg) divided by the square of height (m²) and the weight status is classified into five groups: underweight (BMI < 18.5), normal weight (18.5 ≤ BMI ≤ 24.9), overweight (25 ≤ BMI ≤ 29.9), obesity (30 ≤ BMI < 40) and morbid obesity (BMI ≥ 40).

All patients had idiopathic scoliosis diagnosed by clinical and radiographic examination with the spinal curve Cobb angle measuring ≥10°. Posteroanterior radiographs were used to measure the major curve angles employing the Cobb method [29]. AIS cases were separated into two groups: Cobb <45° and Cobb ≥45° according to the magnitude of the Cobb angle. The Risser sign was used to estimate skeletal maturity and is a predictor of scoliosis progression [30]. The skeletal maturity was assessed by evaluating ossification of the iliac apophysis and patients with a Risser's sign of zero to 3 were classified as skeletally immature and those with a Risser's sign of 4 or 5 were classified as skeletally mature. All measurements were independently made by two investigators (GBLA and AEPAJ or LAMM) who are experienced spine surgeons and blinded to the clinical information to avoid bias.

The control group (N = 378) consisted of healthy volunteers recruited at INTO's blood bank when they appeared to donate blood. An orthopedic spine surgeon evaluated them to rule out any spine deformity.

Polymorphisms genotyping

Genomic DNA was obtained from oral mucosa collected by swab or from peripheral blood samples using an extraction kit (Qiagen) following the procedures recommended by the manufacturer. The genotyping analyses of *FBN1* rs12916536 polymorphism (chr15:48414374) were performed using a *TaqMan* allelic discrimination assay (C__31343379_20) by 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR amplification was performed in 8 μ L reactions with 30 ng of template DNA, 1x TaqMan Universal Master Mix, 1x each primer and probe assay. Thermal cycling was initiated with a first denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. To assure genotyping quality, in each reaction, two standardized negative and positive controls of each polymorphism genotype were used, as previously described [28].

Statistical analysis

A sample size calculation was performed using Epi Info 7, version 7.2.4.0 (<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>) capable of detecting differences between cases and controls, assuming an odds ratio of 0.5 with a power of 0.8 and 5% type I error.

A descriptive study of the population was conducted, presenting relative frequencies for each categorical variable. The categorical data were expressed as

percentages and evaluated by the Chi-square (χ^2) test or Fisher's exact test, when applicable. A linear regression analysis was performed using Cobb angle and age or BMI to evaluate the variation in Cobb angle in relation to the patient's age and BMI.

Genotypic frequency of *FBN1* polymorphism was derived by direct gene counting, and the adherence to the Hardy–Weinberg principle was evaluated by the Chi-square test for goodness-of-fit. The magnitude of association from each comparison was estimated by calculating crude odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CIs). As a final regression model used to control possible confounding factors (sociodemographic and clinical features), each variable was introduced considering the biological and statistical significance of the univariate analysis, which an input significance level less than 0.25 ($P \leq 0.25$) and output significance was 0.05 ($P \leq 0.05$) at the regression model, as previously described [28, 31]. The difference was statistically significant when $P < 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, version 20.0).

Results

Table 1 presents the main sociodemographic and clinical characteristics of the AIS case population. The mean age and BMI (and ranges) were 18.6 ± 6.7 (10-48) years and 20.4 ± 4.0 (14.0-39.9) kg/m^2 , respectively. There was a predominance (89.6%) of low or normal BMI values (≤ 24.9) among the AIS patients group and the ratio of female to male patients affected by the disease was 12.2:1. Of the 185 AIS patients, 129 (73.7%) were classified as skeletally mature, according to the Risser

grade. The mean major spinal curve magnitude was 47.7 ± 16.3 (11-110) degrees and 58% (N = 102) had curves greater than 45° .

TABLE 3 Demographics and clinical characteristics of 185 patients with adolescent idiopathic scoliosis.

