



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
CINTHIA FARACO MARTINEZ CEBRIAN

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C EM CRIANÇAS COM OSTEOGÊNESE
IMPERFEITA: ESTUDO PILOTO DE UM ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO E
RANDOMIZADO**

Palhoça
2020

C38 Cebrian, Cinthia Faraco Martinez, 1977 -
 Suplementação com vitamina C em crianças com osteogênese
 imperfeita : estudo piloto de um ensaio clínico controlado e
 randomizado / Cinthia Faraco Martinez Cebrian. – 2020.
 81 f. : il. color. ; 30 cm

 Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina,
 Pós-graduação em Ciências da Saúde.
 Orientação: Profa. Dra.Franciane Bobinski

 1. Osteogênese imperfeita. 2. Vitamin C. 3. Osteogênese
 imperfeita - Dor - Tratamento. I. Bobinski, Franciane. II.
 Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.716

CINTHIA FARACO MARTINEZ CEBRIAN

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C EM CRIANÇAS COM OSTEOGÊNESE
IMPERFEITA: ESTUDO PILOTO DE UM ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO E
RANDOMIZADO**

LINHA DE PESQUISA: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade do Sul de
Santa Catarina para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Franciane Bobinski, Dra.

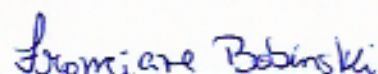
Palhoça
2020

CINTHIA FARACO MARTINEZ CEBRIAN

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C EM CRIANÇAS COM OSTEOGÊNESE
IMPERFEITA: ESTUDO PILOTO DE UM ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO E
RANDOMIZADO**

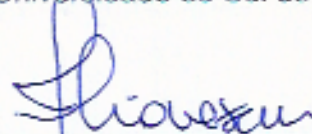
Esta Dissertação foi julgada adequada
pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde – Mestrado, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Palhoça (SC), 28 de fevereiro de 2019.



Orientadora: Prof^a. Franciane Bobinski, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina



Prof^a. Anna Paula Piovezan, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina



Prof. Ari Digiácomo Ocampo Moré, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Dedicatória

Aos meus pais, Hélio e Iara (in memoriam), que me tornaram o que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Esta Dissertação é fruto de dois anos de estudo, dedicação e persistência. Nestes dois anos acrescentei o papel de mestranda junto às minhas outras atribuições de ser médica e professora. Nestes dois anos aprendi muito e sou grata a todos aqueles que fizeram parte deste projeto e que me ajudaram a enfrentar esta tripla jornada.

Agradeço à Deus, que me permitiu enfrentar este desafio.

Agradeço à UNISUL e o PPGCS. Nele incluo todos os professores, a secretária Carol e meus colegas de turma. Agradeço especialmente a Profa. Anna que sempre esteve envolvida com este projeto e me auxiliou desde o início, bem como aceitou prontamente revisar este trabalho em sua versão final.

Agradeço à Dra. Luciana Sanada que fez parte da minha banca de qualificação e contribuiu para a melhora deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Ari Digiácomo O. Moré pela gentileza de dispor de seu tempo e conhecimento para avaliar este estudo.

Agradeço aos integrantes do LaNEx, especialmente Dr. Daniel Martins, Dra. Verônica Horewicz e a IC, Fernanda da Silveira, por sua importante colaboração nas dosagens bioquímicas.

Agradeço ao Hospital Infantil Joana de Gusmão, por permitir que este estudo se realizasse. Agradeço ao Serviço de Endocrinologia Pediátrica, principalmente Dr. Genoir Simoni e as médicas residentes Annie e Jéssica. Agradeço ao Serviço de Ortopedia Pediátrica, especialmente Dr. André Andújar. Agradeço às enfermeiras e técnicas de enfermagem da unidade de internação da Ortopedia que cuidam com todo o carinho de nossos pacientes. Agradeço ao laboratório Ciência, especialmente a farmacêutica Marjorana e as técnicas do laboratório por auxiliarem no processamento das amostras.

Agradeço à farmácia Sesi e seus funcionários pelo profissionalismo na manipulação da vitamina C e do placebo.

Agradeço aos pacientes portadores de osteogênese e suas famílias. Vocês me motivam a ir em frente.

Agradeço aos meus amigos e família que compreenderam a minha necessidade de afastamento temporária. Estou com saudades de vocês.

Agradeço ao meu pai, Dr. Hélio Cebrian e à minha mãe Iara Lúcia (in memoriam), que sempre serviram de exemplo e me deram forças para seguir em frente.

Agradeço à Dra. Franciane Bobinski, minha orientadora, que compreendeu minha jornada louca de trabalho e conseguiu retirar de mim mais do que eu achei que poderia fazer. Sem você, não teria ido tão longe. Obrigada por ter sido exigente e doce.

Para finalizar, sou grata àquele com quem divido os meus dias, as minhas angústias e minhas alegrias. Sem o seu auxílio, colaboração, suporte e principalmente paciência, este projeto não teria se concretizado. Reconheço todo o seu esforço e dedicação. Não tenho palavras para agradecer... Obrigada, Marcelo.

À todos que me acompanharam nesta jornada,
Meus agradecimentos.

Nada é tão difícil quanto parece.

Cinthia Cebrian.

RESUMO

Introdução: A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença rara, congênita e hereditária. A principal característica clínica é a fragilidade óssea, no entanto, a dor também é comum, limita as atividades diárias e afeta a qualidade de vida. A suplementação com vitamina C é uma possibilidade de tratamento complementar que pode contribuir para a melhora dos sintomas da OI, visto que é essencial para a hidroxilação da prolina durante a formação do colágeno, além de ter função anti-inflamatória já estabelecida.

Objetivos: Avaliar o efeito da suplementação com a vitamina C ou placebo sobre a dor, qualidade de vida, inflamação, síntese do colágeno, *turnover* ósseo e fraturas em crianças com OI em uso de pamidronato dissódico.

Métodos: Estudo piloto de um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo. Após o recrutamento e a avaliação dos critérios de elegibilidade, 54 crianças foram randomizadas para receber a suplementação com Placebo ou Vitamina C. Todas as avaliações foram realizadas pré e pós-suplementação. Avaliou-se o número de fraturas pela análise do prontuário. A dor foi avaliada com as escalas *Face, Legs, Activity, Cry, Consolability* (FLACC), *Faces Pain Scale – Revised* (FPS-R) e *Adolescent Pediatric Pain Tool* (APPT), adequadas a cada faixa etária. Os questionários utilizados para a avaliação da qualidade de vida foram o *PedsQL™ Infant Scales* e o *PedsQL™ 4.0 Generic Core Scales*. As análises das concentrações séricas das citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6 e MMP-9) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), além dos níveis de TGF- β , utilizado como marcador do *turnover* ósseo, foram avaliados por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). A mensuração da concentração sérica de hidroxiprolina foi realizada por reação colorimétrica.

Resultados: A suplementação com vitamina C não alterou o número de fraturas e a qualidade de vida. A dor se mostrou presente em apenas uma criança e não foi alterada com a suplementação. A vitamina C não alterou os níveis séricos de TNF, IL-1 β , IL-6 e MMP-9. Os níveis séricos de IL-4 não se alteraram, mas observou-se um aumento na concentração de IL-10 após a suplementação com vitamina C em relação aos níveis basais, enquanto o grupo suplementado com placebo reduziu os níveis séricos pós-suplementação ($P=0,0023$). Ademais, o grupo Vitamina C apresentou uma concentração maior de hidroxiprolina em relação ao grupo Placebo ($P= 0,013$) pós-suplementação. Na análise temporal, o grupo suplementado com vitamina C aumentou os níveis séricos de hidroxiprolina, em relação aos valores basais, enquanto que no grupo suplementado com placebo, os níveis séricos diminuíram ($P= 0,0005$). Os níveis séricos de TGF- β 1 não se alteraram com a suplementação.

Conclusão: A vitamina C está associada à elevação dos níveis séricos de IL-10, uma citocina anti-inflamatória capaz de reduzir a atividade dos osteoclastos. Além de aumentar os níveis séricos de hidroxiprolina, que pode ser decorrente do aumento da produção de colágeno, reação dependente da vitamina C. Isso pode ser entendido como um fator de melhora visto que o defeito básico da OI encontra-se na produção do colágeno tipo I.

Palavras-chave: Osteogênese Imperfeita; Vitamina C; Dor; Qualidade de vida; Colágeno; Citocinas; Hidroxiprolina.

ABSTRACT

Introduction: Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare, congenital and hereditary disease. The main clinical feature is bone fragility; however, pain is also common, limits daily activities and affects quality of life. Supplementation with vitamin C is a possibility of complementary treatment that can contribute to the improvement of the symptoms of OI, since it is essential for the hydroxylation of proline during the synthesis of collagen, besides having already established anti-inflammatory function.

Objectives: To evaluate the effect of supplementation with vitamin C or placebo on pain, quality of life, inflammation, collagen synthesis, bone turnover and fractures in children with IO in the use of pamidronate disodium.

Methods: Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. After recruitment and evaluation of eligibility criteria, 54 children were randomized to receive either Placebo or Vitamin C supplementation. All evaluations were performed pre- and post-supplementation. The number of fractures was evaluated by chart analysis. Pain was assessed using the Face, Legs, Activity, Cry, Consolability (FLACC), Pain Scale-Revised (FPS-R) and Adolescent Pediatric Pain Tool (APPT) scales, appropriate for each age group. The questionnaires used to assess quality of life were the PedsQL™ Infant Scales and the PedsQL™ 4.0 Generic Core Scales. Serum concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6 and MMP-9) and anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10), as well as TGF- β used as a marker of bone turnover, were evaluated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The measurement of serum hydroxyproline concentration was performed by colorimetric reaction.

Results: Vitamin C supplementation did not alter the number of fractures and the quality of life. The pain was present in only one child and was not altered with supplementation. Vitamin C did not alter serum levels of TNF, IL-1 β , IL-6 and MMP-9. Serum IL-4 levels did not change, but an increase in IL-10 concentration was observed after vitamin C supplementation over baseline levels, whereas the placebo-supplemented group reduced post-supplementation serum levels ($P = 0.0023$). In addition, the Vitamin C group presented a higher concentration of hydroxyproline in relation to the Placebo group ($P = 0.013$) after supplementation. In the temporal analysis, the group supplemented with vitamin C increased serum hydroxyproline levels from baseline, whereas in the placebo group, serum levels decreased ($P = 0.0005$). Serum TGF- β 1 levels did not change with supplementation.

Conclusion: Vitamin C is associated with elevated serum levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine capable of reducing osteoclast activity. In addition to increasing serum levels of hydroxyproline, which may be due to increased production of collagen, a vitamin C dependent reaction. This can be understood as an improvement factor since the basic defect of OI lies in the production of collagen type I.

Keywords: Osteogenesis Imperfecta; Vitamin C; Pain; Quality of life; Collagen; Cytokines; Hydroxyproline.

LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

ADAMTS2....	Desintegrina-metaloproteinase com Domínio Idêntico à Tromboespondina 2
APPT.....	Do inglês: <i>Adolescent Pediatric Pain Tool</i>
ASIC.....	Canal Iônico Sensível ao Ácido
BMP1.....	Proteína Óssea Morfogenética 1
CEP.....	Comitê de Ética em Pesquisa
CRTAP.....	Proteína Associada a Cartilagem
DP.....	Desvio Padrão
EPM.....	Erro Padrão da Média
FLACC.....	Do inglês: <i>Face, Legs, Activity, Cry, Consolability</i>
FLACC-R.....	Do inglês: <i>Face, Legs, Activity, Cry, Consolability – Revised</i>
FPS-R.....	Do inglês: <i>Faces Pain Scale – Revised</i>
GLT.....	Galactosiltransferase
HIJG.....	Hospital Infantil Joana de Gusmão
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-4.....	Interleucina-4
IL-6.....	Interleucina-6
IL-7.....	Interleucina-7
IL-10.....	Intrleucina-10
IL-12.....	Interleucina-12
IL-13.....	Interleucina-13
IL-18.....	Interleucina-18
LaNEx.....	Laboratório de Neurociência Experimental
LH1.....	Lisil-hidroxilase 1
LH2.....	Lisil-hidroxilase 2
M.....	Média
MMP(s).....	Metaloproteinase(s) de Matriz

MMP-1.....	Metaloproteinase de Matriz-1
MMP-2.....	Metaloproteinase de Matriz-2
MMP-3.....	Metaloproteinase de Matriz-3
MMP-9.....	Metaloproteinase de Matriz-9
MMP-13.....	Metaloproteinase de Matriz-13
MMP-14.....	Metaloproteinase de Matriz-14
MMP-18.....	Metaloproteinase de Matriz-18
ODF.....	Fator de Diferenciação do Osteoclasto (do inglês: <i>Osteoclast Differentiation Factor</i>)
OI.....	Osteogênese Imperfeita
P3H1.....	Prolil-3-hidroxilase 1
P4H1.....	Prolil-4-hidroxilase 1
PPlase B.....	Peptidil-prolil-cis/trans Isomerase B
RANK.....	Receptor Ativador do Fator Nuclear B
rER.....	Retículo Endoplasmático Rugoso
TALE.....	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE.....	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador-beta
TGF- β 1.....	Fator de Crescimento Transformador-beta 1
TNF.....	Fator de Necrose Tumoral
TRPV1.....	Receptor de Potencial Transitório Vaniloide 1

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo.....	47
-------------------------------------	----

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura óssea.....	18
Figura 2 – Síntese do colágeno.....	20
Figura 3 – Esquema da estrutura do pró-colágeno.....	20

Figura 4 – Formação da tripla hélice.....	21
Figura 5 – Secreção e clivagem do pró-colágeno.....	22
Figura 6 – Características clínicas de paciente portador de Ol.....	25
Figura 7 – Estudo radiográfico de paciente portador de Ol.....	26

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1.1	Morfofisiologia do tecido ósseo	17
1.1.2	Formação do Colágeno tipo I.....	19
1.1.3	Hidroxirolina	22
1.1.4	Osteogênese Imperfeita.....	24
1.1.4.1	Dor na Osteogênese Imperfeita	27
1.1.4.2	Tratamento da Osteogênese Imperfeita	29
1.1.5	Vitamina C	31
2.	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3.	MÉTODOS.....	38
3.1	TIPO DE ESTUDO	38
3.2	POPULAÇÃO, LOCAL, TEMPO E AMOSTRA	38
3.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	39
3.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	40
3.5	COLETA DE DADOS	40
3.5.1	Suplementação com vitamina C ou placebo	41
3.5.2	Avaliação da dor.....	42
3.5.2.1	<i>Face, Legs, Activity, Cry, Consolability – Revised</i>	42
3.5.2.2	<i>Faces Pain Scale – Revised</i>	43
3.5.2.3	<i>Adolescent Pediatric Pain Tool</i>	43
3.5.3	Avaliação da qualidade de vida	44
3.5.3.1	<i>PedsQL™ Infant Scales</i> (PedsQL – Inventário Pediátrico sobre a Qualidade de Vida – questionário sobre bebês).....	44
3.5.3.2	<i>PedsQL™ 4.0 Generic Core Scales</i> (PedsQL – Questionário Pediátrico sobre a Qualidade de Vida).....	45
3.5.4	Coleta de sangue e análises bioquímicas.....	46
3.5.4.1	Avaliação das concentrações de citocinas e TGF-β1	46
3.5.4.2	Avaliação das concentrações de hidroxirolina	47
3.6	VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	47

3.7	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	48
3.8	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	49
4.	ARTIGO	51
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICES.....	62
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	62
	APÊNDICE B – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido I.....	65
	APÊNDICE C – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido II.....	67
	APÊNDICE D – Registro diário de aderência à suplementação	70
	ANEXOS.....	73
	ANEXO A – <i>Face, Legs, Activity, Cry, Consolability – Revised</i>	73
	ANEXO B – <i>Faces Pain Scale – Revised</i>	74
	ANEXO C – <i>Adolescent Pediatric Pain Tool</i>.....	75
	ANEXO D – Parecer Consubstanciado do CEP	77

1. INTRODUÇÃO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença rara, congênita e hereditária. A incidência exata da doença não é conhecida, mas estima-se um caso para cada vinte mil nascimentos¹⁻⁵. Na maioria dos casos (90%), a doença é causada por mutações de herança dominante em um dos dois genes que codificam as cadeias do colágeno tipo I (COL1A1 e COL1A2), localizados nos cromossomos 7 e 17^{1,6}. Além destas mutações de herança dominante, mutações de herança recessiva também foram descritas, como as que ocorrem no gene CRTAP que codifica a proteína associada a cartilagem (CRTAP) e no gene da prolil-3-hidroxilase, e estas estão associadas a formas mais graves da doença. Estas duas proteínas fazem parte de um complexo responsável pela hidroxilação do colágeno, uma etapa fundamental no processamento do colágeno tipo I^{7,8}. Todas estas mutações podem levar a alterações quantitativas ou qualitativas do colágeno ou ainda à associação destas duas variações¹.

A principal característica clínica da OI é a fragilidade óssea, no entanto, deformidades ósseas e manifestações extra-esqueléticas como a esclera azulada, perda da audição, frouxidão ligamentar e dentinogênese imperfeita são características clínicas frequentes. Isto se deve ao fato do colágeno tipo I estar presente nos ossos, tendões, ligamentos, esclera e dentina^{1,9}. O fenótipo dos pacientes difere substancialmente, variando de quadros leves com poucas fraturas até o óbito intra-útero, nos casos mais graves da doença^{10,11}. A OI foi inicialmente classificada por Sillence em quatro tipos clínicos (I a IV), dependendo da gravidade¹². O tipo I tem herança autossômica dominante e apresenta fragilidade óssea leve. O tipo II, herança autossômica recessiva ou dominante e a apresentação clínica é a mais grave, sendo que a grande maioria destas crianças não sobrevive à gestação. O tipo III também apresenta herança autossômica recessiva e é a apresentação clínica mais grave entre os portadores de OI vivos. O tipo IV é resultado de herança autossômica dominante e apresenta fragilidade óssea moderada^{5,12,13}. Com o surgimento dos testes genéticos, foram identificadas uma grande variedade de mutações e novos tipos de OI foram descritos, sendo que novas classificações estão sendo discutidas^{11,14}.

Outra característica clínica comum em pacientes portadores de OI é a dor, que pode ser aguda ou crônica. A dor aguda é normalmente decorrente de episódios

traumáticos, enquanto que sua cronicidade está associada à dor musculoesquelética e às malformações ósseas^{2,5}. Embora evidências sugiram que a dor seja um sintoma comum, poucos estudos abordam a prevalência ou as características da dor na OI^{2,5,15}. A presença da dor crônica ou aguda recorrente leva a diminuição do convívio escolar e social, limitação das atividades diárias e distúrbios do sono, afetando a qualidade de vida e representando um fardo significativo para as crianças e seus familiares^{2,5}.

