

GIULLIANNA TAYAR

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM
OSTEOPOROSE**

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre em
Genética**

Orientadora: Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes

São José do Rio Preto – SP

2006

GIULLIANNA TAYAR

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM
OSTEOPOROSE**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista, Câmpus de São José do Rio Preto, SP, para
a obtenção do título de Mestre em Genética.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nívea D T Conforti Froes

**Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dorotéia Rossi Silva
Souza**

São José do Rio Preto

2006

Tayar, Giullianna.

Avaliação genética de pacientes com osteoporose / Giullianna

Tayar. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2006

116 f.: il. ; 30 cm.

Orientador: Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular. 2. Osteoporose. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Receptor da Vitamina D(VDR). 5. Apolipoproteína E (APOE). 6. Glutatião-S-transferases M1 e T1. 7. Suscetibilidade genética. I. Conforti-Froes, Nívea Dulce Tedeschi. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616.71-007.234

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista e no Núcleo de Pesquisas em Biologia Molecular e Bioquímica da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, sob orientação da Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes e co-orientação da Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, com bolsa CAPES.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Meire e Sivany** e
meus irmãos **Gabrielle e Sivany Filho**.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

... À Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes, minha amiga, orientadora, iniciadora e incentivadora nos caminhos da pesquisa e mentora deste trabalho, que se manteve sempre presente com orientação e amizade, mesmo diante de todas atribuições.

... À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, pela disponibilidade com que aceitou esta co-orientação, durante o período de licença saúde de minha orientadora, e também pelo acolhimento, consideração, força e amizade.

...Ao Dr. Pedro Vilela e a Dra. Lúcia Buffulin pela cessão de pacientes.

... Ao Prof Dr José Antonio Cordeiro, do Departamento de Bioestatística da FAMERP, pelas análises estatísticas e pela receptividade com que me acolheu.

...Às Profas. Dras. Adriana Madeira e Eny Maria Goloni Bertollo, pela participação como membros da Banca.

... À todos os professores do curso de Pós-Graduação, em especial, à Profa. Dra. Maria Tercília de Azeredo Oliveira Vilela e Cláudia Bonini pela atenção, compreensão, colaboração e incentivo.

... Às enfermeiras Kikuê Kamoi, Gabrielle Tayar e Alice pela preciosa contribuição na coleta de amostras de sangue.

... Aos funcionários do Departamento de Biologia e Departamento de Pós-Graduação, principalmente à Simone e Rosemar, por serem sempre tão prestativos e atenciosos.

... A todos os pacientes que participaram deste estudo cedendo as amostras, indispensáveis para a realização do trabalho.

... À Francine Teresa Brioni Nunes e Marcela Pinhel pela amizade verdadeira e ajuda indispensável.

... À Ivannei Mazza e Silvania Cabral pela amizade.

... Aos amigos e meus alunos da Coopen pela compreensão e incentivo.

... Aos amigos e companheiros de laboratório Carolina Barros, Rosa Maria do Vale Bosso, Gisele Sousa, Marcelo Nakazone, Rafael Piteri, Máisa e Mauro pela ajuda, e pela convivência agradável.

... À Unesp e a Famerp pela oportunidade.

... À Capes pelo incentivo financeiro.

...À minha querida família por toda a dedicação, apoio e amor. Ao Juliano pela amizade, ajuda e paciência. À minha madrinha Carmem por todo amor. À minha tia Dolores por sempre acreditar em mim. À Pantera, Duque, Fred, Ribamar e Lolinha por me divertirem sempre.

...À Deus por me abençoar e dar forças para seguir.

“O nascimento do pensamento é igual ao nascimento de uma criança: tudo começa com um ato de amor. Uma semente há de ser depositada no ventre vazio. E a semente do pensamento é o sonho. Por isso os educadores, antes de serem especialistas em ferramentas do saber, deveriam ser especialistas em amor: intérpretes de sonhos.”