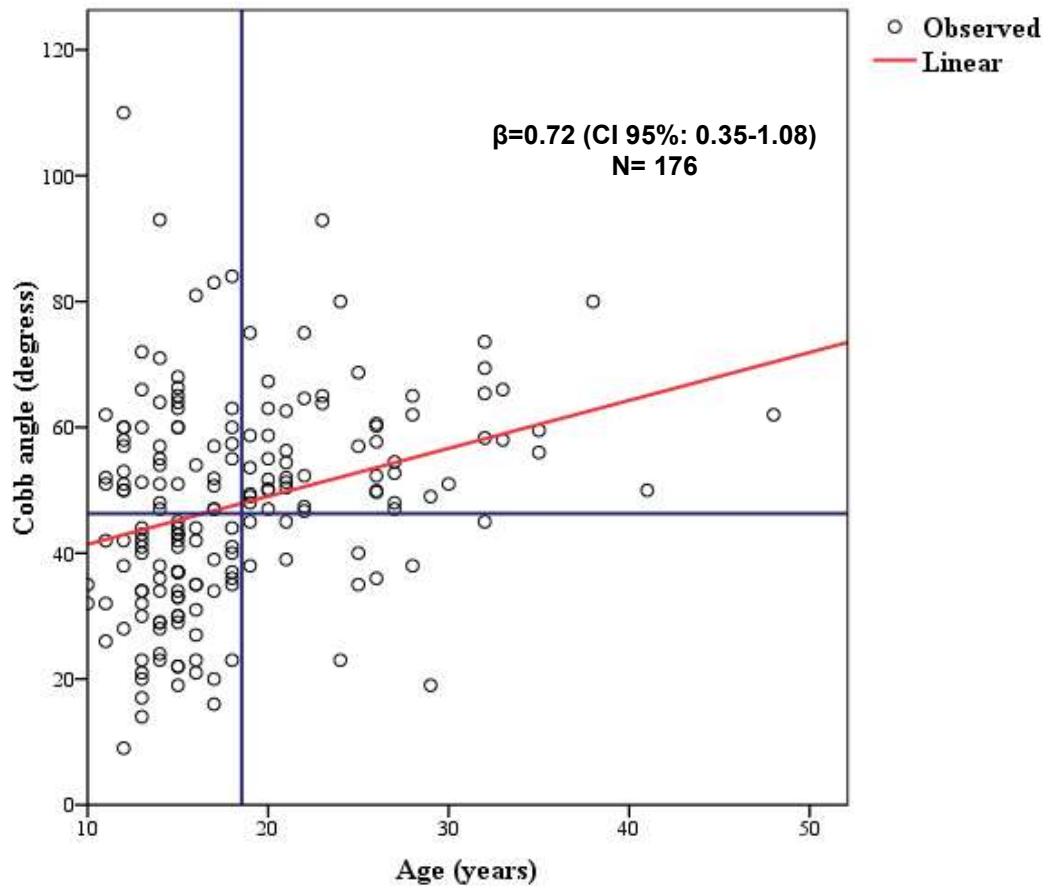
Variables	Idiopathic scoliosis cases N (%)
Age^{a,b} (years old)	
≤ 18	115 (62.8)
19 a 28	51 (27.9)
≥ 29	17 (9.3)
Sex	
Female	171 (92.4)
Male	14 (7.6)
BMI^c (kg/m ²)	
≤ 18.50	64 (35.2)
18.51 a 24.9	99 (54.4)
25.0 a 29.9	12 (6.6)
≥ 30	7 (3.8)
Risser scale^d	
Immature (0-III)	46 (26.3)
Mature (IV-V)	129 (73.7)
Cobb (degrees)^e	
< 45	74 (42.0)
≥ 45	102 (58.0)

^aInformation obtained from 183 cases. ^bValues categorized according to the quartile distribution of the total study population (N=563). ^cInformation obtained from 182 cases. ^dInformation obtained from 175 cases. ^eInformation obtained from 176 cases.

The statistical analysis estimated a mean increase in the Cobb angle of 0.72° for every additional year of age. The relative regression lines, with 95% confidence intervals for the estimated mean Cobb angle values, are shown in Fig. 1. The comparison of the standardized regression coefficients β , which determines the contribution linked to various independent variables expressed in different

measurement scales, showed that age contributed 4-fold more than BMI to the Cobb angle increase (Table 2).

Fig. 1 Relationship between the Cobb angle and the age in adolescent idiopathic scoliosis.



Legend: The circles represent each patients. The red line is linear function coefficient ($R^2 = 0.09$ with $P < 0.001$) and the blue lines are means of th age and Cobb angle. Information obtained from 176 cases.