Vários mecanismos para o surgimento da dor óssea têm sido discutidos e é bem estabelecido que a atividade dos osteoclastos contribui neste processo e está, em parte, relacionada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-1 β , IL-6, fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de necrose tumoral (TNF)^{2,16}. Estas citocinas são responsáveis pela diferenciação, ativação e aumento da sobrevivência e atividade dos osteoclastos, promovendo reabsorção óssea e ainda, atuam inibindo a diferenciação dos osteoblastos e induzindo a apoptose destas células^{17,18}. Por outro lado a IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 e o interferon gama (IFN- γ) inibem a formação dos osteoclastos e a reabsorção óssea¹⁸.

O diagnóstico da OI pode ser feito através da história clínica, exame físico e exames de imagem, por meio da identificação da presença das características da doença. Pacientes portadores de OI grave, podem ter o diagnóstico ainda durante o período gestacional. A ultrassonografia pré-natal pode identificar fraturas intra-útero ou deformidades dos ossos longos, que corroboram com a OI. Assim que o paciente nasce, a radiografia também pode mostrar estas mesmas alterações, sugerindo a doença. O exame que confirma a OI é o teste genético, capaz de identificar qual gene está comprometido, no entanto é pouco utilizado no sistema de saúde público brasileiro devido ao seu alto custo¹⁹.

Atualmente, o objetivo principal do tratamento dos pacientes portadores de OI é melhorar a qualidade óssea para evitar que fraturas e deformidades ósseas ocorram, possibilitando o ortostatismo, a marcha e consequentemente a melhora de todo o sistema musculoesquelético⁸. Apesar da dor ser frequente nestes pacientes, o seu tratamento na OI é pouco mencionado na literatura médica.

O tratamento clínico utilizado na OI é a administração de pamidronato dissódico, um bisfosfonado de segunda geração que contém nitrogênio²⁰. Atua aumentando a densidade óssea e reduzindo o número de fraturas¹¹. Sua função é

restringir a ação dos osteoclastos através da inibição da enzima farnesil-pirofosfato-sintase, levando a apoptose celular^{20,21}. Com a diminuição da ação dos osteoclastos, o *turnover* ósseo diminui e há um aumento da massa óssea. Com a diminuição da atividade dos osteoclastos, o paciente apresenta uma melhora dos níveis de dor, apesar deste mecanismo não estar totalmente elucidado^{2,16,22}. Ainda, o pamidronato inibe a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), como a MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-13 e bloqueia o TNF em nível proteico. A produção das interleucinas, IL-1 β e IL-6, secretadas após a degeneração celular, também diminui²³. Além do pamidronato, outras terapias farmacológicas tem sido estudadas como formas de tratamento da OI. É comprovado o aumento do TGF- β em modelos animais de OI e o seu bloqueio com anticorpos pode ser uma possibilidade terapêutica¹¹.

Tendo em vista a prevalência da dor, a redução da qualidade de vida e a falta de tratamento específico para o controle da dor nos pacientes com OI, este estudo se pautou na busca de alternativas de tratamento para a dor musculoesquelética, melhora da qualidade óssea e da qualidade de vida. Uma possibilidade de tratamento complementar que pode contribuir para a melhora dos sintomas da OI é a suplementação com vitamina C, a qual foi objeto deste estudo. A vitamina C é essencial para a atividade das enzimas prolina-hidroxilase e lisina-hidroxilase, necessárias para manter a estabilidade das hélices do colágeno. É um cofator essencial para a síntese do colágeno em tecidos saudáveis^{24,25}. A vitamina C também tem papel antioxidante, prevenindo a oxidação do DNA, de proteínas e da parede celular, além de ter função analgésica já estabelecida^{24,26}. Ainda, a vitamina C participa na síntese de neurotransmissores, como catecolaminas e monoaminas, responsáveis pela modulação da dor em nível central²⁶. Desta forma, justifica-se a investigação do uso da vitamina C para o tratamento da dor, melhora da qualidade do colágeno e consequentemente, melhora da qualidade óssea e da qualidade de vida em crianças portadoras de OI.

A pergunta desta pesquisa é: a suplementação com vitamina C utilizada como tratamento complementar ao pamidronato dissódico pode reduzir a dor, melhorar a formação do colágeno, a qualidade óssea e a qualidade de vida em crianças com OI?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Morfofisiologia do tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido vivo e metabolicamente ativo, suas funções são: fornecer sustentação ao corpo humano, proteção a órgãos intracavitários, hematopoiese, regulação da homeostase mineral e servir como reservatório para minerais e fatores de crescimento. Estruturalmente, os ossos são compostos por osso cortical e esponjoso, que embora tenham a mesma matriz óssea, apresentam diferenças importantes quanto a densidade ou porosidade, a atividade metabólica e a estrutura tridimensional²⁷.

O osso cortical é formado principalmente por osteons, um dos quatro tipos de apresentação do osso lamelar. Consistem em cilindros longitudinais que acompanham paralelamente o osso cortical. Esta orientação longitudinal faz com que o osso cortical seja mais forte e resistente às fraturas. Os osteons são formados por lamelas concêntricas ao redor do canal central de Havers. No interior do canal de Havers, encontram-se veias, artérias e nervos. Os canais de Volkmann são canais oblíquos que ligam o periósteo ao espaço medular ósseo²⁷. O periósteo é um tecido que possui inervação sensorial recobrimdo toda a superfície externa do osso, com exceção das extremidades ósseas articulares. Além de servir como local de inserção tendínea e ligamentar, suas artérias contribuem para a vascularização do terço externo do osso cortical. O periósteo possui duas camadas, a camada fibrosa e a camada de transformação osteogênica, onde se localizam as células osteoprogenitoras e os osteoblastos responsáveis pela formação óssea (Figura 1)²⁷.

O tecido ósseo é composto de células que são originadas de duas linhas: as células osteoprogenitoras (provenientes da linhagem de células tronco mesenquimais) e os osteoclastos (originados do tecido hematopoiético). As células osteoprogenitoras são as responsáveis pela formação das células ósseas. Estas células permanecem indiferenciadas até que recebam um sinal para migrarem e se diferenciarem em osteoblastos, células formadoras do tecido ósseo que sintetizam e secretam matriz óssea orgânica. A ativação dos osteoblastos acontece por ação de proteínas morfogenéticas ósseas e por ação do TGF- β ¹¹.

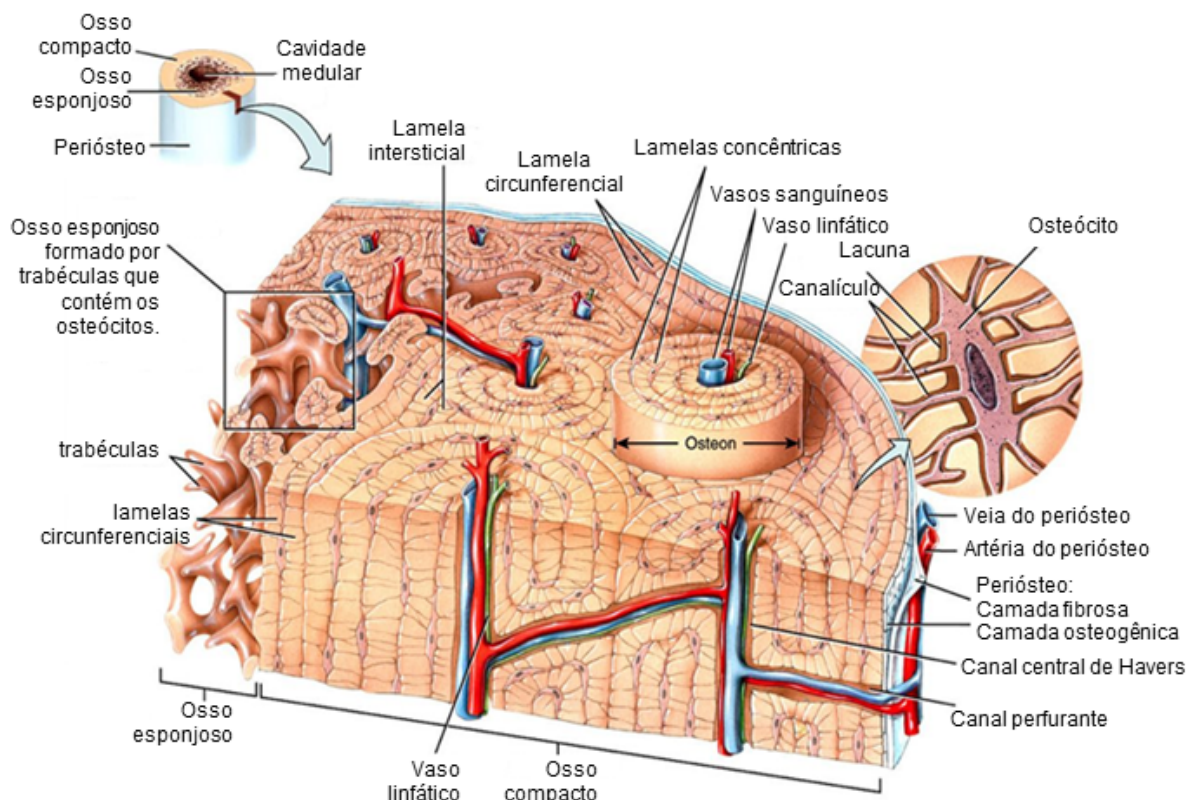


Figura 1 – Estrutura óssea.

A figura mostra o desenho de um osso longo com um detalhe em sua diáfise. Este detalhe é ampliado e revela os componentes do osso: o osso cortical com sua unidade estrutural básica (o osteon), o osso esponjoso e o periosteio.

Fonte: adaptado de John Wiley and Sons, Inc. (todos os direitos reservados)*.

Quando ativados, os osteoblastos podem assumir três condições distintas: permanecer como osteoblasto latente ou transformar-se em osteócito ou ainda retornar para a condição de célula progenitora. Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea e são responsáveis pela organização da mineralização do tecido ósseo, que ocorre dez ou quinze dias depois da secreção da matriz orgânica. Os osteócitos correspondem a 90% de todas as células ósseas. São responsáveis por conservar a matriz óssea e pela mediação da homeostase do cálcio²⁷.

Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas, que estão localizadas em pequenas depressões da superfície óssea, chamadas de lacunas de Howship.

* Disponível em: https://www.pearlywhisper.com/in_the_diagram_where_is_the_osteon.php;

Acesso em janeiro 2019.

Durante os processos de ossificação e remodelação, estas células podem estar presentes em planos mais profundos do tecido ósseo. Os osteoclastos são células reabsortivas e podem apenas reabsorver osso mineralizado. A formação e atividade dos osteoclastos são reguladas por vários fatores e por interleucinas, como o TNF, a IL-1 β e a IL-6, o paratormônio, a vitamina D, a calcitonina, entre outros²⁷. Os osteoclastos possuem uma borda em escova que permite a adesão à matriz óssea. O osteoclasto solubiliza esta matriz através da acidificação, permitindo que a fagocitose aconteça. Com isto há a liberação do TGF- β da matriz celular (que foi secretado previamente pelo osteoblasto junto com a formação da matriz) com sua consequente ativação. O TGF- β ativado estimula o osteoblasto a produzir novamente matriz orgânica. A remodelação óssea é o processo de reabsorção e substituição óssea realizado pela ação conjunta de osteoblastos e osteoclastos. O resultado final de cada um destes ciclos é a produção de novos osteons e de osso trabecular²⁷.

1.1.2 Formação do Colágeno tipo I

O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural dos ossos, tendões, ligamentos, pele, dentina e esclera^{1,19}. A biossíntese do colágeno tipo I é complexa. As células responsáveis por sua formação são os osteoblastos, os fibroblastos da pele e os tenócitos¹⁹. No osteoblasto, o colágeno é sintetizado como uma molécula de pró-colágeno através da ação dos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso (rER) que fazem a transcrição dos genes COL1A1 e COL1A2. Cada um destes genes dará origem às cadeias alfa-1 e alfa-2, respectivamente (Figura 2)¹⁹. O colágeno tipo I é um heterotrímero que contém duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2. Estas cadeias formam uma hélice tripla contendo a repetição glicina-X-Y. A glicina é o único resíduo que se encaixa na hélice e isso ocorre a cada terceira posição^{3,13}. As posições X e Y podem conter qualquer aminoácido, mas geralmente estão ocupadas pela prolina e pela 4-hidroxiprolina, respectivamente²⁸. Resíduos de prolina e lisina ao longo da hélice são hidroxilados pela prolil-4-hidroxilase 1 (P4H1), lisil-hidroxilase 1 (LH1), lisil-hidroxilase 2 (LH2) e galactosiltransferase (GLT)^{3,19}. Este processo de hidroxilação é responsável pela estabilidade da hélice. Ainda durante a formação das cadeias do pró-colágeno, moléculas guia (conhecidas como Serpin 1) se prendem às cadeias alfa-1 para evitar a formação precoce da hélice¹⁹.

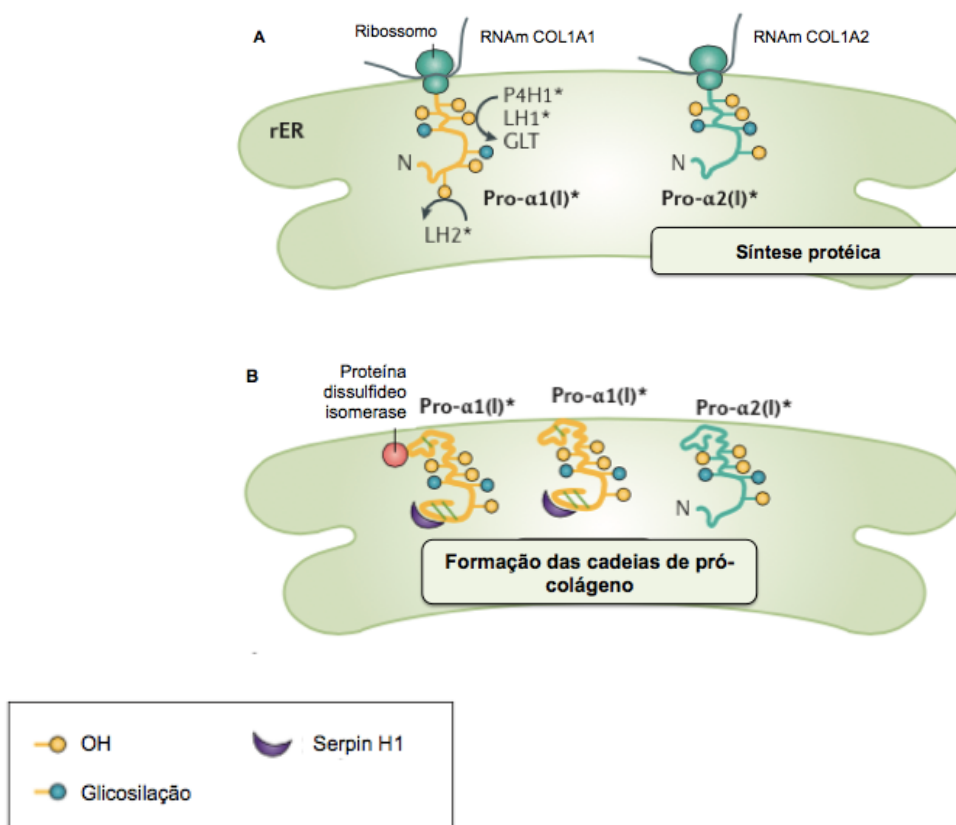


Figura 2 – Síntese do colágeno.

A figura A mostra a síntese do colágeno que acontece no retículo endoplasmático rugoso (rER). Os ribossomos transcrevem as informações contidas no RNA mensageiro (RNAm) dos genes COL1A1 e COL1A2. Observe a ação das enzimas (P4H1, LH1, GLT e LH2) sobre os grupos hidroxila (OH). A figura B mostra as duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2 formadas e as moléculas guia (Serpin1) presas às cadeias alfa-1. *Mutações nos genes que codificam estas proteínas estão associadas a OI. Fonte: adaptado de Marini et al, 2017¹⁹.

Cada molécula de pró-colágeno apresenta em sua extremidade um propeptídeo glomerular C-terminal ou N-terminal, também conhecido como peptídeo de registro (Figura 3)³.

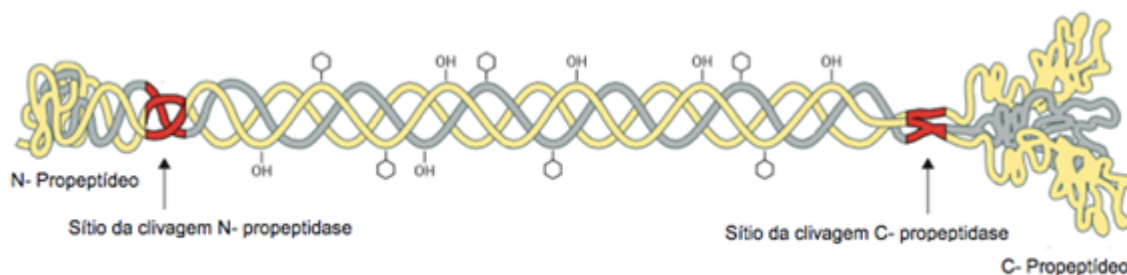


Figura 3 – Esquema da estrutura do pró-colágeno.

A figura mostra os peptídeos de registro terminais e o sítio de clivagem dos mesmos. A tripla hélice do pró-colágeno é constituída por duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2, locais onde ocorrem as mutações que levam à OI. Os hexágonos representam moléculas de açúcar ligadas aos resíduos de lisina-hidroxilase. OH é o grupo hidroxila ligada aos resíduos de prolina ou lisina. Fonte: adaptado de Forlino et Marini, 2015³.

Inicialmente os propeptídeos C-terminal ficam presos à membrana do rER e são os responsáveis por orientar a formação da tripla hélice. A proteína de ligação FKBP65 também atua neste momento, auxiliando a organização das cadeias de pró-colágeno (Figura 4)¹⁹.

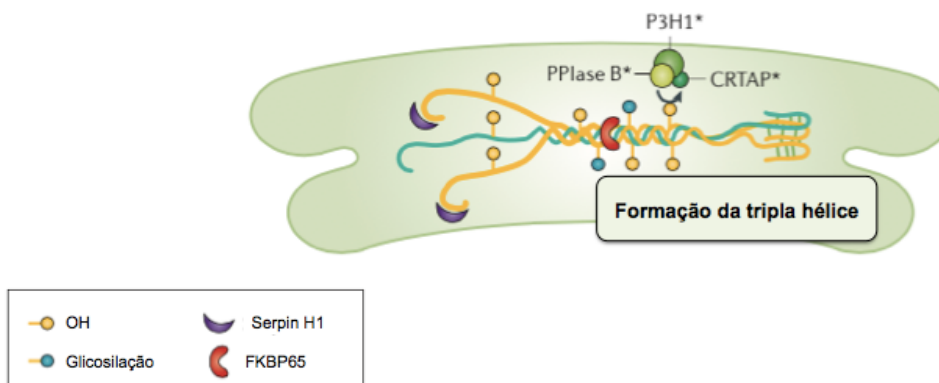


Figura 4 – Formação da tripla hélice.

A figura mostra a formação da tripla hélice com auxílio da ação da proteína de ligação FKBP65. A partir deste momento a hidroxilação acontece pela ação do complexo P3H1, CRTAP e PPIase B. *Mutações nos genes que codificam estas proteínas estão associadas a OI.

Fonte: adaptado de Marini e colaboradores, 2017¹⁹.

A hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina continua, seguindo a direção da formação da tripla hélice. Esta hidroxilação acontece por ação de um complexo enzimático formado pela proli-3-hidroxilase-1 (P3H1), pela CRTAP e pela peptidil-prolil-cis/trans isomerase B (PPIase B)¹⁹. Além disso, a prolil-4-hidroxilase também desempenha um papel fundamental no dobramento das cadeias do pró-colágeno em colágeno de tripla hélice²⁹. Quando a hélice está praticamente pronta, o propeptídeo N-terminal passa a fazer parte da molécula de pró-colágeno. A partir deste ponto, esta molécula segue em direção ao complexo golgiense, responsável por sua exocitose (Figura 5)¹⁹. No meio extracelular, os peptídeos de registro são removidos por ação da desintegrina-metaloproteinase com um domínio idêntico à tromboespondina 2 (ADAMTS2) e da proteína óssea morfogenética 1 (BMP1) e então, o pró-colágeno passa a ser chamado de colágeno maduro¹⁹. Depois deste processo, as hélices do colágeno estão prontas para formar as fibrilas do tecido conectivo e serão estabilizadas posteriormente por *crosslinks*^{3,19}.

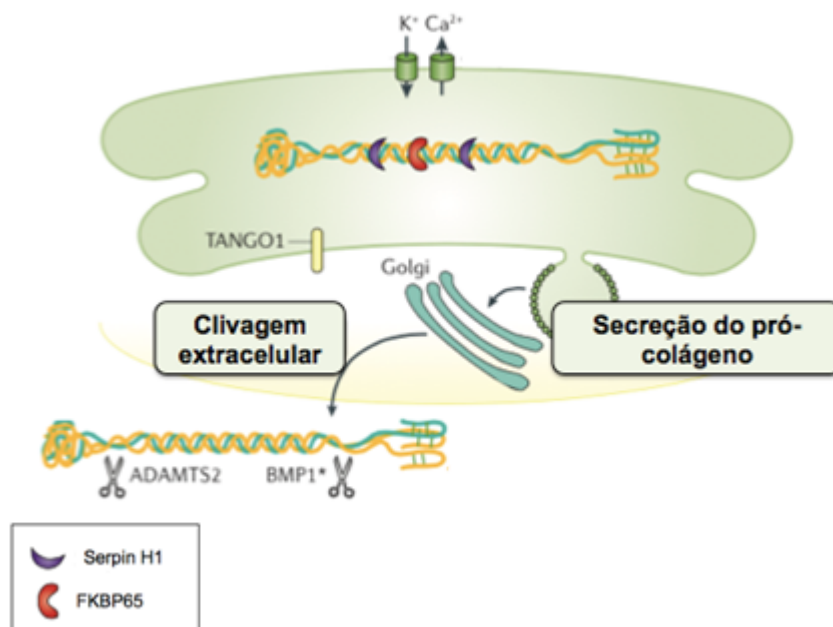


Figura 5 – Secreção e clivagem do pró-colágeno.

A figura mostra a secreção do pró-colágeno para o meio extracelular através da ação do complexo golgiense. No meio extracelular, ocorre a clivagem da molécula do pró-colágeno através da ação de ADAMTS2 e da BMP1.

Fonte: adaptado de Marini et al, 2017¹⁹.

Os defeitos estruturais mais comuns no colágeno tipo I e que causam a OI são as substituições da glicina que atrasam a formação da tripla hélice. As substituições laterais na cadeia alfa-1 (do tipo ramificação ou adição) alteram a estabilidade da hélice e são predominantemente letais, enquanto que as substituições na cadeia alfa-2 normalmente não o são. O colágeno que possui um defeito estrutural (qualitativo) leva a alterações mais graves do metabolismo intracelular e da estrutura da matriz óssea nos pacientes com OI, do que apenas o defeito quantitativo. As alterações intracelulares associadas à matriz óssea alterada faz com que a maturação dos osteoblastos seja prejudicada. Mutações que alterem a clivagem dos peptídeos de registro também causam OI³.

1.1.3 Hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um aminoácido não-essencial identificado no colágeno e possui duas formas isoméricas: a trans-3-hidroxi-L-prolina e a trans-4-hidroxi-L-prolina. A diferença entre estas duas formas está apenas na localização do grupo hidroxila. Na primeira forma, o grupo hidroxila está ligado ao carbono β e na segunda, ao carbono γ . A hidroxiprolina é um componente importante do colágeno e

está ligado a sua síntese e estabilidade. Nos casos em que a hidroxiprolina está modificada, encontra-se alteração do tecido conectivo e aumento do risco de lesão vascular²⁹.

A hidroxiprolina é sintetizada no rER através da hidroxilação da prolina pela ação das hidroxilases. Os aminoácidos trans-3-hidroxi-L-prolina e trans-4-hidroxi-L-prolina são sintetizados através da hidroxilação dos resíduos de prolina pelas enzimas prolil-3-hidroxilase e prolil-4-hidroxilase respectivamente. A hidroxilação acontece com auxílio de alguns cofatores como o íon ferroso, a vitamina C e o α -cetoglutarato^{29,30}. A vitamina C ativa as enzimas e as mantém em seu estado agregado, permitindo sua ação³⁰.

Como a hidroxiprolina é amplamente restrita ao colágeno, a mensuração dos níveis de hidroxiprolina pode ser usada como um indicador do conteúdo de colágeno. Condições que aumentam a renovação do colágeno podem elevar os níveis de hidroxiprolina no soro e na urina²⁹. Um estudo clínico verificou o efeito da suplementação com múltiplos micronutrientes, incluindo a vitamina C, em crianças com idades entre 8 e 12 anos durante 6 meses e mostrou que, em comparação com o placebo, as crianças suplementadas tiveram um elevado teor de hidroxiprolina no soro, e um conteúdo mineral ósseo e densidade de massa óssea mais elevadas³¹.

Por outro lado, a degradação do colágeno também pode ser monitorada pela liberação da hidroxiprolina³². No caso de doenças do colágeno (hereditárias ou não), onde há lesão do tecido conectivo, observa-se o aumento da hidroxiprolina excretada na urina²⁹. A secreção da hidroxiprolina ocorre como resultado da degradação extracelular. Ainda, a hidroxiprolina urinária serve também como marcador da reabsorção óssea. Uma vez liberada do tecido ósseo, a hidroxiprolina não pode ser novamente utilizada e é excretada pela urina³³. A hidroxiprolina geralmente é mensurada no exame de urina de 24 horas e o paciente deve ficar dois dias antes do exame sem consumir substâncias que contenham colágeno (como a gelatina)³³. Em seres humanos adultos e saudáveis, as concentrações de hidroxiprolina ligada às proteínas no soro são estáveis. Os níveis de hidroxiprolina livre aumentam consideravelmente após a ingestão de colágeno e retornam aos valores basais após cerca de 24 horas de restrição alimentar³². Noventa por cento da hidroxiprolina urinária consiste em hidroxiprolina dialisada ao invés de hidroxiprolina livre. Os outros dez por cento representam a hidroxiprolina não dialisada (com moléculas maiores do que 5.000 daltons), correspondem ao pró-

colágeno tipo I com o propeptídeo N-terminal e refletem a recente síntese do colágeno³³.

1.1.4 Osteogênese Imperfeita

A Osteogênese Imperfeita é uma doença genética rara e sua incidência é desconhecida, estima-se um caso para cada vinte mil nascimentos. É possível que este número seja maior (um caso para cada dez mil nascimentos) se forem incluídos os casos não diagnosticados de OI leve^{1-5,19}. Não há predileção por etnia ou sexo^{19,34}. É uma doença hereditária do tecido conectivo caracterizada por osteopenia e propensão a fraturas decorrentes de traumas de baixa energia^{1,3,19,34}. Até 2006, acreditava-se que a OI era uma doença exclusivamente autossômica dominante, causada por mutações nos genes responsáveis pela formação do colágeno tipo I (COL1A1 e COL1A2), localizados nos cromossomos 7 e 17^{1,3,7}. A primeira mutação recessiva foi identificada em 2006, época em que as pesquisas genéticas sobre a OI avançaram e apresentaram novos conhecimentos sobre a doença³. Além disso, em 2006, também foram descobertas mutações em genes relacionados ao colágeno, fato este que explica a heterogeneidade da doença¹⁹. Em 2017, Marini e colaboradores afirmaram que as mutações podem ocorrer nos genes responsáveis pela síntese do colágeno (COL1A1 e COL1A2) e em genes envolvidos nas modificações pós-translacionais e no processamento e *crosslinks* do colágeno (CRTAP, P3H1, PPIB, SERPINH1, FKBP10, PLOD2, BMP1), além de genes responsáveis pela mineralização óssea (IFITM5 e SERPINF1) e diferenciação e função dos osteoblastos (SP7, TMEM38B, WNT1, CREB3L1, SPARC, MBTPS2)¹⁹. As mutações gênicas podem levar a alterações quantitativas ou qualitativas do colágeno ou a associação destas variações¹. As mutações que envolvem as substituições da glicina nas cadeias do colágeno resultam em alterações qualitativas e consequentemente piores manifestações clínicas⁴. Algumas das formas mais graves da doença e dos casos de letalidade estão relacionados às mutações recessivas que ocorrem nos genes da CRTAP e da prolil-3-hidroxilase^{7,8}.

O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural dos ossos, tendões, ligamentos, pele, dentina e esclera¹. Na OI, estes tecidos são defeituosos devido às alterações que ocorrem no colágeno tipo I. A principal característica clínica desta doença é a fragilidade óssea decorrente da osteopenia. Os pacientes apresentam

fraturas causadas por traumas de baixa energia e podem apresentar fraqueza muscular, frouxidão ligamentar, baixa estatura, deformidades nos ossos longos e tórax (pectus carinatum), escoliose e cifose. A face pode ter aspecto triangular. Manifestações extra-esqueléticas também podem estar presentes, como a esclera azulada, a perda da audição e a alteração dentária (dentinogênese imperfeita) (Figura 6)^{1,3,4,9,19}. O fenótipo dos pacientes difere substancialmente, variando de quadros leves com poucas fraturas até o óbito intra-útero nos casos mais graves da doença^{10,11}.

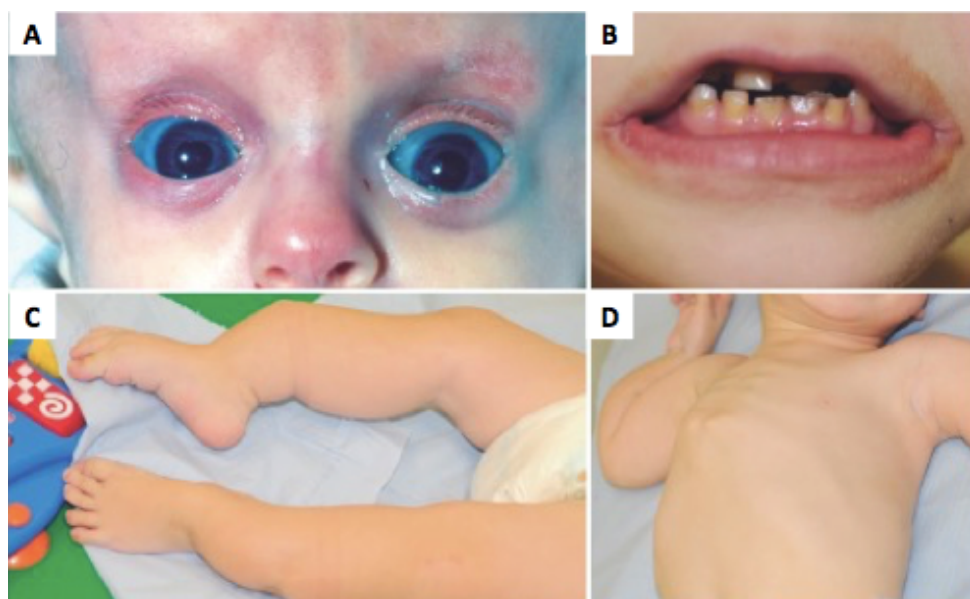


Figura 6 – Características clínicas de paciente portador de OI.

A figura mostra as características clínicas de paciente portador de OI. Na imagem A, observa-se a esclera azulada enquanto que na imagem B, a dentinogênese imperfeita. Na imagem C, observa-se as deformidades das tíbias e na imagem D, a deformidade torácica.
Fonte: adaptado de Marini e colaboradores, 2017¹⁹.

Nos países em desenvolvimento, o diagnóstico da OI é clínico na maioria das vezes. A presença de histórico familiar e da identificação das alterações clínicas características da doença ajudam a fechar o diagnóstico³. No Brasil, não é comum a avaliação genética para identificação do gene acometido e para confirmação do diagnóstico. Crianças com OI grave apresentam alterações no ultrassom pré-natal, com deformidades angulares nos ossos longos e fraturas já identificados no primeiro e segundo trimestres da gestação⁴. A completa falta de mineralização do crânio e a presença de hérnias viscerais é incompatível com a vida. Outro fator que está associado a maior letalidade é a angulação maior do que 90 graus das tíbias no exame de ultrassom⁷. Estudos radiológicos também auxiliam no diagnóstico.

Fraturas em estágios de consolidação diferentes, má qualidade óssea, osteoporose e deformidades de ossos longos também são indicativos de OI (Figura 7). Pacientes portadores de OI também podem apresentar ossos wormianos (ou ossos acessórios localizados nas suturas cranianas) no raio-X de crânio⁷.



Figura 7 – Estudo radiográfico de paciente portador de OI.

A figura mostra a imagem radiográfica de um menino com dois dias de vida, portador de OI. A criança apresenta deformidade dos ossos longos dos membros inferiores (setas vazadas), resultante de fraturas intra-útero, além de calo ósseo em sétimo arco costal direito (seta larga).

Fonte: Hoyer-Kuhn et al, 2015⁴.

A OI apresenta uma grande variedade de fenótipos e foi inicialmente classificada por Sillence em quatro tipos clínicos¹². O tipo I tem herança autossômica dominante e é caracterizada por esclera azulada, poucas deformidades ósseas e estatura normal ou próxima do normal. A fragilidade óssea é leve a moderada e os pacientes podem ou não apresentar dentinogênese imperfeita. O tipo II apresenta herança autossômica recessiva ou dominante e é a forma mais grave da OI, causando o óbito perinatal. O tipo III apresenta herança autossômica recessiva e é a forma mais grave de OI compatível com a vida. Apresenta fragilidade óssea importante, com fraturas frequentes, deformidades ósseas e baixa estatura. O tipo IV é decorrente de herança autossômica dominante e apresenta fragilidade óssea moderada com estatura próxima do normal. Pode ou não apresentar dentinogênese imperfeita^{5,12,13,34}.

A classificação de Sillence foi amplamente utilizada por mais de duas décadas, mas com o surgimento dos testes genéticos foram identificadas uma grande variedade de mutações e novos tipos de OI foram descritos, sendo que novas classificações estão sendo apresentadas e discutidas^{11,14,19}. Marini e colaboradores publicaram em 2017 a versão mais recente da classificação genética, subdividindo a doença em dezoito tipos. Nesta classificação, os tipos I, II, III e IV são provenientes da clássica classificação de Sillence e estão relacionadas aos defeitos de COL1A1 e COL1A2. Os tipos V e VI são decorrentes de um defeito nos genes relacionados à mineralização óssea, enquanto que os tipos VII, VIII e IX estão associados aos genes responsáveis pelas modificações pós-translacionais do colágeno. Os tipos X, XI e XII estão associados ao comprometimento de genes responsáveis pelo processamento e *crosslinks* do colágeno e os tipos XIII a XVIII, aos genes associados à função dos osteoblastos¹⁹.

1.1.4.1 Dor na Osteogênese Imperfeita

A dor é um sintoma comum nos pacientes com OI, podendo ser aguda ou crônica. Pacientes portadores de OI podem relatar dor após uma fratura ou tratamento cirúrgico ortopédico, mas também podem apresentar queixas de dor não relacionada a episódios traumáticos. A cronicidade está relacionada a dor musculoesquelética ou após vários episódios de fraturas². Doenças relacionadas com alteração do colágeno, como Ehlers-Danlos, Marfan e OI, são frequentemente associadas a dor musculoesquelética e existe uma hipótese que a dor esteja associada ao colágeno de má-qualidade². As deformidades musculoesqueléticas decorrentes da consolidação inadequada das fraturas também pode levar a dor crônica⁵. Além disso, pacientes com OI podem queixar-se de cefaleia por impressão basilar, que é caracterizada por uma invaginação da junção craniovertebral e um pescoço curto com posição anormal da cabeça¹⁵.

Embora evidências sugiram que a dor seja um sintoma comum, poucos estudos abordam a prevalência ou as características da dor na OI. Zack e colaboradores publicaram em 2005 o primeiro estudo sobre dor em crianças com OI e descreveram as características da dor aguda e crônica nestes pacientes. A dor aguda (relacionada à fratura) é de maior intensidade e mais frequente quando comparada à dor crônica. Neste estudo, 30% dos pacientes queixaram-se de dor

não relacionada à fratura, cuja localização foi preferencialmente em terço distal da perna, região anterior da coxa e dor lombar¹⁵. Em 2015, Abdelaziz relatou que vários mecanismos podem contribuir para a presença da dor em pacientes portadores da OI. Múltiplas fraturas, lesão do periósteo, compressão vertebral e da raiz nervosa, artrose, fraqueza muscular e alterações inflamatórias decorrentes da fratura e de um processo de consolidação anormal podem levar à dor¹⁵. Além destes mecanismos, é bem estabelecido por meio de pesquisas em modelos animais, que a atividade e a diferenciação aumentada dos osteoclastos (células responsáveis pela reabsorção óssea) facilitam o processamento nociceptivo¹⁵.