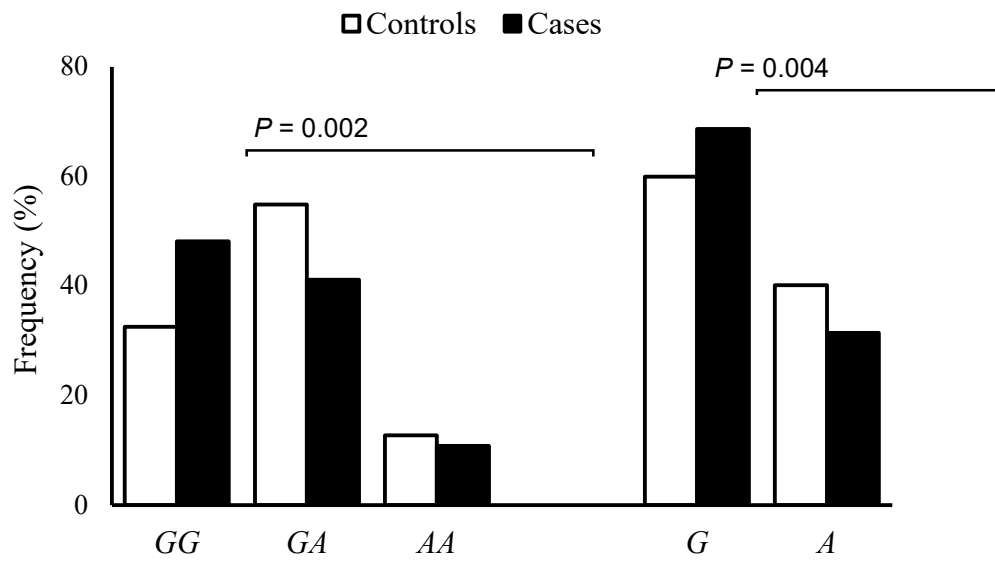
TABLE 2 Linear regression analysis of the cobb angle with age and bmi of adolescent idiopathic scoliosis patients.

Variables	Regression Coefficient	P-value	Standardized coefficient β	(CI 95 %)
Cobb (N = 176)				
Age	0.72	<0.001	0.29	0.35 – 1.08
Sex	-6.21	0.17	-0.10	-15.12 – 2.71
BMI	0.33	0.31	0.08	-0.30 – 0.96
r² ajusted		0.11		
P-model^a		<0.001		

^aP-model calculated by ANOVA test. Information obtained from 176 cases.

The rate of successful genotyping was 100% and the genotypic distribution in the entire study population was in Hardy-Weinberg equilibrium. A statistically different frequency was observed between AIS cases and controls in genotype and allele comparison of the *FBN1* rs12916536 G>A polymorphism (Fig. 2). After adjustment for confounding factors (age, sex and BMI), the *FBN1* rs12916536 polymorphism was associated with a lower risk of developing AIS, since the variant allele was more frequent in the control group. No significant associations were found in *FBN1* rs12916536 polymorphism with severity of the disease, considering either AIS cases with a Cobb angle <45° or a Cobb angle ≥45° (Table 3).

Fig. 2 Allelic and genotypic distribution of the *FBN1* rs12916536 polymorphism in adolescent idiopathic scoliosis cases and controls.



Legend: Number of controls = 378 and cases = 185. *P*-value calculated by Chi-Square Teste or Fisher's exact test, when necessary.

Table 3 Association between the *FBN1* rs12916536 polymorphism with adolescent idiopathic scoliosis and its severity (N = 563).

<i>FBN1</i> rs12916536	Controls (N = 378)	All cases (N = 185)	OR adjusted ^b (CI 95 %)	Cobb <45° (N = 74)	OR adjusted ^c (CI 95 %)	Cobb ≥45° (N = 102)	OR adjusted ^d (CI 95 %)	OR adjusted ^e (CI 95 %)
				N (%)				
GG	123 (32.5)	89 (48.1)	1 ^a	37 (50.0)	1 ^a	48 (47.1)	1 ^a	1 ^a
GA	207 (54.8)	76 (41.1)	0.52 (0.30-0.90)	29 (39.2)	0.54 (0.22-1.33)	43 (42.1)	0.68 (0.37-1.24)	1.12 (0.55-2.26)
AA	48 (12.7)	20 (10.8)	0.95 (0.40-2.26)	8 (10.8)	2.40 (0.45-12.75)	11 (10.8)	0.91 (0.34-2.45)	1.28 (0.42-3.90)
GG	123 (32.5)	89 (48.1)	1 ^a	37 (50.0)	1 ^a	48 (47.1)	1 ^a	1 ^a
GA + AA	255 (67.5)	96 (51.9)	0.58 (0.35-0.98)	37 (50.0)	0.65 (0.28-1.55)	54 (52.9)	0.71 (0.40-1.27)	1.15 (0.60-2.23)
G	453 (59.9)	254 (68.6)	1 ^a	103 (69.6)	1 ^a	139 (68.1)	1 ^a	1 ^a
A	303 (40.1)	116 (31.4)	0.79 (0.54-1.16)	45 (30.4)	0.96 (0.51-1.81)	65 (31.9)	0.85 (0.56-1.30)	1.14 (0.69-1.88)

OR = Odds ratio, adjusted by age, sex and BMI. CI = confidence interval 95%. ^aReference group. ^bAssociation analysis between controls and all AIS cases. ^cAssociation analysis between controls and Cobb <45° AIS cases. ^dAssociation analysis between controls and Cobb ≥45° AIS cases. ^eAssociation analysis between Cobb <45° and Cobb ≥45° AIS cases.