A presença da dor está, em parte, relacionada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e o TNF¹⁶. Estas citocinas são responsáveis pela diferenciação e ativação dos osteoclastos. A diferenciação ocorre através da ação do TNF e do fator de diferenciação do osteoclasto (ODF) por meio da ativação do Receptor Ativador do Fator Nuclear B (RANK, é um membro da superfamília dos receptores do TNF localizado no osteoclasto, ativado pelo ODF). A ativação do osteoclasto e sua sobrevivência estão associadas à presença da IL-1 β . O aumento do TNF também leva ao aumento da atividade do osteoclasto (promovendo reabsorção óssea) e ainda, atua inibindo a diferenciação dos osteoblastos e induzindo a apoptose destas células^{17,18}. As citocinas IL-6 e IL-7 e o TGF- β também são indutores da formação dos osteoclastos e da reabsorção óssea, enquanto que a IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 e o IFN- γ inibem a formação dos osteoclastos e a reabsorção óssea¹⁸.

Um estudo realizado por Nagae e colaboradores relatou que os osteoclastos remodelam a estrutura óssea em meio ácido, originado através da secreção de íons hidrogênio (prótons) durante a reabsorção¹⁶. O meio ácido é reconhecido como uma das causas de dor. Segundo Nagae, duas classes principais de nociceptores são sensíveis ao ácido: os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) e o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), presentes nos neurônios sensoriais que inervam o periósteo. Estes nociceptores desencadeiam a dor através da ativação destes canais por prótons, produzidos pelos osteoclastos^{16,22}. Ainda, a liberação de todas as citocinas pró-inflamatórias descritas anteriormente, sensibilizam os nociceptores e reduzem o limiar de ativação dos canais iônicos: ASIC e TRPV1, culminando em um aumento da dor no tecido ósseo¹⁸.

A presença da dor crônica ou aguda recorrente leva a um aumento do impacto negativo que a doença causa nestes pacientes. A dor decorrente de fratura, deformidade ou qualquer um dos mecanismos descritos anteriormente, leva também a um sofrimento psicológico e emocional que na maioria das vezes não é mensurado clinicamente e, muito menos, tratado. A diminuição do convívio escolar e social, a limitação das atividades quotidianas e os distúrbios do sono, afetam a qualidade de vida e representam um fardo significativo para as crianças e seus familiares^{2,5,15}.

1.1.4.2 Tratamento da Osteogênese Imperfeita

Atualmente a osteogênese não apresenta cura e muitas terapias são aplicadas para diminuir o número de fraturas, auxiliar as atividades de vida diária e melhorar a qualidade de vida³⁵. O principal objetivo médico do tratamento dos pacientes portadores de OI é melhorar a qualidade óssea para evitar que fraturas e deformidades ósseas ocorram, possibilitando o ortostatismo, a marcha e consequentemente a melhora de todo o sistema musculoesquelético^{8,34}. O tratamento deve ser multidisciplinar e geralmente consiste em acompanhamento ortopédico, endocrinológico e fisioterapêutico, dentre outras especialidades, se for necessário^{3,4}.

O tratamento ortopédico inclui a prevenção de deformidades, evitando as fraturas através da melhora da função do sistema musculoesquelético. A prescrição de fisioterapia é fundamental para melhora da qualidade óssea, diminuindo o número de fraturas³⁶. A combinação de fragilidade óssea, fraqueza muscular, ciclos de fraturas e diminuição do uso do sistema musculoesquelético cria uma situação cheia de desafios para a aquisição e manutenção de habilidades motoras, principalmente a deambulação. O tratamento fisioterapêutico focado no ganho de força muscular e amplitude de movimento são cruciais para maximizar as funções individuais e a independência. Nos pacientes com acometimento mais grave, o objetivo é permitir uma melhora dos cuidados pessoais, facilitar as transferências (entre a cadeira de rodas e a cama, por exemplo) e ganhar habilidades necessárias para uma vida independente^{3,35}.

Nos casos graves, o ortostatismo e a deambulação só serão alcançados após a correção das deformidades dos membros inferiores. Para tanto, as

osteotomias e a fixação com hastes intramedulares são necessárias^{37,38}. Embora não melhorem a qualidade óssea, as hastes auxiliam na reabilitação, permitem suporte interno para a consolidação após a fratura, previnem desvios e deformidades nas futuras fraturas e interrompem os ciclos de fratura e desuso ósseo que levam a piora da qualidade óssea^{3,8,35}.

O tratamento medicamentoso vem sendo tentado há décadas e várias substâncias já foram prescritas com o objetivo de melhorar a qualidade óssea. Historicamente existem relatos de administração de hormônios sexuais e do crescimento, fluoreto de sódio, calcitonina, óxido de magnésio e vitaminas D e C isoladamente, com pouco ou nenhum sucesso¹⁰.

A mudança mais significativa no tratamento medicamentoso da OI foi feita com a introdução dos bisfosfonados³⁵. O primeiro estudo sobre a utilização de bisfosfonados foi publicado por Devogelaer e colaboradores em 1987⁸. No início dos anos 90, Astrom e Soderhall demonstram os efeitos positivos dos bisfosfonados e revolucionaram o tratamento da osteogênese⁶. Os bisfosfonados são drogas antirreabsortivas sintéticas análogas ao pirofosfato e são amplamente utilizados em crianças com OI. Os bisfosfonados se depositam na superfície óssea, são endocitados pelos osteoclastos e induzem a apoptose destas células. O tratamento objetiva o aumento da massa óssea através da neutralização do *turnover* ósseo. Com a utilização dos bisfosfonados o osso ainda apresentará alteração do colágeno, mas o aumento do volume ósseo (mesmo com defeito da matriz) aumentará a força e a resistência óssea. A meia-vida dos bisfosfonados é longa e os efeitos da medicação sobre o osso persistem por anos após o término do tratamento³. Os bisfosfonados aumentam a massa óssea, diminuem o número de fraturas, melhoram o crescimento, a massa muscular e a mobilidade³⁴. A administração de bisfosfonado deve ser feita durante a infância porque o esqueleto está em desenvolvimento e o potencial para influenciar os ossos é maior. Após a puberdade, o *turnover* ósseo diminui e o tratamento medicamentoso pode ser suspenso^{4,8}.

Em 1998 e 2002, Glorieux relatou que o pamidronato (o bisfosfonado mais estudado) mostrou melhora significativa no aumento da densidade óssea, espessura cortical e diminuição do número de fraturas^{39,40}. Atualmente, o pamidronato dissódico é a medicação de escolha para o tratamento da OI. É um bisfosfonado de segunda geração que contém nitrogênio e permite o aumento da densidade óssea e, consequentemente, reduz o número de fraturas^{20,21}. São mais potentes do que os

bisfosfonados de primeira geração e restringem a ação dos osteoclastos através da inibição da enzima farnesil-pirofosfato-sintase. A supressão desta enzima nos osteoclastos leva a uma desorganização da célula, que induz a apoptose celular²⁰. Com a diminuição da atividade dos osteoclastos, o *turnover* ósseo diminui e há um aumento da massa óssea, diminuição do número de fraturas e foi relatado também, diminuição nos níveis de dor^{2,4,8,16,22}. A administração prolongada de pamidronato reduz significativamente a reabsorção óssea, mantendo o volume do osso trabecular e a estrutura óssea²³.

Neste sentido, estudos clínicos sugerem que o uso de drogas inibidoras de osteoclastos, como os bisfosfonados, possa reduzir o nível de dor nestes pacientes^{4,8,22,39}. Além de atuar sobre os osteoclastos, o pamidronato regula negativamente as MMPs, induzidas pelo TNF²³. O TNF é a principal citocina pró-inflamatória que age diretamente promovendo a diferenciação do osteoclasto, resultando em reabsorção óssea acelerada *in vivo* e *in vitro*¹⁸. Nos processos inflamatórios, a presença de TNF faz com que os osteoblastos produzam citocinas que causam inflamação, angiogênese e degradação celular através da ação das enzimas que degradam a matriz (como a MMP-9), criando um ciclo vicioso de apoptose e degradação celular. O pamidronato bloqueia o TNF e impede que as MMPs atuem. O mecanismo pelo qual o pamidronato inibe diretamente o TNF ainda não está esclarecido e mais estudos são necessários neste sentido²³. Ainda, com o uso do pamidronato, a produção de IL-1 β e IL-6, secretadas após a degeneração celular, também diminui²³. Apesar dos relatos de redução da dor com o uso de bisfosfonados, este ainda é um sintoma relatado na prática clínica, assim, se faz necessária a investigação de terapias complementares, como proposto neste estudo.

1.1.5 Vitamina C

A vitamina C é uma molécula hidrossolúvel, facilmente absorvida pelo organismo, mas não armazenada. O organismo humano também não é capaz de sintetizá-la e por este motivo a vitamina C deve ser administrada na dieta^{24,41,42}. Nos humanos, a deficiência da gulonolactona oxidase, impede a síntese do ácido L-ascórbico a partir da glicose⁴¹. A vitamina C é absorvida no intestino delgado e as concentrações plasmáticas alcançam um pico em 120 a 180 minutos após a

ingestão⁴³. A meia-vida é de 10 a 20 dias⁴⁴. Estudos utilizando vitamina C marcada por radioisótopos preveem que as reservas corporais em humanos saudáveis é de aproximadamente 1.500 mg⁴³. Não existe na literatura consenso com relação à dosagem ideal de vitamina C para a saúde humana. Sugere-se que a ingestão de 100 a 200 mg por dia forneceria um *status* adequado de saturação plasmática em indivíduos saudáveis^{26,41,45}. Nas crianças abaixo dos doze meses, a dose de vitamina C varia entre 40 e 50 mg por dia. Nas crianças maiores de um ano, a dose é de 15 a 65 mg por dia⁴⁶. Doses acima de 1.000 mg/dia resultam em menos de 50% de absorção e a vitamina C que não for metabolizada é excretada nas fezes e na urina⁴⁷. No entanto, situações especiais como infecções, processos cirúrgicos, gravidez e tabagismo necessitam de doses altas para normalizar a saturação plasmática de vitamina C⁴¹. Pauling, ganhador do Prêmio Nobel e estudioso da vitamina C, recomendava doses elevadas desta vitamina para combate a resfriados, gripes e outras viroses, bem como na prevenção do câncer e outras doenças degenerativas⁴². Muitos efeitos benéficos são observados com altas concentrações de vitamina C, mas tais níveis podem ser tóxicos aos humanos. O excesso de vitamina C (altas doses) pode levar a geração de radicais livres que podem danificar as células. O excesso de vitamina C pode levar à erosão do esmalte dentário, alterações gastrointestinais, deficiência de vitamina B12, altos níveis de ferro e ácido úrico no organismo⁴⁸.

A vitamina C tem papel fundamental na manutenção dos tecidos sadios, é conhecida por sua função antioxidante prevenindo a ação oxidativa sobre o DNA, as proteínas e a parede celular^{24,43}. Além disso, tem função imunoestimulatória e anti-inflamatória e é importante na defesa do organismo contra infecções, auxiliando na regulação da resposta imune aos patógenos^{41,48}. Estudos sugerem que tanto a resposta imune mediada por células como a resposta imune humoral são aprimoradas com a suplementação desta vitamina. A vitamina C aumenta a atividade das células exterminadoras naturais (*natural killer*) e eleva os níveis de anticorpos no plasma sanguíneo⁴⁸.

Outra função muito importante da vitamina C é a estabilização do colágeno²⁴. O colágeno, como já descrito anteriormente, é uma estrutura presente em vários tecidos do corpo, como na esclera, dentes, ligamentos, tendões e ossos. Na presença de um colágeno de má-qualidade, as estruturas que o contém tornam-se defeituosas. O colágeno é o componente principal da matriz óssea e contém altas

proporções de hidroxiprolina, fundamental para estabilizar a sua estrutura helicoidal⁴⁹. A vitamina C é essencial para a atividade de enzimas como a P4H1, que utiliza a molécula de oxigênio e o íon ferroso para catalisar a hidroxilação da prolina, fundamental para manter a estabilidade do colágeno (demonstrado na Figura 2). A vitamina C age como um agente redutor, sendo especialmente adequada para a redução do íon férrico a ferroso⁴¹.

O primeiro relato científico sobre o uso da vitamina C em pacientes com OI foi publicado na revista *The Lancet* por Winterfeldt em 1970. O autor relacionou o uso do ácido ascórbico (vitamina C) e o número de fraturas em pacientes com OI. Foram avaliados dez pacientes portadores da doença, com idades entre cinco e 27 anos. Neste estudo, os pacientes receberam uma dieta pobre em hidroxiprolina e suplementação com um grama por dia de ácido ascórbico, pelo período de três meses. Como resultados, Winterfeldt observou uma diminuição da excreção urinária da hidroxiprolina (um indicador do metabolismo do colágeno), além de uma diminuição expressiva no número de fraturas. No período de tempo analisado, esperava-se a ocorrência de 20 a 22 fraturas e apenas cinco foram relatadas. O autor cita, ainda, que os pacientes do estudo não apresentaram complicações relacionadas ao uso da vitamina C⁴⁹.

Em 1974, outro estudo envolvendo suplementação com vitamina C foi publicado por Kurz. Foram avaliados 13 pacientes portadores de OI, com idades variando entre zero e 15 anos e que não recebiam nenhum tipo de tratamento para a doença. Estas crianças receberam entre 250 e 600 mg de vitamina C por dia, durante um período não especificado. Neste estudo pacientes relataram melhora da atividade física e do vigor físico durante o uso da vitamina C, além de apresentarem uma diminuição do número de fraturas⁵⁰.

Embora estes artigos tenham conseguido provar a relação entre a vitamina C e a melhora da qualidade óssea, não conseguiram mostrar o efetivo aumento da síntese ou melhora da qualidade do colágeno. Naquela época ainda especulava-se sobre a etiologia da OI e provavelmente, a partir da confirmação da etiologia genética, os estudos relacionando o uso da vitamina C e a melhora do colágeno em pacientes portadores de OI não foram mais publicados. Atualmente as pesquisas sobre este assunto associam a deficiência de vitamina C com a redução da síntese de colágeno, instabilidade estrutural de tecidos conectivos e até mesmo, com a hipótese de que a deficiência de vitamina C pode contribuir para a degeneração de

tecidos que contenham colágeno (como o disco intervertebral) e com a expressão exagerada das enzimas que quebram a matriz celular²³.

Um fator importante para a presente pesquisa é a avaliação da dor durante a suplementação com vitamina C visto que um número importante de estudos têm demonstrado suas propriedades analgésicas²⁶. A dor de causa musculoesquelética é frequente em pacientes com doenças do colágeno e é possível que a dor seja resultante de um tecido conectivo alterado. Mas poucas são as publicações que correlacionam a vitamina C com as doenças musculoesqueléticas e a dor²⁴. Em 1984, Ringsdorf relatou que a suplementação de vitamina C em altas doses diminuía a dor óssea em pacientes portadores de OI e doença de Paget. Neste estudo, o autor conclui ainda que, com o uso da vitamina C, pacientes portadores de OI apresentaram uma diminuição do número de fraturas quando comparadas ao período em que a suplementação com vitamina C não era realizada, provavelmente associada à melhora do colágeno⁵¹.

Além disso, no escorbuto, doença que ocorre devido à deficiência de vitamina C, a dor é um sintoma comum e apresenta-se principalmente no sistema musculoesquelético como artralgia em joelhos, tornozelos e punhos, bem como, a mialgia^{44,47}. As crianças com escorbuto, particularmente, sofrem de dor intensa em membros inferiores⁵². E há relatos médicos relatando casos de adultos e idosos que também experienciaram dor musculoesquelética^{53,54}. A dor no escorbuto parece ser devida primariamente ao sangramento no tecido musculoesquelético, que pode se tornar severamente debilitante, de maneira que incapacite a marcha destes pacientes⁴⁴. No entanto, a dor devido à deficiência de vitamina C pode ser completamente resolvida com suplementação por uma ou duas semanas, que irá resultar na saturação plasmática de vitamina C (por exemplo, ≥ 200 mg/dia)^{26,45}.

De maneira importante para a população do nosso estudo, foi demonstrado que traumas e cirurgias depletam significativamente as concentrações de vitamina C plasmáticas e a suplementação com doses maiores que 0,5 g/dia é necessária para a restauração do nível normal de vitamina C nestes pacientes⁵⁵. Ainda no campo ortopédico, a deficiência de vitamina C foi associada a dor reumática e na coluna lombar e cervical²⁴. A vitamina C exerce efeitos regulatórios sobre o sistema esquelético em células osteogênicas, condrogênicas e osteoblastogênicas^{26,46}. O mecanismo de ação da vitamina C nas células ósseas envolve o aumento ou a

redução da regulação da expressão de genes específicos, por meio da regulação de fatores de transcrição e marcadores epigenéticos^{26,46}.

Em um estudo clínico realizado em 16 pacientes com doença óssea de Paget (doença crônica causada pela excessiva reabsorção e formação do osso, gerando uma remodelação óssea desorganizada, enfraquecimento e deformação óssea, além de dor) mostrou que: a dose oral de 3 g/dia de vitamina C por duas semanas reduziu a dor em 50% dos pacientes e resultou em analgesia completa em 20% dos pacientes. E ainda, a excreção de hidroxiprolina foi aumentada posteriormente a administração de vitamina C, sendo ainda maior naqueles pacientes que relataram alívio completo da dor. Este artigo destacou o papel da vitamina C como um cofator para a ação da enzima hidroxilase, responsável pela síntese de colágeno⁵⁶.

Alguns estudos relatam a associação entre a vitamina C e a redução do uso de analgésicos opioides em pacientes com dor severa devido à metástase esquelética e dor pós-operatória⁵⁷⁻⁶¹. Cameron, no início dos anos setenta, demonstrou diminuição da dependência de opioides em cinco pacientes com câncer após o tratamento com vitamina C. De cinco a sete dias após a suplementação com vitamina C, quatro dos cinco pacientes avaliados ficaram completamente livres de dor e o quinto paciente precisou somente de metade da dose analgésica de opioide utilizada usualmente. Curiosamente, demonstrou-se que nenhum destes pacientes apresentou sintomas de dependência, apesar de terem recebido analgesia opioide por semanas ou meses^{57,58}.

Recentemente, um estudo administrou randomicamente uma dose oral única de vitamina C (2g) ou placebo em 80 pacientes, uma hora antes do paciente ser submetido à anestesia para uma colecistectomia. Nos pacientes suplementados com vitamina C ocorreu uma redução do consumo de morfina pós-operatória quando comparados ao grupo que recebeu placebo, embora não tenha ocorrido redução do escore de dor entre os dois grupos⁶². Estas e outras evidências da literatura apontam para uma aplicação potencial da vitamina C como uma terapia adjuvante para a redução de analgesia opioide e seus efeitos de dependência.

Ainda não existe um consenso sobre o mecanismo analgésico pelo qual a vitamina C atua. O estresse oxidativo e a inflamação são implicados na fisiopatologia de doenças do sistema musculoesquelético como artrite, síndrome da dor regional complexa, câncer e trauma cirúrgico. A vitamina C é um potente antioxidante, capaz

de eliminar uma série de espécies reativas de oxigênio e, com isso, proteger as células e tecidos do dano oxidativo⁶³. Este mecanismo, no entanto, é muito simplista devido às numerosas reações enzimáticas em que a vitamina C age como cofator, no ser humano⁶⁴. A vitamina C também exibe propriedades anti-inflamatórias, fornecendo uma redução de marcadores inflamatórios como a proteína C reativa e citocinas pró-inflamatórias (TNF, interferons e interleucinas)⁶⁵. Contudo, o mecanismo bioquímico pelo qual a vitamina C age como anti-inflamatório ainda permanece desconhecido²⁶.

A vitamina C tem papel já estabelecido na síntese de neurotransmissores catecolaminérgicos e por isso está envolvido na neuromodulação⁶⁶. É sabido que ela age como cofator para a enzima dopamina β -hidroxilase, a qual converte dopamina em norepinefrina e também facilita a síntese de dopamina através da reciclagem do cofator tetraidrobiopterina, que é requerido para a atividade da enzima limitante da síntese de dopamina, a tirosina hidroxilase^{67,68}. Ainda, um mecanismo similar à reciclagem da tetraidrobiopterina tem sido proposto para a ação da vitamina C na biossíntese de monoaminas, como a serotonina⁶⁹.

Embora a literatura apresente dados com relação à melhora da dor com o uso da vitamina C, não existem relatos que expliquem esse fenômeno e seu mecanismo em pacientes com OI em tratamento com pamidronato dissódico, fato este que demonstra a originalidade e o ineditismo deste estudo. Este estudo tem a intenção de observar se ocorre efeito analgésico, melhora da qualidade de vida e da qualidade óssea e entender alguns dos mecanismos de ação do tratamento com vitamina C. A hipótese do presente estudo é de que a vitamina C promove ação analgésica e redução do número de fraturas e consequentemente, melhora da qualidade de vida. Há ainda a hipótese que parte deste efeito está relacionado à maior síntese de colágeno e mecanismos anti-inflamatórios nos pacientes portadores de OI. Desta forma, espera-se contribuir para o entendimento do mecanismo de ação da suplementação com vitamina C em crianças com OI.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com vitamina C ou placebo na dor, na qualidade de vida, na inflamação, na síntese do colágeno e no *turnover* ósseo em pacientes portadores de osteogênese imperfeita em uso de pamidronato dissódico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o número de fraturas em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Avaliar quantitativamente e qualitativamente a dor em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Avaliar quantitativamente a qualidade de vida em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Quantificar os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β , IL-6 e MMP-9 e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Quantificar os níveis séricos de hidroxiprolina em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Quantificar os níveis séricos plasmáticos de TGF- β 1 em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo piloto de um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo.

3.2 POPULAÇÃO, LOCAL, TEMPO E AMOSTRA

A população escolhida para o estudo é o grupo de pacientes portadores de OI em acompanhamento com os serviços de ortopedia e endocrinologia pediátricos do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), em tratamento com o pamidronato dissódico, entre os meses de janeiro e dezembro de 2018. Neste período a população com osteogênese imperfeita em uso de pamidronato dissódico era de 62 pacientes. A amostra é de conveniência devido à raridade da patologia e devido ao fato do hospital escolhido ser referência estadual para o tratamento da OI. Todos os pacientes diagnosticados com OI, no estado de Santa Catarina, são encaminhados ao HIJG para avaliação com os serviços de ortopedia e endocrinologia pediátricos. O Serviço de Endocrinologia é responsável pela indicação e prescrição do tratamento medicamentoso com o pamidronato dissódico segundo o protocolo de Glorieux³⁹. São incluídos neste protocolo de tratamento, os pacientes com acometimento moderado a grave e/ou com fraturas de repetição decorrentes de traumas de baixa energia. A frequência de aplicação e a dose do pamidronato depende da idade que o paciente possui e a administração da medicação é feita por via endovenosa durante três dias. Pacientes menores de dois anos de idade recebem 0,5 mg/kg/dia de pamidronato a cada dois meses, pacientes que possuam entre dois e três anos de idade recebem 0,75 mg/kg/dia a cada três meses e os maiores de três anos de idade, 1 mg/kg/dia a cada quatro meses. A dose anual não deve ser superior a 9 mg/kg. Após quatro anos de uso da medicação, a administração do pamidronato passa a ser semestral na dose de 1 mg/kg/dia.

Os pacientes da amostra foram divididos em estratos baseados na idade. A escolha de estratificação por faixa etária deveu-se ao fato das escalas de dor (uma das formas escolhidas para a coleta de dados) serem específicas a determinadas

faixas etárias. Os estratos definidos segundo a faixa etária são: de zero a três anos e onze meses, quatro a sete anos e onze meses e acima de oito anos.

Os participantes foram alocados em dois grupos:

Grupo controle Placebo: pacientes portadores de OI que receberam tratamento padrão com pamidronato dissódico endovenoso e receberam placebo por via oral.

Grupo experimental Vitamina C: pacientes portadores de OI que receberam tratamento padrão com pamidronato dissódico endovenoso e foram suplementados com vitamina C por via oral.

A alocação nos grupos deu-se por meio de randomização feita através do site www.random.org/lists/. Após a randomização realizada pelo site, os números ímpares foram alocados no grupo Placebo e os pares, no grupo Vitamina C. Cada estrato por faixa etária tem um grupo controle e um grupo experimental. A pesquisadora não teve acesso ao conteúdo de cada grupo durante o período de coleta de dados.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os pacientes portadores de OI (tipos I, III e IV, segundo Sillence) e sem outras doenças associadas (conforme avaliação do prontuário médico), na faixa etária de zero a 18 anos, que realizaram ciclos a cada 2, 3, 4 ou 6 meses de tratamento com pamidronato dissódico endovenoso, no HIJG, entre janeiro e dezembro de 2018. O HIJG atende pacientes até a idade de 14 anos, 11 meses e 29 dias, mas esta idade é extrapolada em casos específicos (como no caso de alguns pacientes deste estudo) devido ao fato de serem pacientes que já acompanham na instituição e não terem outros serviços estaduais que possam dar continuidade ao tratamento após os 15 anos de idade.

Foram incluídos somente os pacientes que possuíam condições de administração de medicação por via oral.

Foram incluídos somente os pacientes que não utilizam analgésicos de uso contínuo, anti-inflamatórios de uso contínuo ou antidepressivos para controle da dor ou por outra indicação médica (conforme avaliação do prontuário médico).

A inclusão no estudo estava associada ao consentimento dos responsáveis destes pacientes para a participação nesta pesquisa após receberem informações

detalhadas sobre o projeto através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – apêndice A) e ao assentimento dos próprios pacientes (quando se fizer possível) através do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido I e II (TALE I e II – apêndices B e C). O assentimento dos pacientes não excluiu a obrigatoriedade do consentimento de seus responsáveis.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os participantes que não compareceram ao internamento para administração do pamidronato dissódico.

Foram excluídos os participantes que apresentaram suspensão temporária ou definitiva da administração do pamidronato dissódico durante o período de coleta de dados.

Foram excluídos os participantes que não tiveram amostras de sangue coletadas durante a primeira ou segunda coleta de dados.

Foram excluídos os participantes que não retornaram para a segunda coleta de dados.

Foram excluídos os participantes que utilizaram analgésicos de uso contínuo, anti-inflamatórios de uso contínuo e antidepressivos para controle da dor ou por outra indicação médica, após a primeira coleta de dados.

Foram excluídos os participantes que relataram a não suplementação adequada da vitamina C entre as coletas de dados.

3.5 COLETA DE DADOS

Os dados foram coletados durante a internação dos pacientes conforme a sequência de internação pré-estabelecida pelo Serviço de Endocrinologia Pediátrica – HIJG, entre janeiro e dezembro de 2018.

A coleta de dados foi feita em duas ocasiões. A primeira coleta foi feita durante a primeira internação e ocorreu entre janeiro e agosto de 2018, previamente à suplementação com vitamina C ou placebo. A segunda coleta de dados foi realizada durante internação hospitalar posterior à primeira, após quatro ou seis meses de suplementação e ocorreu de maio a dezembro de 2018.

Foram consideradas perdas aqueles participantes que não fizeram a suplementação adequada com vitamina C durante o período de coleta de dados e que não tiveram amostras de sangue coletadas.

Na primeira avaliação, os participantes foram submetidos à aplicação das escalas de dor (segundo a idade), dos questionários de qualidade de vida (também segundo a idade) e aos exames de sangue para avaliação de citocinas, hidroxiprolina e TGF- β 1. A coleta de sangue para este estudo ocorreu junto com a coleta de sangue para os exames de sangue de rotina necessários ao tratamento. Ainda na primeira avaliação, coletou-se do prontuário médico os seguintes dados: sexo, idade, tipo de OI (através da classificação de Sillence), número de ciclo de pamidronato a que o participante estava sendo submetido e se o participante havia apresentado alguma fratura desde o último ciclo de pamidronato. Na segunda avaliação, foram repetidas as mesmas coletas de dados iniciais e coletados os seguintes dados do prontuário: intervalo entre a primeira e segunda coletas e número de fraturas entre as coletas.

As análises bioquímicas, que originaram os dados referentes às concentrações séricas de citocinas, hidroxiprolina e TGF- β 1, foram realizadas no Laboratório de Neurociência Experimental (LaNEx) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) em dezembro de 2018. As amostras foram identificadas por número e, portanto, os pesquisadores eram cegados quanto ao tratamento recebido pelos grupos Placebo e Vitamina C.

Cada participante da pesquisa teve seus dados (idade, sexo, tipo de OI e os dados referentes aos objetivos desta pesquisa) anotados em um instrumento de coleta de dados (em uma planilha do Excel) e identificados por numeração.

3.5.1 Suplementação com vitamina C ou placebo

Conforme randomização previamente realizada, os participantes foram alocados no grupo experimental (Vitamina C) ou no grupo controle (Placebo) e receberam orientação para administração via oral de vitamina C ou placebo, na dose de 50 mg/kg/dia, dividida em três doses diárias, por quatro ou seis meses⁵⁰. O tempo de uso da suplementação foi subordinado ao intervalo dos ciclos de pamidronato que já estavam programados (a cada quatro ou seis meses) pelo Serviço de Endocrinologia Pediátrica do HIJG. Os participantes que foram alocados no grupo

controle receberam placebo. O uso do placebo nestes pacientes, ao invés da vitamina C, não leva a piora da OI. A não suplementação com a vitamina C corresponde a situação atual em que todos os pacientes se encontram, o que caracteriza a não maleficência do uso do placebo. Tanto a vitamina C como o placebo foram preparados por uma farmácia de manipulação e fornecidos pelos pesquisadores aos participantes, sem nenhum custo financeiro.

Os familiares foram orientados a realizarem um registro diário de aderência (Apêndice D) à suplementação (vitamina C/ placebo) e este registro foi apresentado aos pesquisadores durante a segunda coleta de dados. Foi considerado aderente o participante que seguiu a prescrição médica da suplementação com a vitamina C ou placebo em pelo menos 80% das administrações^{70,71}. Os pacientes e seus familiares foram mantidos cegados com relação ao tratamento recebido (vitamina C ou placebo).

3.5.2 Avaliação da dor

Todos os participantes foram avaliados com escalas, validadas e adaptadas transculturalmente para o Brasil, para avaliação da dor correspondente à sua faixa etária⁵. Os instrumentos foram aplicados sempre pelo mesmo avaliador, cegado quanto ao tratamento nos pacientes.

3.5.2.1 *Face, Legs, Activity, Cry, Consolability – Revised*

A escala *Face, Legs, Activity, Cry, Consolability* (FLACC), em português pode ser traduzida para Face, Pernas, Atividade, Choro e Consolabilidade (Anexo A), foi inicialmente publicada em inglês e criada para avaliação de dor no pós-operatório imediato em crianças pequenas que não verbalizavam e não podiam reportar a dor⁷². Devido à dificuldade de avaliação da dor em pacientes com alteração cognitiva, dificuldades de comunicação ou incapacidade de reportar a dor, esta escala passou a ser amplamente utilizada e aplicada em várias faixas etárias⁷³. A escala modificada e revisada (*Face, Legs, Activity, Cry, Consolability – Revised*, FLACC-R) avalia a dor através da observação comportamental do paciente e está dividida em cinco categorias. Avalia-se a expressão facial, a atitude e o posicionamento das pernas, a atitude e o movimento corporal, se há presença e a

qualidade do choro e, por último, se o paciente precisa ser consolado e qual a facilidade com que isto ocorre.

Os participantes foram avaliados descobertos para melhor observação das pernas e da atitude corporal. Os participantes acordados foram avaliados por um a dois minutos, enquanto que os participantes que estavam dormindo foram avaliados por mais de dois minutos. Cada uma destas categorias é pontuada de zero a dois, sendo que a pontuação final varia de zero a dez. A versão traduzida e adaptada para a população brasileira foi a escala utilizada neste estudo para avaliação de dor nas crianças menores de quatro anos de idade⁷⁴.

3.5.2.2 *Faces Pain Scale – Revised*

A *Faces Pain Scale – Revised* (FPS-R), em português pode ser traduzida para Escala de Faces – Revisada (Anexo B), é um instrumento para análise da dor e consiste de uma série de seis desenhos representando o rosto humano. A face que está localizada mais a esquerda é aquele que não demonstra nenhuma dor, enquanto que o desenho mais a direita representa uma face com dor extrema. Estas imagens foram mostradas à criança após a pergunta da presença de dor e a criança escolheu a figura que mais se aproximou da intensidade da experiência de dor que estava sentindo naquele momento. Cada face corresponde a uma pontuação de 0, 2, 4, 6, 8 ou 10, sendo que 0 representa o paciente sem dor, enquanto 10 representa o paciente com muita dor. Foi utilizada a versão traduzida, validada e adaptada transculturalmente para a população brasileira⁷⁵. Segundo os autores, esta escala deve ser aplicada em crianças de quatro a oito anos de idade^{76,77}. Neste estudo, a escala foi utilizada nos participantes de quatro anos a sete anos e onze meses.

3.5.2.3 *Adolescent Pediatric Pain Tool*

A *Adolescent Pediatric Pain Tool* (APPT), em português pode ser traduzida para Instrumento de Avaliação de Dor em Pacientes Pediátricos e Adolescentes (Anexo C), foi utilizada nos participantes maiores de oito anos. Esta escala é um instrumento autoaplicável que avalia localização, intensidade e qualidade da dor. A escala é constituída de três partes. Na primeira parte há uma representação gráfica do corpo humano (ventral e dorsal), onde o participante fazia a identificação do local

da dor. A segunda parte é composta por uma escala visual analógica, com uma linha horizontal de 10 cm de comprimento, graduada em cinco pontos (sem dor, pouca dor, dor média, muita dor e pior dor possível) cujo objetivo é a mensuração da intensidade da dor. A última parte da escala é composta de 67 descritores (palavras ou expressões) organizados em 15 grupos que representam as dimensões sensorial, afetiva, avaliativa e temporal da dor. O escore da terceira parte da escala é obtido pela média do total de cada dimensão (número de palavras escolhidas dividido pelo total de palavras). A adaptação cultural para a língua portuguesa do Brasil do APPT foi feita por De Bortoli em 2011 e foi utilizada neste estudo⁷⁸.

3.5.3 Avaliação da qualidade de vida

Os questionários utilizados para a avaliação da qualidade de vida neste estudo foram o *PedsQL™ Infant Scales* (PedsQL – Inventário Pediátrico sobre a Qualidade de Vida – questionário sobre bebês) e o *PedsQL™ 4.0 Generic Core Scales* (PedsQL – Questionário Pediátrico sobre a Qualidade de Vida), ambos já traduzidos para a língua portuguesa do Brasil⁷⁹⁻⁸⁷. Estes questionários são de propriedade da *Mapi Research Trust* e seu uso foi permitido após a pesquisadora concordar com os termos de uso. Não é permitida a divulgação destes questionários, tendo seu uso restrito apenas a este estudo. Os instrumentos foram aplicados sempre pelo mesmo avaliador, cegado quanto ao tratamento recebido pelos participantes.

3.5.3.1 *PedsQL™ Infant Scales* (PedsQL – Inventário Pediátrico sobre a Qualidade de Vida – questionário sobre bebês)

Este instrumento de avaliação de qualidade de vida é específico para crianças entre zero a 24 meses de idade. Neste caso, apenas os pais ou responsáveis pelos participantes do estudo respondem ao questionário. São avaliadas a saúde física e psicossocial. Para investigação da saúde física, pesquisam-se os seguintes domínios: capacidade física (nove itens) e sintomas físicos (dez itens). Para investigação da saúde psicossocial, analisam-se os seguintes domínios: aspecto emocional (doze itens), interação social (cinco itens) e cognição (nove itens). Cada um dos itens recebe uma das seguintes respostas:

nunca (zero), quase nunca (um), algumas vezes (dois), frequentemente (três) e quase sempre (quatro). O escore é dado por domínio. Cada nota, recebe uma pontuação (0=100, 1=75, 2=50, 3=25 e 4=0). Soma-se a nota do domínio e divide-se pelo número de itens. É possível ainda pontuar os quesitos saúde física e saúde psicossocial. Neste caso soma-se a nota dos domínios e divide-se pelo número de domínios existentes. O escore mínimo é zero e o máximo, cem. Escores mais altos significam melhor qualidade de vida⁷⁹⁻⁸⁴.

3.5.3.2 *PedsQL™ 4.0 Generic Core Scales* (PedsQL – Questionário Pediátrico sobre a Qualidade de Vida)

Para avaliar a qualidade de vida acima dos dois anos de idade, optou-se pela utilização da versão 4.0 do Questionário Pediátrico sobre a Qualidade de Vida. Neste instrumento avaliam-se separadamente os participantes do estudo e os seus responsáveis. Os questionários são aplicados segundo as faixas etárias: dois a quatro anos, cinco a sete anos, oito a doze anos, treze a dezoito anos e maiores de dezoito anos. O questionário aplicado ao responsável também segue os mesmos grupos etários. Da mesma forma, esta versão avalia a saúde física e a saúde psicossocial. Na investigação da saúde física, pesquisa-se o seguinte domínio: capacidade física (oito itens) e na investigação da saúde psicossocial, avaliam-se os seguintes domínios: aspecto emocional (cinco itens), interação social (cinco itens) e cognição (três itens nos questionários de dois a quatro anos e cinco itens nos demais questionários). Cada um dos itens recebe uma das seguintes respostas: nunca (zero), quase nunca (um), algumas vezes (dois), frequentemente (três) e quase sempre (quatro). O escore é dado por domínio. Cada nota, recebe uma pontuação (0=100, 1=75, 2=50, 3=25 e 4=0). Soma-se a nota do domínio e divide-se pelo número de itens. É possível ainda pontuar os quesitos saúde física e saúde psicossocial. A pontuação da saúde física é a mesma do domínio capacidade física e a pontuação da saúde psicossocial é a média dos três domínios. O escore varia de zero a cem. Quanto maior o escore obtido, maior a qualidade de vida⁸⁵⁻⁸⁷.