Discussion

The *FBN1* rs12916536 polymorphism was associated with the susceptibility of AIS in the Brazilian population, but it was not influence on the severity of the disease. Age was an independent risk factor for scoliotic curve progression. The molecular mechanisms involved in the pathogenesis and development of AIS have been the subject of many research studies; however, the etiology remains an enigma [5, 32, 33]. For example, low BMI has been associated with AIS and it is hypothesized that this association may be related to the pathogenesis of the disease [34-38]. The majority of our patients (~90%) had low or normal BMI and 58% had curves with Cobb angles exceeding 45°, a parameter commonly used to indicate the need for surgical correction of scoliosis [39]. Our results corroborate with Miyagi and colleagues, as patients with curves with Cobb angles exceeding 45° had significantly lower BMI than patients with curves under 45° [35]. Furthermore, of the significant correlations between anthropometric parameters and the scoliotic curve severity [34], low BMI also was associated with increased risk of all poor outcomes, including brace treatment failure and the need for surgical intervention [37].

The risk of scoliosis curve progression was also associated with female sex, age, skeletal maturity and curve Cobb angle exceeding 30° at presentation [39-41]. The female-to-male ratio (12:1) observed here is consistent with previous studies [9, 42]. In addition, most of our AIS patients were skeletally mature with curve Cobb angles exceeding 45°. This is likely due to the fact that all cases were recruited at a public orthopedic referral hospital in Brazil, where the majority of patients were referred from other facilities for a surgical indication and sometimes the waiting times were surgery were long. Thus, age contributed 4-fold more than BMI to the Cobb angle increase in our cases. Our results corroborate with previous findings that show progression of curves above 30° in skeletally mature patients at rates of <1° per year [39, 43, 44]. Intervening early is vital because patients with curves

below 30° can have a quality of life similar to a healthy population [44, 45] and they are amenable for brace treatment, which was not the case for most of our patients.

Genetic factors have been largely considered to play an important role in its onset and progression of AIS [5]. Rare variants in *FBN1* were first identified in severe AIS North American patients with European ancestry (n=344), other ancestral backgrounds (n=47) and replicated in an independent cohort of Han Chinese (n=370), suggesting that this variant can be predictive of curve severity and promising as a new option for early diagnosis and more timely treatment of severe AIS [9]. *FBN1* variants were also associated with Marfan syndrome's skeletal features, autosomal dominant disorder, which frequently requires orthopedic surgical intervention [25, 46]. *FBN1* is richly distributed in structural elements of elastic and non-elastic tissues, responsible for connective tissue disorders, such as scoliosis [46, 47]. Furthermore, *FBN1* variants can influence in upregulated transforming growth factor-beta signaling in paravertebral muscles [48, 49].

AIS patients showed significantly decreased *FBN1* mRNA expression and common variants (polymorphisms) of *FBN1* were associated with increased individual risk of AIS [18]. The inheritable susceptibility to AIS justifies the growing interest in identifying genetic polymorphisms that could lead to an increased risk or severity of the disease [5]. The present results indicate a negative association between *FBN1* rs12916536 G>A and the risk of developing AIS, since cases showed a significantly lower frequency of genotypes GA+AA than the controls. This polymorphism probably plays an important role in the regulation of *FBN1* expression, since it was marked by enhancer histone in multiple cell lines [50]. It is noteworthy that our result is in agreement with Sheng and colleagues [18], who found that *FBN1* rs12916536 was associated with the development of AIS in a large study (952 cases and 1499 controls) of Chinese.