3.5.4 Coleta de sangue e análises bioquímicas

A coleta de sangue é procedimento de rotina em todas as internações dos pacientes portadores de OI que internam para receber o pamidronato dissódico endovenoso. A coleta foi realizada pela equipe de enfermagem da unidade de internação da ortopedia do HIJG, treinada e habituada a coletar sangue em pacientes portadores de OI. Foram coletadas amostras de sangue (5 mL) do acesso venoso dos participantes (no mesmo momento da punção de rotina) para as análises bioquímicas que foram realizadas pré-suplementação e 4 ou 6 meses após a suplementação com vitamina C ou placebo. As amostras de sangue foram colocadas em tubos sem anticoagulante, deixadas repousar em temperatura ambiente por 20 minutos. Logo após, foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, a temperatura de 4° C. Imediatamente, alíquotas do sobrenadante (soro) foram estocadas a -80°C até o momento do ensaio. Estas amostras foram utilizadas apenas para as análises descritas a seguir e serão descartadas adequadamente assim que o estudo terminar. Os pesquisadores eram cegados quanto ao tratamento recebido pelos grupos Placebo e Vitamina C.

3.5.4.1 Avaliação das concentrações de citocinas e TGF-β1

As análises das concentrações séricas das citocinas e TGF-β foram realizadas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Um volume de 100 µL de soro foi utilizado para mensurar as concentrações das citocinas pró-inflamatórias: TNF (DY210), IL-1β (DY201), IL-6 (DY206) e MMP-9 (DY911) e anti-inflamatórias: IL-4 (DY204) e IL-10 (DY217B), utilizando kits DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de TGF-β1, utilizado como um marcador do *turnover* ósseo, foram mensurados pelo kit TGF beta-1 Human/Mouse Uncoated ELISA (88-8350-88, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os valores obtidos nas dosagens foram estimados pela interpolação dos dados com uma curva padrão, mensurado a 450 nm (correção com comprimento de onda de 540 nm) em um espectrofotômetro de placas (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Os valores obtidos foram expressos em picogramas por mL (pg/mL).

3.5.4.2 Avaliação das concentrações de hidroxiprolina

A mensuração da concentração sérica de hidroxiprolina foi realizada por reação colorimétrica (*Hydroxyproline Assay Kit* MAK008, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e foi utilizada como um marcador do conteúdo de colágeno. Em um volume de 100 µL de soro de cada amostra foram adicionados 100 µL de ácido clorídrico (HCl, 12 M, Hexis Científica, Jundiaí, SP, Brasil) e hidrolisados a 120 °C por 3 horas. Após, foram adicionados 4 mg de carvão ativado (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e centrifugados a 10.000 ×g durante 3 minutos. Foram coletados 25 µL do sobrenadante, transferidos para uma placa de 96 poços e incubadas na estufa (60 °C) até a evaporação. Posteriormente, foram adicionados 100 µL da mistura de cloramina T/Tampão de oxidação a cada amostra e na curva padrão, incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Então, adicionados 100 µL do Reagente DMAB em cada amostra e na curva padrão e incubados durante 90 minutos a 60 °C até a mensuração em na absorbância de 560 nm em um espectrofotômetro de placas (Perlong DNM-9602, *Nanjing Perlove Medical Equipment Co*, Nanjing, China). A curva padrão foi determinada utilizando diluições em série de 0,1 mg/mL de solução de hidroxiprolina padrão. Os valores obtidos foram expressos em microgramas por microlitro (µg/µL).

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis de estudo, dependentes e independentes, estão especificadas no quadro abaixo (quadro 1).

Quadro 1 – Variáveis de estudo.

(continua)

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Tratamento com vitamina C ou placebo	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim, não Em proporção
Número de fraturas	Dependente	Quantitativa	Número absoluto Média ± Desvio Padrão

(conclusão)

Dor • FLACC • FPS-R • APPT	Dependente	Qualitativa e Quantitativa	Escore Média ± Desvio Padrão
Qualidade de vida • PedsQL™ <i>Infant Scales</i> • PedsQL™ 4.0 <i>Generic Core Scales</i>	Dependente	Quantitativa	Escore Média ± Desvio Padrão
Concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias • TNF • IL-1β • IL-6 • MMP-9	Dependente	Quantitativa contínua	pg/mL Média ± Erro Padrão da Média
Concentrações séricas de citocinas anti-inflamatórias • IL-4 • IL-10	Dependente	Quantitativa contínua	pg/mL Média ± Erro Padrão da Média
Concentrações séricas de hidroxiprolina	Dependente	Quantitativa contínua	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Média ± Erro Padrão da Média
Concentrações séricas de TGF- β 1	Dependente	Quantitativa contínua	pg/mL Média ± Erro Padrão da Média

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

As informações obtidas através dos questionários, prontuários e das análises bioquímicas foram transcritas em uma planilha do programa Excel e posteriormente analisadas no programa GraphPad Prism® (v. 6.0, La Jolla,

Califórnia, EUA). Inicialmente foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk e desta forma, os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou média (M) $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados paramétricos foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni para as comparações pré e pós dos grupos Placebo e Vitamina C. Em todas as avaliações foi realizada a diferença dos valores pós-suplementação para os valores pré-suplementação, expressa como o delta (Δ) e comparados pelo teste t de Student. Em todas as análises, valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A pesquisa está fundamentada na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Este estudo tem como princípio a não maleficência, justiça e autonomia dos participantes. Nenhum dos participantes teve prejuízo de seu tratamento com a não adesão a este estudo. Não houve investimento financeiro da parte do participante que concordou em ser incluído na pesquisa. O participante não foi submetido a nenhum estresse emocional ou físico adicional, além do estresse inerente ao próprio tratamento e à internação hospitalar que já são rotina em seu tratamento. Este pesquisa foi enviada ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HIJG, através da Plataforma Brasil, em 05 de novembro de 2017 e foi considerado aprovado em 20 de dezembro de 2017, sob o número 2.450.363 (Anexo E).

Os dados só foram coletados após a concordância de pacientes e responsáveis em participar deste estudo, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A) e do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido I e II – TALE I e II (Apêndices B e C) e da aprovação pelo CEP – HIJG. O TALE solicitou a concordância de crianças e adolescentes para sua participação na pesquisa e não substituiu o TCLE. Dois modelos de TALE foram utilizados neste estudo, dependendo da faixa etária (entre 6 e 12 anos – TALE I e maiores de 12 anos – TALE II). Para as crianças menores de seis anos, devido a incapacidade de leitura, utilizou-se apenas o TCLE.

A pesquisadora e sua orientadora se comprometeram com a privacidade e confidencialidade dos dados coletados em todas as etapas da pesquisa, minimizando assim os riscos. Outros possíveis riscos inerentes a este tipo de

pesquisa, como a superdosagem de medicação (vitamina C), foram controlados pela pesquisadora através de prescrições médicas adequadas e orientação aos responsáveis. Os demais riscos inerentes à coleta de sangue foram minimizados, interrompeu-se a coleta em caso de dor ou rompimento do vaso. Além disso a equipe de enfermagem que realizou as coletas de sangue é treinada para realizar punções em pacientes portadores de OI e tem o cuidado adequado com estes pacientes. Os dados coletados serão guardados por um período de cinco anos e depois adequadamente descartados.

4. ARTIGO

Vitamin C supplementation in children and adolescents with imperfect osteogenesis: a randomized double-blind placebo-controlled pilot trial

Cinthia Faraco Martinez Cebrian ^{1,2}; Verônica Vargas Horewicz ¹; Josiel Mileno Mack ³; Fernanda Fátima da Silveira ¹; Daniel Fernandes Martins ¹; Franciane Bobinski ^{1, #}.

¹ Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça 88137-272, SC, Brazil.

² Children's Hospital Joana de Gusmão, Florianópolis 88025-301, SC, Brazil.

³ Department of Medical Clinic, Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil.

Corresponding author: Franciane Bobinski, Experimental Neuroscience Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, UNISUL, Campus Pedra Branca, Palhoça, Santa Catarina, Brazil, Phone: +55 48 3279-1057, E-mail: franciane.bobinski@unisul.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3537-1712>.

Resumo

Introdução: A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença rara, congênita e hereditária. A principal característica clínica é a fragilidade óssea, no entanto, a dor também é comum, limita as atividades diárias e afeta a qualidade de vida. A suplementação com vitamina C é uma possibilidade de tratamento complementar que pode contribuir para a melhora dos sintomas da OI, visto que é essencial para a hidroxilação da prolina durante a formação do colágeno, além de ter função anti-inflamatória já estabelecida. **Objetivos:** Avaliar o efeito da suplementação com a vitamina C ou placebo sobre a dor, qualidade de vida, inflamação, síntese do colágeno, *turnover* ósseo e fraturas em crianças com OI em uso de pamidronato dissódico. **Métodos:** Estudo piloto de um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo. Após o recrutamento e a avaliação dos critérios de elegibilidade, 54 crianças foram randomizadas para receber a suplementação com Placebo ou Vitamina C. Todas as avaliações foram realizadas pré e pós-suplementação. Avaliou-se o número de fraturas pela análise do prontuário. A dor foi avaliada com as escalas *Face*, *Legs*, *Activity*, *Cry*, *Consolability* (FLACC), *Faces Pain Scale – Revised* (FPS-R) e *Adolescent Pediatric Pain*

Tool (APPT), adequadas a cada faixa etária. Os questionários utilizados para a avaliação da qualidade de vida foram o *PedsQL™ Infant Scales* e o *PedsQL™ 4.0 Generic Core Scales*. As análises das concentrações séricas das citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6 e MMP-9) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), além dos níveis de TGF- β , utilizado como marcador do *turnover* ósseo, foram avaliados por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). A mensuração da concentração sérica de hidroxiprolina foi realizada por reação colorimétrica. Resultados: A suplementação com vitamina C não alterou o número de fraturas e a qualidade de vida. A dor se mostrou presente em apenas uma criança e não foi alterada com a suplementação. A vitamina C não alterou os níveis séricos de TNF, IL-1 β , IL-6 e MMP-9. Os níveis séricos de IL-4 não se alteraram, mas observou-se um aumento na concentração de IL-10 após a suplementação com vitamina C em relação aos níveis basais, enquanto o grupo suplementado com placebo reduziu os níveis séricos pós-suplementação ($P=0,0023$). Ademais, o grupo Vitamina C apresentou uma concentração maior de hidroxiprolina em relação ao grupo Placebo ($P= 0,013$) pós-suplementação. Na análise temporal, o grupo suplementado com vitamina C aumentou os níveis séricos de hidroxiprolina, em relação aos valores basais, enquanto que no grupo suplementado com placebo, os níveis séricos diminuíram ($P= 0,0005$). Os níveis séricos de TGF- β 1 não se alteraram com a suplementação. Conclusão: A vitamina C está associada à elevação dos níveis séricos de IL-10, uma citocina anti-inflamatória capaz de reduzir a atividade dos osteoclastos. Além de aumentar os níveis séricos de hidroxiprolina, que pode ser decorrente do aumento da produção de colágeno, reação dependente da vitamina C. Isso pode ser entendido como um fator de melhora visto que o defeito básico da OI encontra-se na produção do colágeno tipo I.

Palavras-chave: Osteogênese Imperfeita; Vitamina C; Dor; Qualidade de vida; Colágeno; Citocinas; Hidroxiprolina.

Abstract

Introduction: Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare, congenital and hereditary disease. The main clinical feature is bone fragility; however, pain is also common, limits daily activities and affects quality of life. Supplementation with vitamin C is a possibility of complementary treatment that can contribute to the improvement of the symptoms of OI, since it is essential for the hydroxylation of proline during the synthesis of collagen, besides having already established anti-inflammatory function. Objectives: To evaluate the effect of supplementation with vitamin C or placebo on pain, quality of life, inflammation, collagen synthesis, bone turnover and fractures in children and adolescents with OI in the use of disodium

pamidronate. Methods: Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. After recruitment and evaluation of eligibility criteria, 54 children were randomized to receive either placebo or vitamin C supplementation. All evaluations were performed pre- and post-supplementation. The number of fractures was evaluated by chart analysis. Pain was assessed using the Face, Legs, Activity, Cry, Consolability (FLACC), Pain Scale-Revised (FPS-R) and Adolescent Pediatric Pain Tool (APPT) scales, appropriate for each age group. Quality of life was assessed with PedsQL™ Infant Scales and the PedsQL™ 4.0 Generic Core Scales. Serum concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6 and MMP-9) and anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10), as well as TGF- β used as a marker of bone turnover, were evaluated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The measurement of serum hydroxyproline concentration was performed by colorimetric reaction. Results: Vitamin C supplementation did not alter the number of fractures and the quality of life. The pain was present in only one child and was not altered by supplementation. Vitamin C did not alter serum levels of TNF, IL-1 β , IL-6, MMP-9, IL-4 and TGF- β 1. However, IL-10 concentration was increased after vitamin C supplementation over baseline levels, compared to the placebo-supplemented group ($P = 0.0023$). The Vitamin C group presented a higher concentration of hydroxyproline in relation to the Placebo group ($P = 0.013$) after supplementation. Indeed, Vitamin C increased serum hydroxyproline levels from baseline, whereas in the placebo group, hydroxyproline serum levels were decreased ($P = 0.0005$). Conclusion: Vitamin C supplementation increased serum levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine capable of reducing osteoclast activity. Vitamin C also increases serum levels of hydroxyproline, what may be due to the increase in collagen production, a vitamin C dependent reaction.

Keywords: Vitamin C; Pain; Quality of life; Collagen; IL-10; Cytokines; Hydroxyproline.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação com vitamina C em pacientes portadores de OI em uso de pamidronato dissódico está associada a elevação dos níveis séricos de IL-10, uma citocina anti-inflamatória capaz de reduzir a atividade dos osteoclastos, que é um dos objetivos do tratamento da OI. Além disso, esta suplementação também está associada a um aumento nos níveis séricos de hidroxiprolina, o qual sugerimos ser decorrente do aumento da produção de colágeno, reação esta dependente da vitamina C. O aumento da produção de colágeno também pode ser entendido como um fator de melhora na patologia visto que o defeito básico da OI encontra-se na produção do colágeno tipo I.

Como perspectiva futura, espera-se que este estudo piloto possa ser aplicado em uma população maior, seja pela continuidade da pesquisa atual ou pela replicação deste estudo por outros grupos de pesquisa. Além disso, almeja-se que este estudo possa instigar a comunidade científica a aprofundar pesquisas sobre os mecanismos de ação da vitamina C principalmente no que diz respeito ao metabolismo ósseo e a dor. Acredita-se que a evolução destes estudos possam alcançar novos tratamentos para doenças ósseas como a OI e melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Rijks EBG, Bongers BC, Vlemmix MJG, Boot AM, van Dijk ATH, Sakkers RJB, van Brussel M. Efficacy and safety of bosphosphonate therapy in children with Osteogenesis Imperfecta: a systematic review. *Horm Res Paediatr*. 2015;84(1):26-42.
2. Abdelaziz DM, Abdullah S, Magnussen C, Ribeiro-da-Silva A, Komarova SV, Rauch F et al. Behavioral signs of pain and functional impairment in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Bone*. 2015;81:400-6.
3. Forlino A, Marini J. Osteogenesis Imperfecta. *Lancet*. 2016;387:1657-71.
4. Hoyer-Kuhn H, Netzer C, Semler O. Osteogenesis Imperfecta: pathophysiology and treatment. *Wien Med Wochenschr*. 2015;65:278–84.
5. Nghiem T, Louli J, Treherne SC, Anderson CE, Tsimicalis A, Laloo C et al. Pain experiences of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. An integrative review. *Clin J Pain*. 2017;33(3):271-80.
6. Astrom E, Soderhall S. Beneficial effect of long term intravenous bisphosphonate treatment of osteogenesis imperfecta. *Arch dis Child*. 2002;86(suppl 5):8-11.
7. Bishop N. Characterising and treating osteogenesis imperfecta. *Early Human Development*. 2010;86:743-6.
8. Glorieux FH. Treatment of osteogenesis imperfecta: who, why, what? *Horm Res*. 2007;68(suppl 5):8-11.
9. Schwarz RI. Collagen I and the fibroblast: high protein expression requires a new paradigm of post-transcriptional, feedback regulation. *Biochemm Biophys Rep*. 2015;3:38-44.
10. Kim HKW. Osteogenesis Imperfecta. In: Herring JA, editor. *Tachdjian's Pediatric Orthopaedics: from the Texas Scottish Rite Hospital for Children*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2013. p. e608.
11. Thomas IH, DiMeglio LA. Advances in the classification and treatment of osteogenesis imperfecta. *Curr Osteoporos Rep*. 2016;14(1):1-9.
12. Sillence DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet*. 1979;16:101-6.
13. Lindahl K, Kindmark A, Rubin C-J, Malmgren B, Grigelioniene G, Söderhäll S et al. Decreased fracture rate, pharmacogenetics and BMD response in 79 swedish children with osteogenesis imperfecta types I, III and IV treated with pamidronate. *Bone*. 2016;87:11-18.

14. Valadares ER, Carneiro TB, Santos PM, Oliveira AC, Zabel B. What is new in genetics and osteogenesis imperfecta classification? *J Pediatr*. 2014;90(6):536-41.
15. Zack P, Franck L, Devile C, Clark C. Fracture and non-fracture pain in children with osteogenesis imperfecta. *Acta Paediatr*. 2005;94:1238-42.
16. Nagae M, Hiraga T, Wakabayashi H, Wang L, Iwata K, Yoneda T. Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone. *Bone*. 2006;39:1107-15.
17. Suda T, Kobayashi K, Limi E, Udagawa N, Takahashi N. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp*. 2001;232:235-47.
18. Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Morita Y, Eguchi T et al. IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclasts in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunol Lett*. 2011;137:53-61.
19. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, De Paepe A et al. Osteogenesis Imperfecta. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:1-19.
20. Van Beek ER, Cohen LH, Leroy IM, Ebetino FH, Löwik CWGM, Papapoulos SE. Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone*. 2003;33:805-11.
21. Orcel P, Beaudreuil J. Bisphosphonates in bone diseases other than osteoporosis. *Joint Bone Spine*. 2002;69:19-27.
22. Strassle BW, Mark L, Leventhal L, Piesla MJ, Li XJ, Kennedy JD et al. Inhibition of osteoclasts prevents cartilage loss and pain in a rat model of degenerative joint disease. *Osteoarthr Cartil*. 2010;18:1319-28.
23. Kang YM, Hong SH, Yang JH, Oh JC, Park JO, Lee SY et al. Pamidronate down-regulates tumor necrosis factor- α induced matrix metalloproteinases expression in human intervertebral disc cells. *J Bone Metab*. 2016;23:165-73.
24. Dionne CE, Laurin D, Desrosiers T, Abdous B, LeSage N, Frenette J et al. Serum vitamin C and spinal pain: a nationwide study. *Pain*. 2016;157:2527-35.
25. Smith VH. Vitamin C deficiency is an under-diagnosed contributor to degenerative disc disease in the elderly. *Med Hypotheses*. 2010;74:695-7.
26. Carr AC, McCall C. The role of vitamin C in the treatment of pain: new insights. *J Transl Med*. 2017;15:77.
27. Buck DW, Dumanian GA. Bone biology and physiology: part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(6):1314-20.

28. Gjaltema RAF, Bank RA. Molecular insights into prolyl and lysyl hydroxylation of fibrillar collagens in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017;51(1):74-95
29. Srivastava AK, Khare P, Nagar HK, Raghuwanshi N, Srivastava R. Hydroxyproline: a potencial biochemical marker and its role in the pathogenesis of diferente diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2016;17(6)596-602.
30. Fullana F, Grande L, Fernandez-Llamazares J, González-Mestre V, Salvá JA. Skin prolylhydroxylase activity and wound healing. *Eur Surg Res*. 1993;25:370-5.
31. Wang Y, Yin S, Zhao X, Lai J, Ying H, Xu Q et al. Study onthe effect of micronutrients supplementation on health status of children. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2003;32(5):455-8.
32. Svanberg GK. Biological variations in serum total hydroxyproline concentration in the beagle dog. *Lab Anim*. 1988;22:157-61.
33. Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. *Endocr Rev*. 1988;9(4)437-49.
34. Alcausin MB, Briody J, Pacey V, Ault J, McQuade M, Bridge C et al. Intravenous pamidronate treatment in children with moderate-to-severe osteogenesis imperfecta startes under three years of age. *Horm Res Paediatr*. 2013;79(6):333-40.
35. Graf A, Hassani S, Krzak J, Caudill A, Flanagan A Bajorunaite R et al. Gait characteristics and functional assessment of children with type I osteogenesis imperfecta. *J Orthop Res*. 2009;9:1182-90.
36. Marr C, Seasman A, Bishop N. Managing the patient with osteogenesis imperfecta: a multidisciplinary approach. *J Multidiscip Healthc*. 2017;4:145-55.
37. Koshal K, Ellis RD. Effect of lower limb sofied procedure on ambulation in osteogenesis imperfecta. *J PEdiatr Orthop*. 2001;21(2):233-5.
38. Sofield HA, Millar EA. Fragmentation, realignment and intramedullary rod fixation of deformities of the long bones in children: a ten-year appraisal. *J Bone Joint Surg Am* 1959;41:1371-91.
39. Glorieux FH, Bishop NJ, Plotkin HP, Chabot G, Lanoue G, Travers RT. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med*. 1998;339:947-52.
40. Glorieux FH, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ, Travers R. Osteogenesis Imperfecta type IV: a form of brittle bone disease with mineralization defect. *J Bone Miner Res*. 2002;17(1):30-8.
41. Manela-Azulay M, Lacerda CAM, Perez MA, Filgueira AL, Cuzzi T. Vitamin C. *An Bras Dermatol*. 2003;78(3):265-74.

42. Pauling L. Evolution and the need for ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci.* 1970;67(4):1643-8.
43. Padayatty SJ, Levine M. Vitamin C: the know and the unknow and goldilocks. *Oral Dis.* 2016;22(6):463-93.
44. Fain O. Musculoskeletal manifestations of scurvy. *Joint Bone Spine.* 2005;72:124-8.
45. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommend dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(8):3704-9.
46. Aghajanian P, Hall S, Wongworawat MD, Mohan S. The roles and mechanisms of actions of vitamin C in bone: new developments. *J Bone Miner Res.* 2015;30(11):1945-55.
47. Hart A, Cota A, Makhdum A, Harvey EJ. The role of vitamin C in orthopedic trauma and bone health. 2015;7:306-11.
48. Syal K, Chatterji D. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1112:321-332.
49. Winterfeldt EA, Eyring EJ, Vivian VM. Ascorbic-acid treatment for osteogenesis imperfecta. *Lancet.* 1970;6:1347-8.
50. Kurz D, Eyring EJ. Effects of vitamin C on OI. *Pediatrics.* 1974;54(1):56-61.
51. Ringsdorf WM Jr. Vitamin C supplementation and relief from pain. A review and interpretation. *J Ala Dent Assoc.* 1984;68(4):47-53.
52. Golriz, F; Donnelly LF; Devaraj S; Krishnamurthy R. Modern American scurvy – experience with vitamin C deficiency at a large children’s hospital. *Pediatr Radiol.* 2017;47:214-20.
53. Cutforth RH. Adult scurvy. *Lancet.* 1958;1(7018):454-6.
54. Doll S, Ricou B. Severe vitamin C deficiency in a critically ill adult: a case report. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67(8):881-2.
55. Fukushima R, Yamazaki E. Vitamin C requirement in surgical patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(6):669-76.
56. Basu TK, Smethurst M, Gillett MB, Donaldson D, Jordan SJ, Williams DC, Hicklin JA. Ascorbic acid therapy for the relief of bone pain in Paget’s disease. *Acta Vitaminol Enzymol.* 1978;32(1-4):45-9.
57. Cameron E, Campbell A. The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem Biol Interact.* 1974;9(4):285-315.
58. Cameron E, Baird GM. Ascorbic acid and dependence on opiates in patients with advanced disseminated cancer. *Intern Res Commun Syst.* 1973;1:33.

59. Carr AC, Vissers MCM, Cook J. Parenteral vitamin C for palliative care of terminal cancer patients. *NZ Med J*. 2014;127(1396):84-6.
60. Jeon Y, Park JS, Moon S, Yeo J. Effect of intravenous high dose vitamin C on postoperative pain and morphine use after laparoscopic colectomy: a randomized controlled trial. *Pain Res Manag*. 2016;2016:9147279. Epub2016.
61. Ayatollahi V, Dehghanpoor-Farashah S, Behdad S, Vaziribozorg S, Rab-bani Anari M. Effect of intravenous vitamin C on post-operative pain in uvulopalatopharyngoplasty with tonsillectomy. *Clin Otolaryngol*. 2017;42(1):139-43.
62. Kanazi GE, El-Khatib MF, Yazbeck-Karam VG, Hanna JE, Masri B, Aouad MT. Effect of vitamin C on morphine use after laparoscopic cholecystectomy: a randomized controlled trial. *Can J Anaesth*. 2012;59(6):538-43.
63. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300(2):535-43.
64. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(2):443-457.
65. Mikirova N, Casciari J, Rogers A, Taylor P. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. *J Transl Med*. 2012;10:189.
66. Harrison FE, May JM. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(6):719-30.
67. May JM, Qu ZC, Nazarewicz R, Dikalov S. Ascorbic acid efficiently enhances neuronal synthesis of norepinephrine from dopamine. *Brain Res Bull*. 2013;90:35-42.
68. May JM, Qu ZC, Meredith ME. Mechanisms of ascorbic acid stimulation of norepinephrine synthesis in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;426(1):148-52.
69. Ward MS, Lamb J, May JM, Harrison FE. Behavioral and monoamine changes following severe vitamin C deficiency. *J Neurochem*. 2013;124(3):363-75.
70. Lam WY, Fresco P. Medication Adherence Measures: an overview. *BioMed Res Int*. 2015,1-12.
71. Galato D, Schuller-Trevisol F, Piovezan AP. Measurement complexity of adherence to medication. *Ther Clin Risk Manag*. 2012:8-169-71.
72. Crellin DJ, Harrison D, Santamaria N, Babl FE. Systematic review of the Face, Legs, Activity, Cry and Consolability scale for assessing pain in infants and children: is it reliable, valid, and feasible for use? *Pain*. 2015;156(11):2132-51.
73. Uitti JM, Salanterä S, Laine MK, Tähtinen PA, Ruohola A. Adaption of pain scales for parent observation: are pain scales and symptoms useful in detecting

pain of young children with the suspicion of acute otitis media? BMC Pediatr. 2018;18(1):392.

74. Bussotti EA, Guinsburg R, Pedreira MLG. Cultural adaptation to Brazilian portuguese of the Face, Legs, Activity, Cry, Consolability revised (FLACCr) scale pain assessment. Rev Latino-Am Enfermagem. 2015;23(4):651-9.
75. Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) [homepage na internet]. Faces Pain Scale – revised, traduções em várias línguas [acesso em 10 de outubro de 2017]. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/Education>.
76. Charry CLE, Piola JS, Linhares MBM, Silva JA. Validity and reliability assessment of the Brazilian version of the Faces Pain Scale - Revised. Psychol Neurosci. 2014;7(1):55-9.
77. Hicks CL, von Bayer CL, Spafford PA, van Korlaar I, Goodenough B. The Faces Pain Scale – Revised: toward a common metric in pediatric pain measurement. Pain. 2001;93:173-83.
78. De Bortoli PS. Adaptação cultural do instrumento *Adolescent Pediatric Pain Tool* (APPT) para crianças e adolescentes brasileiros com câncer [dissertação]. Universidade de São Paulo; 2011.
79. Varni JW, Seid M, Rode CA. The PedsQLTM: Measurement model for the pediatric quality of life inventory. Med Care. 1999; 37(2):126-39.
80. Varni JW, Seid M, Kurtin PS. PedsQL 4.0: reliability and validity of the pediatric quality of life inventory version 4.0 generic core scales in healthy and patient populations. Med Care. 2001;39(8):800-12.
81. Varni JW, Seid M, Knight TS, Uzark K, Szer IS. The PedsQL 4.0 generic core scales: sensitivity, responsiveness, and impact on clinical decision-making. J Behav Med. 2002;25(2):175-93.
82. Varni JW, Burwinkle TM, Seid M, Skarr D. The PedsQL 4.0 as a pediatric population health measure: feasibility, reliability, and validity. Ambul Pediatr. 2003;3(6):329-41.
83. Chan KS, Mangione-Smith R, Burwinkle TM, Rosen M, Varni JW. The PedsQL: reliability and validity of the short –form generic core scales and asthma module. Med Care. 2005;43(3):256-65.
84. Varni JW, Limbers CA. The PedsQL 4.0 generic core scales young adult version: feasibility, reliability and validity in a university student population. Health Psychol. 2009;14(4):611-22.
85. Varni JW, Limbers CA, Neighbors K, Schulz K, Lieu JEC, Heffer RW et al. The PedsQL infant scales: feasibility, internal consistency, reliability and validity in health and ill infants. Qual Life Res. 2011;20(1):45-55.

86. Grindler DJ, Blank SJ, Schulz KA, Witsell DL, Lieu JE. Impact of otitis media severity on children's quality of life. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;151(2):333-40.
87. Bell N, Kruse S, Simons RK, Brussoni M. A spatial analysis of functional outcomes and quality of life outcomes after pediatric injury. *Inj Epidemiol*. 2014;1(1):16,1-10.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da Pesquisa: “Avaliação da dor musculoesquelética e produção de colágeno em pacientes portadores de osteogênese imperfeita suplementados com vitamina C: Estudo piloto de um ensaio clínico controlado e randomizado”. – Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – UNISUL.

Pesquisadores: Dra. Cinthia Faraco Martinez Cebrian e Dra. Franciane Bobinski.

Local da Pesquisa: Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG). Rui Barbosa, 152, Agrônômica, Florianópolis / SC.

Senhores Pais:

Por favor, leiam atentamente as instruções abaixo antes de decidir com seu (sua) filho(a) se ele(a) deseja participar do estudo e se o Senhor(a) concorda com que ele(a) participe do presente estudo. Se possível, discuta esse assunto com seu (sua) filho(a) para que seja uma decisão em conjunto. Se existirem dúvidas, por favor, peça esclarecimentos aos pesquisadores.

Você está sendo convidado a permitir que seu filho participe do estudo acima cujos objetivos são: identificar o nível de dor em pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita e avaliar se há melhora da dor, da inflamação e da produção de colágeno após a suplementação com vitamina C ou placebo por 6 meses. Será feito um sorteio prévio que definirá qual das medicações (vitamina C ou placebo) seu filho irá tomar. A participação do paciente no referido estudo, será no sentido de tomar corretamente a suplementação prescrita e permitir que sejam feitos exames laboratoriais no sangue que for colhido durante duas internações hospitalares. Não serão necessárias punções venosas adicionais além da que é realizada normalmente durante a internação para o tratamento da Osteogênese Imperfeita com pamidronato dissódico. Além disso vocês deverão responder a questionários sobre possível dor que seu filho apresente. Esta coleta de dados se fará em dois momentos, um antes do uso da medicação e outro, seis meses após. Estas duas coletas de dados serão feitas durante as internações de rotina para aplicação do pamidronato dissódico segundo o protocolo já estabelecido e do qual seu filho já faz parte.

Da pesquisa a se realizar, pode-se esperar alguns benefícios, tais como: melhora da dor e da qualidade da massa óssea devido à melhora da produção de colágeno. Por outro lado, você será esclarecido sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. O paciente pode apresentar efeitos colaterais

a administração da vitamina C, como dor de estômago e diarreia, mas estes sintomas são raros. Nestes casos, você deve informar o responsável pela pesquisa e a suplementação será suspensa. Deixar de utilizar a vitamina C não traz nenhuma piora da situação clínica atual. Do mesmo modo, o uso de placebo não causa malefícios a saúde, já que é uma medicação sem princípio ativo.

A privacidade do menor que você é responsável, será respeitada, ou seja, nome ou qualquer outro dado ou elemento (como por exemplo: fotografia e exame radiográfico) que possam de qualquer forma identificá-lo, serão mantidos em sigilo. Todos os dados coletados serão utilizados exclusivamente para esta pesquisa e serão descartados adequadamente após cinco anos.

Informamos também que você pode recusar a permitir a participação do menor neste estudo, sem precisar justificar e sem prejuízo ao seu tratamento. Também poderá mudar de ideia e solicitar que o menor não faça mais parte da pesquisa. Se isto ocorrer, o Termo de Consentimento será anulado e os dados descartados, sem prejuízo à assistência que o paciente recebe e ao tratamento convencional com pamidronato dissódico realizado no HIJG.

Do ponto de vista financeiro, as regulamentações éticas brasileiras proíbem oferecer incentivos financeiros ou outros que possam interferir na plena liberdade de consentir na participação em pesquisa. Além disso, não haverá nenhum custo adicional para você ou para sua família se decidir participar deste estudo. É assegurada a assistência durante toda a pesquisa, bem como é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação do paciente do qual sou responsável. Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Dra. Cinthia F. M. Cebrian e Dra. Franciane Bobinski e você poderá manter contato pelo telefone (48) 3251-9114. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do HIJG. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada de forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o CEP do HIJG, pelo telefone (48) 3251-9092 ou pelo e-mail cephijg@saude.sc.gov.br. Você pode fazer a reclamação sem se identificar.

Para finalizar, você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Certificado do Consentimento

Eu entendi que a pesquisa é sobre a avaliação da dor, da inflamação e do colágeno (um dos componentes do osso) em portadores de osteogênese imperfeita suplementados com vitamina C ou placebo. Também compreendi que se eu concordar que o menor do qual sou responsável faça parte dessa pesquisa significa que ele tomará vitamina C ou placebo por seis meses, análises bioquímicas serão feitas em seu no sangue e responderemos a questionários sobre a presença de dor.

Eu aceito, por livre vontade, que o menor do qual sou responsável
_____ *(nome do menor)* **participe dessa**
pesquisa.

Nome do responsável

Assinatura

Dra. Cinthia F. M. Cebrian – CRM SC 13134

Assinatura

APÊNDICE B – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido I
(maiores de 6 anos e menores de 12 anos de idade)

Título da Pesquisa: “Avaliação da dor musculoesquelética e produção de colágeno em pacientes portadores de osteogênese imperfeita suplementados com vitamina C: estudo piloto de um ensaio clínico controlado e randomizado”. – Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – UNISUL.

Pesquisadores: Dra. Cinthia Faraco Martinez Cebrian e Dra. Franciane Bobinski.

Local da Pesquisa: Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG). Rui Barbosa, 152, Agronômica, Florianópolis / SC.

O que significa assentimento? Significa que você concorda em fazer parte de um grupo de crianças para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer. Pode ser que este documento contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informações ao paciente sobre esta pesquisa:

Você está sendo convidado a participar da pesquisa citada acima, realizada pela Dra. Cinthia F. M. Cebrian. Também perguntaremos aos seus pais/responsáveis se você pode participar. Você só precisa participar da pesquisa se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. As crianças que irão participar desta pesquisa têm idades entre zero e dezoito anos. Queremos saber se a vitamina C ajuda a diminuir a dor e a deixar o osso mais forte, com menos chance de quebrar.

A pesquisa será feita no Hospital Infantil, onde as crianças responderão a algumas perguntas sobre dor. Além disso, pegaremos um pouco a mais do seu sangue, quando você estiver fazendo o seu exame de sangue de rotina durante a internação para o pamidronato, para pesquisar a dor, a inflamação e o colágeno (uma das partes do osso). No momento da alta, você e seu responsável receberão o remédio (vitamina C ou placebo), que deverá ser tomado por seis meses. Quando você voltar ao hospital para internar novamente (seis meses depois) como é de

rotina no seu tratamento, será colhido mais um pouco de sangue e os exames de sangue serão repetidos conforme a sua rotina de internação, para receber o pamidronato.

A vitamina C é um remédio considerado seguro, mas é possível ocorrer dor na barriga e diarreia. Se isso acontecer, seus responsáveis entrarão em contato com o pesquisador responsável e a suplementação será suspensa. Outro remédio que pode ser usado no lugar da vitamina C é o placebo. O placebo também é seguro e não faz mal a saúde. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelo telefone (48) 3251-9114. Coisas boas também podem acontecer como a melhora da dor e a diminuição das fraturas.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa. Não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados em revistas e congressos médicos, mas sem identificar as crianças que participaram.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO:

A pesquisadora me explicou o que é e para que serve esta pesquisa. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer se eu participar.

Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar furioso.