In addition, *FBN1* expression levels were correlated with AIS curve severity [18]. Here, patients were divided into two Cobb angle groups ($<45^\circ$ and $\geq 45^\circ$); however, *FBN1* rs12916536 polymorphism was not associated with severity of AIS, only with the development of disease. The total sample size was adequate to detect significant associations with 80 % statistical power; the small number of patients in Cobb angle groups was the main limitation of this study. We believe that the role of *FBN1* polymorphisms in the AIS curve severity and development still needs further investigation. Thus, it is necessary to be accounted for by other variables, such as polymorphisms in *LBX1*, *GPR126*, *BNC2*, *PAX1*, *LBX1-AS1*, *BCL2* and *PAX3* genes [6, 8, 10-12, 14], or other yet unknown. In addition to providing the first report of the distribution of *FBN1* rs12916536 polymorphism in the heterogeneous Brazilian population, our study has distinct strengths. First, this study reflects real-life community for diagnosing and treating AIS in a public hospital in a developing country. Second, all patients recruited (cases and controls) were evaluated by experienced spine surgeons, excluding spine deformities in the control group.

Whereas AIS is a multifactorial disease, including environmental and genetic factors, it is essential to study this possible association in patients from different populations, including the Brazilian population, which stands out for the extensive admixture and heterogeneity [26, 27]. It is becoming increasingly important to derive data from different populations to validate the role of genetic polymorphisms in AIS and to build a database that can then be used in future investigations (replication study) to better understand and identify modifiable non-modifiable risk factors associated with AIS development and progression.

Conclusion

In summary, *FBN1* rs12916536 polymorphism play a protective role in the development of AIS, which represents an advance in understanding etiology of disease. Age

was an independent risk factor for curve progression. Due to chronic pain, poor health quality of life and the high treatment costs experienced by AIS patient, the genetic information could assist in the diagnosis of the disease, as well as contribute to an individualized treatment for monitoring the at-risk individuals.

Abbreviations

AIS: adolescent idiopathic scoliosis; 95% CI: 95% Confidence interval; χ^2 : Chi-square; BMI: body mass index; FBN1: fibrillin-1; GWAS: Genome-wide association studies; HWE: Hardy–Weinberg equilibrium; mRNA: messenger RNA; OR: Odds ratio; PCR: polymerase chain reaction; R^2 : degree of correlation; SD: standard deviation; SPSS: Statistical Package for Social Sciences;

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the *Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia*, Rio de Janeiro, Brazil (protocol number 637.973 and 2.767.503). All participating provided written informed consent. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Funding

This study was supported by the Brazilian agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Brazil. Funding body contributed to acquisition of research inputs.

Authors' contributions

GBLA, AEPAJ, HLAD and JAP participated in conception and design of study. GBLA, AEPAJ, LAMM, RMA and JAP collated the data and developed the database. JAP performed the experiments and statistical analysis. GBLA, AEPAJ, HLAD and JAP analysis and interpretation of data. GBLA and JAP wrote the manuscript. JAMG and HLAD critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of this article.

Acknowledgments

The authors thank all staff members of the recruitment hospital especially the INTO Blood Bank staff for collaborating and enabling this study to happen. We also thank our dear students Lucas Rafael Lopes, Giuliana Rodrigues de Souza and Camilla Manso for their technical assistance. This work was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Authors' information

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

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

³Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Divisão de Pesquisa, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

⁴Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

References

1. Weinstein SL, Dolan LA, Cheng JC, Danielsson A, Morcuende JA. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet*. 2008;371(9623):1527-37. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60658-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60658-3)
2. Kouwenhoven JW, Castelein RM. The pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: review of the literature. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008; 33(26):2898-908. doi: <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181891751>
3. Burwell RG, Clark EM, Dangerfield PH, Moulton A. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS): a multifactorial cascade concept for pathogenesis and embryonic origin. *Scoliosis Spinal Disord*. 2016;11:8. doi: <https://doi.org/10.1186/s13013-016-0063-1>
4. Grauers A, Einarsdottir E, Gerdhem P. Genetics and pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Scoliosis Spinal Disord*. 2016;11:45. doi: <https://doi.org/10.1186/s13013-016-0105-8>
5. Peng Y, Wang SR, Qiu GX, Zhang JG, Zhuang QY. Research progress on the etiology and pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Chin Med J (Engl)*. 2020; 133(4):483-493. doi: [10.1097/CM9.0000000000000652](https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000652).

6. Takahashi Y, Kou I, Takahashi A, Johnson TA, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H. et al. A genome-wide association study identifies common variants near LBX1 associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat. Genet.* 2011; 43(12):1237-40. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.974>
7. Sharma S, Gao X, Londono D, Devroy SE, Mauldin KN, Frankel JT, Brandon JM, Zhang D, Li QZ, Dobbs MB. et al. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20(7):1456-66. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq571>
8. Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, Qiu X, Sharma S, Takimoto A, Ogura Y. et al. Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat. Genet.* 2013; 45(6):676-9. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.2639>
9. Buchan JG, Alvarado DM, Haller GE, et al. Rare variants in FBN1 and FBN2 are associated with severe adolescent idiopathic scoliosis. *Hum Mol Genet* 2014; 23(19):5271-82. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu224>
10. Ogura Y, Kou I, Miura S, Takahashi A, Xu L, Takeda K, et al. A functional SNP in BNC2 is associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Am J Hum Genet.* 2015; 97(2):337-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.012>
11. Sharma S, Londono D, Eckalbar WL, Gao X, Zhang D, Mauldin K, et al. A PAX1 enhancer locus is associated with susceptibility to idiopathic scoliosis in females. *Nat Commun.* 2015; 6:6452. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms7452>
12. Zhao L, Roffey DM, Chen S. Genetics of adolescent idiopathic scoliosis in the post-genome-wide association study era. *Ann Transl Med.* 2015;3(Suppl 1):S35. doi: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.54>.
13. Zhu Z, Tang NL, Xu L, Qin X, Mao S, Song Y, Liu L, Li F, Liu P, Yi L, Chang J, Jiang L, Ng BK, Shi B, Zhang W, Qiao J, Sun X, Qiu X, Wang Z, Wang F, Xie D, Chen L, Chen Z, Jin

- M, Han X, Hu Z, Zhang Z, Liu Z, Zhu F, Qian BP, Yu Y, Wang B, Lee KM, Lee WYW, Lam TP, Qiu Y, Cheng JC. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Chinese girls. *Nat Commun.* 2015;6:8355. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms9355>
14. Ogura Y, Kou I; Japan Scoliosis Clinical Research Group, Scoliosis J, Matsumoto M, Watanabe K, Ikegawa S. Genome-wide association study for adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Calcium.* 2016;26(4):553-60.
15. Zhu Z, Xu L, Leung-Sang Tang N, Qin X, Feng Z, Sun W, Zhu W, Shi B, Liu P, Mao S, Qiao J, Liu Z, Sun X, Li F, Chun-Yiu Cheng J, Qiu Y. Genome-wide association study identifies novel susceptible loci and highlights Wnt/beta-catenin pathway in the development of adolescent idiopathic scoliosis. *Hum Mol Genet.* 2017;26(8):1577-1583. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx045>
16. Khanshour AM, Kou I, Fan Y, Einarsdottir E, Makki N, Kidane YH, Kere J, Grauers A, Johnson TA, Paria N, Patel C, Singhania R, Kamiya N, Takeda K, Otomo N, Watanabe K, Luk KDK, Cheung KMC, Herring JA, Rios JJ, Ahituv N, Gerdhem P, Gurnett CA, Song YQ, Ikegawa S, Wise CA. Genome-wide meta-analysis and replication studies in multiple ethnicities identify novel adolescent idiopathic scoliosis susceptibility loci. *Hum Mol Genet.* 2018;27(22):3986-3998. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx045>
17. Kou I, Otomo N, Takeda K, Momozawa Y, Lu HF, Kubo M, Kamatani Y, Ogura Y, Takahashi Y, Nakajima M, Minami S, Uno K, Kawakami N, Ito M, Yonezawa I, Watanabe K, Kaito T, Yanagida H, Taneichi H, Harimaya K, Taniguchi Y, Shigematsu H, Iida T, Demura S, Sugawara R, Fujita N, Yagi M, Okada E, Hosogane N, Kono K, Nakamura M, Chiba K, Kotani T, Sakuma T, Akazawa T, Suzuki T, Nishida K, Kakutani K, Tsuji T, Sudo H, Iwata A, Sato T, Inami S, Matsumoto M, Terao C, Watanabe K, Ikegawa S. Genome-wide association study identifies 14 previously unreported susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis

- in Japanese. *Nat Commun.* 2019;10(1):3685. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11596-w>
18. Sheng F, Xia, C, Leilei X, Qin X, Nelson LST, Qiu Y, Cheng, JCY, Zhu Z. New Evidence Supporting the Role of FBN1 in the Development of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2019; 44(4):E225-E232. doi: <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000002809>
19. Biery NJ, Eldadha ZA, Moore CS, Stetten G, Spencer F, Dierz HC. Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics*. 1999;56:70–7. doi: [10.1006/geno.1998.5697](https://doi.org/10.1006/geno.1998.5697).
20. Tsipouras P, Del Mastro R, Sarfarazi M, Lee B, Vitale E, Child AH, Godfrey M, Devereux RB, Hewett D, Steinmann B, Viljoen D, Sykes BC, Kilpatrick M, Ramirez F, the International Marfan Syndrome Collaborative Study: Genetic linkage of the Marfan syndrome, ectopia lentis, and congenital contracturd arachnodactyly to the fibrillin genes on chromosomes 15 and 5. *N Engl J Med.* 1992; 326(14):905-9. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM199204023261401>
21. Miller NH, Mims A, Child DM, Milewicz SH, Sponseller P, Blanton SH. Genetic Analysis of Structural Elastic Fiber and Collagen Genes in Familial Adolescent Idiopathic Scoliosis. *J Orthop Res.* 1996;14(6):994-9. doi: <https://doi.org/10.1002/jor.1100140621>
22. Loeys B, Nuytinck L, Delvaux, I, et al. Genotype and phenotype analysis of 171 patients referred for molecular study of the fibrillin-1 gene FBN1 because of suspected Marfan syndrome. *Arch Intern Med.* 2001; 161(20):2447-54. doi: <https://doi.org/10.1001/archinte.161.20.2447>
23. Faivre L, Gorlin RJ, Wirtz MK, et al. In frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal dominant Weill-Marchesani syndrome. *J Med Genet* 2003; 40(1):34-6. doi:[https://doi.org/ 10.1136/jmg.40.1.34](https://doi.org/10.1136/jmg.40.1.34)

24. Arbustini E, Grasso M, Ansaldi S, et al. Identification of sixty-two novel and twelve known FBN1 mutations in eighty-one unrelated probands with Marfan syndrome and other fibrillinopathies. *Hum Mutat.* 2005; 26(5):494. doi: <https://doi.org/10.1002/humu.9377>
25. Phokaew, Rekwan Sittiwangkul 2, Kanya Suphapeetiporn 3, Vorasuk Shotelersuk. Double heterozygous variants in FBN1 and FBN2 in a Thai woman with Marfan and Beals syndromes. *Eur J Med Genet.* 2020;63(9):103982. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103982>.
26. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011; 6(2):e17063. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>
27. Suarez-Kurtz G, Genro JP, de Moraes MO, Ojopi EB, Pena SD, Perini JA, Ribeiro-dos-Santos A, Romano-Silva MA, Santana I, Struchiner CJ. Global pharmacogenomics: Impact of population diversity on the distribution of polymorphisms in the CYP2C cluster among Brazilians. *Pharmacogenomics J.* 2012;12(3):267-76. doi: <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.89>
28. Lopes LR, de Miranda VAR, Guimarães JAM, et al. Association of TNF- α -308G > A polymorphism with susceptibility to tendinopathy in athletes: a case-control study. *BMC Sports Sci Med Rehabil.* 2021; 13(1):51. doi: <https://doi.org/10.1186/s13102-021-00276-2>.
29. Cobb JR. Outline for the study of scoliosis. *The American Academy of Orthopedic Surgeons Instructional Course Lectures.* Vol. 5. Ann Arbor, MI: Edwards; 1948.

30. Risser JC. The classic: The iliac apophysis: an invaluable sign in the management of scoliosis. 1958. Clin Orthop Relat Res. 2010;468(3):643-53. doi: <https://doi.org/10.1007/s11999-009-1096-z>
31. Goes RA, Lopes LR, Cossich VRA, de Miranda VAR, Coelho ON, do Carmo Bastos R, Domenis LAM, Guimarães JAM, Grangeiro-Neto JA, Perini JA. Musculoskeletal injuries in athletes from five modalities: a cross-sectional study. BMC Musculoskelet Disord. 2020 Feb 24;21(1):122. doi: 10.1186/s12891-020-3141-8.
32. Kikanloo SR, Tarpada SP, Cho W. Etiology of Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Literature Review. Asian Spine J. 2019; 13(3):519-526. doi: [10.31616/asj.2018.0096](https://doi.org/10.31616/asj.2018.0096).
33. Zaydman AM, Strokova EL, Pahomova NY, Gusev AF, Mikhaylovskiy MV, Shevchenko AI, Zaidman MN, Shilo AR, Subbotin VM. Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: Review of the literature and new epigenetic hypothesis on altered neural crest cells migration in early embryogenesis as the key event. Med Hypotheses . 2021;151:110585. doi: [10.1016/j.mehy.2021.110585](https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110585).
34. Cheung CSK, Lee WTK, Tse YK, Tang SP, Lee MK, Guo X, et al. Abnormal peri-pubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 598 patients. Spine (Phila Pa 1976). 2003;28:2152-7. doi: [10.1097/01.BRS.0000084265.15201.D5](https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000084265.15201.D5)
35. Miyagi M, Saito W, Imura T, Nakazawa T, Shirasawa E, Kawakubo A, Uchida K, Akazawa T, Inage K, Ohtori S, Inoue G, Takaso M. Body Composition in Japanese Girls with Adolescent Idiopathic Scoliosis. Spine Surg Relat Res. 2020; 31;5(2):68-74. doi: [10.22603/ssrr.2020-0088](https://doi.org/10.22603/ssrr.2020-0088).
36. Ramírez M, Martínez-Llorens J, Sanchez JF, Bagó J, Molina A, Gea J, Cáceres E. Body composition in adolescent idiopathic scoliosis. Eur Spine J. 2013;22(2):324-9. doi: [10.1007/s00586-012-2465-y](https://doi.org/10.1007/s00586-012-2465-y)