A pesquisadora tirou minhas dúvidas e conversou com meus responsáveis.

Eu aceito participar desta pesquisa.

Receberei uma cópia deste termo de assentimento.

Florianópolis, ____/____/20____.

Nome da criança

Assinatura

Nome do responsável

Assinatura

Dra. Cinthia F. M. Cebrian – CRM SC 13134

Assinatura

APÊNDICE C – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido II (maiores de 12 anos de idade)

Título da Pesquisa: “Avaliação da dor musculoesquelética e produção de colágeno em pacientes portadores de osteogênese imperfeita suplementados com vitamina C: estudo piloto de um ensaio clínico controlado e randomizado”. – Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – UNISUL.

Pesquisadores: Dra. Cinthia Faraco Martinez Cebrian e Dra. Franciane Bobinski.

Local da Pesquisa: Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG). Rui Barbosa, 152, Agronômica, Florianópolis / SC.

O que significa assentimento? Significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer. Pode ser que este documento contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informações ao paciente sobre esta pesquisa:

Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa, que tem o objetivo de avaliar a dor e a melhora do colágeno (um dos componentes do osso) em pacientes portadores de osteogênese imperfeita que recebem o remédio pamidronato dissódico e que receberão vitamina C (importante para a formação de fibras colágenas que existem na pele, cartilagem e ossos) ou outra medicação que não contém princípio ativo e não faz mal à saúde (placebo), por via oral.

Você foi escolhido para participar porque preenche os requisitos desta pesquisa, ou seja, tem osteogênese imperfeita e faz uso do pamidronato dissódico. Sua participação é voluntária, portanto você não é obrigado a participar. A escolha é sua. Caso não queira participar, não haverá nenhum tipo de mudança no seu tratamento e você não será prejudicado por não querer participar. Se você decidir participar e depois mudar de ideia, retiraremos seu nome da pesquisa e você também não será prejudicado.

Você ou os seus dados não serão identificados. Apenas os pesquisadores terão acesso a estas informações. Não diremos a ninguém que você participa desta pesquisa e seu nome não aparecerá em nenhum lugar.

Como será feita esta pesquisa? Nesta pesquisa queremos saber se a vitamina C diminui a dor e ajuda a melhorar a qualidade do osso quando comparados a administração do placebo. Inicialmente serão sorteados os pacientes que receberão a vitamina C e os que receberão o placebo. Nem o médico responsável, nem os pacientes saberão qual paciente tomará vitamina C e qual tomará o placebo.

Quando você internar para receber o pamidronato endovenoso e tiver seu sangue colhido para seus exames de rotina, serão retirados 5ml de sangue a mais para os exames adicionais que serão feitos nesta pesquisa. Avaliaremos substâncias que estão relacionadas à inflamação e ao colágeno. Nesta internação você responderá a um questionário sobre a presença de dor. No momento da alta, você e seu responsável receberão a suplementação (vitamina C ou placebo), que deverá ser tomada por seis meses e receberão também uma folha para anotar se você teve dor ou não durante estes seis meses. Quando você voltar ao hospital para internar novamente (seis meses após a internação onde foram feitos os exames iniciais), como é de rotina no seu tratamento, será colhido mais 5ml de sangue e os exames de sangue serão repetidos conforme a sua rotina de internação para receber o pamidronato.

Riscos/ desconfortos: você pode sentir algum desconforto durante a coleta de sangue, mas que é habitual; e pode sentir algum desconforto gastrointestinal (dor ou diarreia) com o uso da vitamina C, mas que acaba se a parar a medicação. Qualquer alteração, você deve comunicar a responsável pela pesquisa e a suplementação será suspensa.

Benefícios: Embora os resultados só sejam confirmados no fim da pesquisa, espera-se com o uso da vitamina C, uma melhora da dor e da qualidade do colágeno, diminuindo o número de fraturas e deformidades ósseas.

Incentivos/ Custos: As regulamentações éticas brasileiras proíbem oferecer incentivos financeiros ou outros que possam interferir na plena liberdade de consentir na participação em pesquisa. Não haverá custos para nenhum dos participantes da pesquisa.

Divulgação dos resultados: Depois que a pesquisa acabar, os resultados serão informados para você e seus responsáveis. Os dados também devem ser publicados em uma revista especializada no assunto e apresentados em conferências médicas.

Contato para dúvidas: Se você ou os seus responsáveis tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, você deve entrar em contato com a Dra. Cinthia Cebrian, por meio do telefone (48) 3251-9114. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você

pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital Infantil Joana de Gusmão. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada de forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o CEP do Hospital Infantil Joana de Gusmão, pelo telefone (48) 3251-9092 ou pelo e-mail cephiig@saude.sc.gov.br. Você pode inclusive fazer a reclamação sem se identificar.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

A partir do relatado acima, **eu concordo em participar da pesquisa.**

Eu receberei uma cópia deste Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

Florianópolis, ____/____/20____.

Nome da criança/ adolescente

Assinatura

Nome do responsável

Assinatura

Dra. Cinthia F. M. Cebrian – CRM SC 13134

Assinatura

ANEXOS

ANEXO A – Face, Legs, Activity, Cry, Consolability – Revised

Categorias	Pontuação		
	0	1	2
F Face	Sem expressão particular ou sorriso	Presença ocasional de careta ou sobrancelhas salientes, introspecção, desinteresse. Parece triste ou preocupado	Sobrancelhas esporadicamente ou constantemente salientes, mandíbulas cerradas, queixo trêmulo. Face aparentando estresse: expressão assustada ou de pânico
P Pernas	Posição normal ou relaxada	Desconforto, inquietação, tensão. Tremores ocasionais	Chutes ou pernas soltas. Aumento considerável da espasticidade, tremores constantes ou sacudidas
A Atividade	Em silêncio, posição normal, movimentando-se facilmente	Contorcendo-se, movimentando o corpo para frente e para trás, tensão. Moderadamente agitado (por exemplo, movimento da cabeça para a frente e para trás, comportamento agressivo); respiração rápida, superficial, suspiros intermitentes	Corpo arqueado, rígido ou trêmulo. Agitação intensa, cabeça chacoalhando (não vigorosamente), tremores, respiração presa em gasping ou inspiração profunda, intensificação da respiração rápida e superficial
C Choro	Sem choro (acordado ou dormindo)	Gemidos ou lamúrias, reclamações ocasionais. Impulsos verbais ou grunhidos ocasionais	Choro regular, gritos ou soluços, reclamações frequentes. Repetidos impulsos verbais, grunhidos constantes
C Consolabilidade	Contente, relaxado	Tranquilizado por toques ocasionais, abraços ou conversa e distração	Difícil de consolar ou confortar. Rejeita o cuidador, resiste ao cuidado ou a medidas de conforto
Orientações para aplicação da escala			
1- Cada uma das cinco categorias (F) Face; (L) Pernas; (A) Atividade; (C) Choro; (C) Consolabilidade é pontuada de 0-2, resultando num escore total entre zero e dez. 2- Pacientes acordados: Observe por pelo menos 1-2 minutos. Observe pernas e corpo descobertos. Reposicione o paciente ou observe a atividade, avalie tonicidade e tensão corporal. Inicie intervenções de consolo, se necessário. 3- Pacientes dormindo: Observe por pelo menos 2 minutos ou mais. Observe corpo e pernas descobertos. Se possível, reposicione o paciente. Toque o corpo e avalie tonicidade e tensão. 4- A FLACC revisada pode ser utilizada para todas as crianças não verbais. As descrições adicionais (em negrito) são descritores validados em crianças com dificuldades cognitivas. A enfermeira pode revisar com os pais os descritores dentro de cada categoria. Pergunte a eles se há comportamentos adicionais que melhor indiquem a dor em seus filhos. Adicione esses comportamentos na categoria apropriada da escala.			
© 2002, The Regents of the University of Michigan. All Rights Reserved 09-09-2009 Bussotti EA, Guinsburg R, Pedreira MLG. Traduzido para a língua portuguesa. Brasil – São Paulo, junho de 2013.			

Fonte: Bussotti e colaboradores, 2015⁷⁴.

ANEXO B – Faces Pain Scale – Revised



Portuguese (Brazil)

Estas caras mostram o quanto alguma coisa pode doer. Esta cara *[aponte para a face mais à esquerda]* não mostra dor. As caras mostram cada vez mais dor *[aponte para cada uma das faces da esquerda para a direita]* até chegar a esta *[aponte para a face mais à direita]* que mostra muita dor. Aponte para a cara que mostra o quanto te dói *[neste momento]*.

Alternate:

Estas faces mostram o quanto algo pode doer. Esta face (apontar a face mais à esquerda) indica não dor. As faces mostram cada vez mais dor (apontar para cada uma das faces da esquerda para a direita) até chegar a esta face (apontar a face mais à direita) que mostra muita dor. Aponte a face que mostra o quanto você sente dor (neste exato momento)

Pontue a face escolhida como 0, 2, 4, 6, 8 ou 10, contando da esquerda para a direita; sendo 0 = sem dor e 10 = com muita dor. Não use palavras como “alegre” ou “triste”. Esta escala tem por objetivo medir como as crianças se sentem internamente e não como aparentam estar.

Translation credit: Cláudia Lígia Esperanza Charry Poveda, José Aparecido Da Silva, Paola Passareli, Joseane dos Santos, Maria Beatriz Martins Linhares, University of São Paulo, Brazil

Fonte: Charry e colaboradores, 2014⁷⁶; Homepage IASP⁷⁵.

Disponível em português em <http://www.iasp-pain.org/Education>

ANEXO C – Adolescent Pediatric Pain Tool

CÓDIGO _____

DATA _____

**INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DA DOR EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES****INSTRUÇÕES:**

1. Pinte as áreas deste desenho para mostrar onde você sente dor.
Ao colorir, faça as áreas grandes ou pequenas para mostrar a dor
que você tem nesse local.

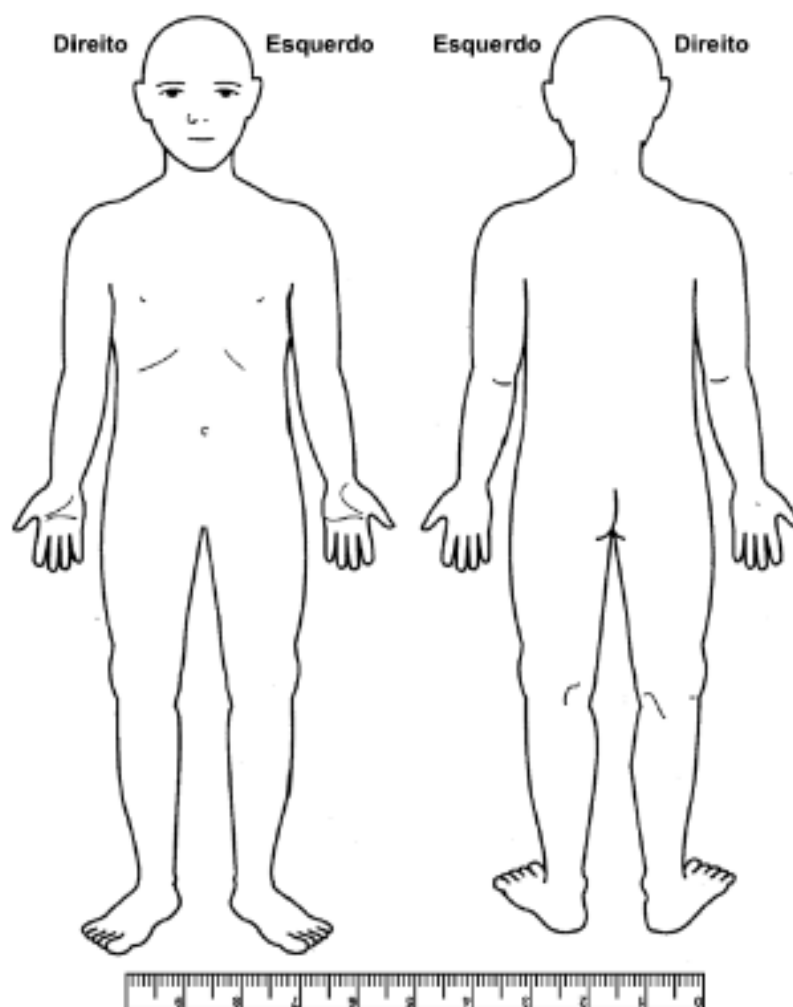
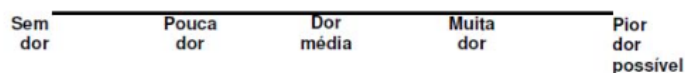


Figura 2 - Frente da versão do APPT-P-Brasil. Ribeirão Preto, 2011

2. Faça um traço nesta linha, de cima para baixo, para mostrar o quanto de dor você tem.



3. Indique ou faça um círculo em todas as palavras que descrevem a sua dor.

1	5	10	15
Que incomoda	Como uma bolha	Muito desagradável	Para e recomeça
Ruim	Arde	Mortal	De vez em quando
Horível	Quente	Faz morrer	Começa devagar
Infeliz		Que mata	Às vezes
Terrível	6		Sempre igual
	Como uma câibra	11	
2	Esmagadora	Faz chorar	
Dolorida	Como um beliscão	Assustadora	Se você quiser,
Que machuca	Belisca	Faz gritar	pode acrescentar
Fraca mas não	Pressão	Aterrorizante	outras palavras.
desaparece nunca			
Como um			
machucado			
Sensível	7	12	
	Causa coceira	Causa tontura	
3	Como um arranhão	Deixa enjoado	
Pulsante	Como uma picada	Sufocante	
Como uma pancada	Arranha		
Como uma	Que pica		
martelada			
Como um murro		13	
Latejante	8	Não passa	
	Como um choque	Incontrolável	
	Como um tiro de		
4	revolver	14	
Mordida	Que racha	Sempre presente	
Cortante		Vai e volta	
Como um alfinete	9	Vem de repente	
Como uma faca		Sempre a mesma	
afiada	Dormente	dor	
Como uma	Endurecida	Que não para	
alfinetada	Inchada	Para sempre	
Pontada	Apertada		
Facada			

Figura 3 - Verso da versão do APPT-P-Brasil. Ribeirão Preto, 2011

Fonte: De Bortoli, 2011⁷⁸.

ANEXO D – Parecer Consubstanciado do CEP



HOSPITAL INFANTIL JOANA
DE GUSMÃO/ SES -SC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA DOR MUSCULOESQUELÉTICA E PRODUÇÃO DE COLÁGENO EM PACIENTES PORTADORES DE OSTEOGÊNESE IMPERFEITA SUPLEMENTADOS COM VITAMINA C: ESTUDO PILOTO DE UM ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO E RANDOMIZADO.

Pesquisador: CINTHIA FARACO MARTINEZ CEBRIAN

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 79594517.3.0000.5361

Instituição Proponente: Hospital Infantil Joana de Gusmão/ SES - SC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E INOVAÇÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.450.363

Apresentação do Projeto:

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença congênita rara, causada por uma alteração nos genes que codificam o colágeno tipo I, presente nos ossos e em outros tecidos. Assim, pacientes que apresentem defeitos na síntese do colágeno apresentarão, entre outras características, um tecido ósseo de má qualidade.

A característica principal da doença é a fragilidade óssea, com fraturas decorrentes de trauma de baixa energia e deformidades ósseas, além de dor musculoesquelética. Atualmente não existe cura para a OI, e a medicação de escolha é o pamidronato dissódico endovenoso, um bisfosfonado de terceira geração, capaz de melhorar a qualidade óssea através da diminuição da reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos, diminuindo-se assim o número de fraturas. Com relação ao tratamento da dor, não existe um tratamento específico para a dor crônica musculoesquelética em pacientes portadores de OI, nem tampouco entendese seu mecanismo.

A opção discutida nesta pesquisa é a suplementação com a vitamina C, um fator fundamental para a síntese do colágeno. Além disso, sua ausência também está associada a presença de dor crônica musculoesquelética. O objetivo deste estudo é avaliar se a suplementação com vitamina C pode melhorar a dor e a qualidade do colágeno. Os pacientes serão randomizados em dois grupos e

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agronômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br



Continuação do Parecer: 2.450.363

receberão suplementação com vitamina C ou placebo por seis meses. Serão realizadas análises bioquímicas em amostras de sangue destes pacientes para avaliar citocinas pró e anti-inflamatórias, além da hidroxiprolina (um marcador da síntese do colágeno). Estas análises serão realizadas em dois momentos, o primeiro antes da suplementação e o segundo, seis meses após a suplementação. Os participantes do estudo também responderão a um questionário validado para avaliação da dor. Todos os dados serão analisados e comparados.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com vitamina C ou placebo na dor crônica, na inflamação e na síntese do colágeno em pacientes portadores de osteogênese imperfeita em uso de pamidronato dissódico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar quantitativamente e qualitativamente a dor crônica em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Quantificar os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias TNF-, IL-1, IL-6 e MMP-9 e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Quantificar os níveis plasmáticos de hidroxiprolina em pacientes com OI, (como marcador do colágeno) em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Correlacionar os resultados obtidos através das escalas de dor com os níveis plasmáticos de citocinas pró e anti-inflamatórias e hidroxiprolina em pacientes com OI, em uso de pamidronato dissódico, suplementados com vitamina C ou placebo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

adequadamente descritos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante do ponto de vista social pelo conhecimento a ser gerado. O pesquisador apresentou informações que o credencia tecnicamente a executar o protocolo de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequadamente entregues

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephiig@saude.sc.gov.br



HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 2.450.363

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as Pendências elencadas no Número do Parecer: 2.376.080 datado de 10/10/17 foram adequadamente respondidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme preconizado na Resolução 466/2012, XI.2, item d, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final.

Assim sendo, o(a) pesquisador(a) deve enviar relatórios parciais semestrais da pesquisa ao CEP (a partir de JUNHO/2018) e relatório final quando do seu encerramento.

Um modelo deste relatório está disponibilizado no site <http://www.saude.sc.gov.br/hijg/cep/deveresdopesquisador.htm>

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1026435.pdf	08/12/2017 18:05:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP07_12_17.docx	08/12/2017 18:03:40	CINTHIA FARACO MARTINEZ CEBRIAN	Aceito
Outros	Resposta_ao_cep.docx	08/12/2017 18:02:44	CINTHIA FARACO MARTINEZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermosdeConsentimentoeAssentimento.docx	06/11/2017 10:02:06	CINTHIA FARACO MARTINEZ CEBRIAN	Aceito
Folha de Rosto	img20171106_08060900.pdf	06/11/2017 09:43:34	CINTHIA FARACO MARTINEZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br



HOSPITAL INFANTIL JOANA
DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 2.450.363

FLORIANOPOLIS, 20 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Vanessa Borges Platt
(Coordenador)

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br