37. Goodbody CM, Asztalos IB, Sankar WN, Flynn JM. It's not just the big kids: both high and low BMI impact bracing success for adolescent idiopathic scoliosis. *J Child Orthop*. 2016; 10(5):395-404. doi: [10.1007/s11832-016-0763-3](https://doi.org/10.1007/s11832-016-0763-3)
38. Jeon K, Kim DI. The Association between Low Body Weight and Scoliosis among Korean Elementary School Students. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(12):2613. doi: [10.3390/ijerph15122613](https://doi.org/10.3390/ijerph15122613).
39. Agabegi SS, Kazemi N, Sturm PF, Mehlman CT. Natural History of Adolescent Idiopathic Scoliosis in Skeletally Mature Patients: A Critical Review. *J Am Acad Orthop Surg*. 2015; 23(12):714-23. doi: [10.5435/JAAOS-D-14-00037](https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-14-00037).
40. Soucacos PN, Zacharis K, Soultanis K, Gelalis J, Xenakis T, Beris AE. Risk factors for idiopathic scoliosis: Review of a 6-year prospective study. *Orthopedics* 2000; 23(8):833-8.
41. Horne JP, Flannery R, Usman S. Adolescent idiopathic scoliosis: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2014; 89(3):193-8.
42. Lenke L. Idiopathic scoliosis. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2004.
43. Weinstein SL, Dolan LA, Spratt KF, Peterson KK, Spoonamore MJ, Ponseti IV. Health and function of patients with untreated idiopathic scoliosis: a 50-year natural history study. *JAMA*. 2003; 289:559–67. doi [10.1001/jama.289.5.559](https://doi.org/10.1001/jama.289.5.559)
44. Danielsson AJ. Natural history of adolescent idiopathic scoliosis: a tool for guidance in decision of surgery of curves above 50°. *J Child Orthop*. 2013;7(1):37-41. doi: [10.1007/s11832-012-0462-7](https://doi.org/10.1007/s11832-012-0462-7).
45. Mak T, Cheung PWH, Zhang T, Cheung JPY. Patterns of coronal and sagittal deformities in adolescent idiopathic scoliosis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2021;22(1):44. doi: [10.1186/s12891-020-03937-4](https://doi.org/10.1186/s12891-020-03937-4).
46. Reyes-Hernández OD, Palacios-Reyes C, Chávez-Ocaña S, Cortés-Malagón EM, Alonso-Themann PG, Ramos-Cano V, Ramírez-Bello J, Sierra-Martínez M. Skeletal

manifestations of Marfan syndrome associated to heterozygous R2726W FBN1 variant: sibling case report and literature review. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016; 15;17:79. doi: [10.1186/s12891-016-0935-9](https://doi.org/10.1186/s12891-016-0935-9).

47. Gao LG, Yao XP, Zhang L, Hui RT, Zhou XL. Molecular analysis for diagnosis of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124:930–4.

48. Matt P, Schoenhoff F, Habashi J, et al. Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Circulation* 2009;120:526–32. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841981](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841981).

49. Nowak R, Kwiecien M, Tkacz M, Mazurek U. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling in paravertebral muscles in juvenile and adolescent idiopathic scoliosis. *Biomed Res Int* 2014;2014:594287. doi: [10.1155/2014/594287](https://doi.org/10.1155/2014/594287).

50. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D930–4. doi: [10.1093/nar/gkr917](https://doi.org/10.1093/nar/gkr917).