Rubem Alves

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	09
I.1 Considerações Gerais.....	10
I.2 Fatores de Risco no Desenvolvimento da Osteoporose.....	13
I.3 Suscetibilidade Genética à Osteoporose.....	18
II. OBJETIVOS.....	26
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
III.1 Casuística.....	29
III.2 Método.....	29
III.2.1 Avaliação dos Pacientes.....	29
III.2.2 Genotipagem.....	30
III.2.2.1 Extração de DNA.....	30
III.2.2.3 Polimorfismos VDR-FokI	33
III.2.2.4 Polimorfismos de GSTT1 e GSTM1.....	35
III.2.3. Análise Estatística.....	37
IV. RESULTADOS.....	38
IV.1 Frequências Alélicas e Genóticas para apo E- <i>HhaI</i> , VDR- <i>FokI</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> ..	39
IV.2 Antecedentes Pessoais.....	43
IV.3 Associação entre Antecedentes Pessoais e Polimorfismos E- <i>HhaI</i> , VDR- <i>FokI</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	44
IV.4 Associação entre os Polimorfismos E- <i>HhaI</i> , VDR- <i>FokI</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	46
IV.5 Influência da idade, hábito de fumar e dos polimorfismos de apoE- <i>HhaI</i> , VDR- <i>FokI</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> na Osteoporose.....	48
IV.6 Segregação dos alelos apoE- <i>HhaI</i> , VDR- <i>FokI</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> na população estudada.....	48
V. DISCUSSÃO.....	49
VI. CONCLUSÕES.....	56
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
IX. RESUMO.....	76
X. ABSTRACT.....	78
XI. APÊNDICE 1.....	80
XII. APÊNDICE 2.....	82
XIII. APÊNDICE.....	103

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

As doenças metabólicas pertencem a um grupo heterogêneo de afecções que afeta o colágeno ou a deposição mineral esquelética (RAUBENHEIMER, 2004). Em países desenvolvidos a maioria das doenças ósteo-metabólicas está associada à idade avançada, imobilidade e uso de drogas, enquanto nos países em desenvolvimento destacam-se os fatores nutricionais. Tais doenças, em geral, progridem de modo sub-clínico e são diagnosticadas tardiamente, quando aparecem as manifestações do estágio de debilitação final do esqueleto (RAUBENHEIMER, 2004).

A osteoporose é a doença metabólica do osso mais prevalente nos países desenvolvidos. É definida como uma afecção esquelética sistêmica, caracterizada por baixa massa e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, conduzindo ao conseqüente aumento na fragilidade óssea e suscetibilidade a fraturas não-traumáticas (*CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, DIAGNOSIS, PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF OSTEOPOROSSES*, 1993; WOOD & FLEET, 1998; GENNARI *et al.*, 2002). Entende-se por massa óssea, a diferença entre a quantidade máxima de densidade mineral adquirida durante o crescimento, ou seja, até o fim da puberdade quando se observa o pico de massa óssea, e a posterior perda verificada durante a senilidade (FERRARI *et al.*, 1999).

O osso é um tecido altamente ativo metabolicamente, no qual os processos osteoblásticos de formação óssea e osteoclásticos de reabsorção óssea são contínuos ao longo da vida (GENNARI *et al.*, 2002). Os osteoblastos e osteoclastos, agindo em conjunto no processo de remodelação, asseguram a manutenção da estrutura óssea normal (PIETSCHMANN & PETERLIK, 1999; GENNARI *et al.*, 2002). A perda da homeostase óssea pode resultar em

diminuição da massa óssea levando à osteoporose ou a um defeito na mineralização do osso (GENNARI *et al.*, 2002). (Figura 1)



Figura 1. Organização do osso trabecular de um indivíduo não osteoporótico (esquerda) e de outro com osteoporose (direita).

Em consequência de ser uma doença silenciosa, que pode progredir sem detecção por décadas, a osteoporose é considerada como um dos principais e crescentes problemas de saúde em todo o mundo, afetando milhões de indivíduos e atingindo a qualidade de vida de idosos (EPSTEIN & GOODMAN, 1999; VON MUHLEN *et al.*, 1999). Os custos relacionados à osteoporose são considerados como o maior encargo para as autoridades de saúde dos países desenvolvidos. Na Bélgica, por exemplo, tem sido classificada como o maior problema econômico de saúde, com um custo total de 126 milhões de dólares por ano. Nos Estados Unidos, estima-se que a ocorrência de perda óssea atinja cerca de um quarto da população (mais de vinte e cinco milhões de indivíduos afetados), sendo 12% de homens e 40% de mulheres; em todo o mundo pode ser estimada em até 220 milhões de pessoas. O custo do tratamento nesse país supera a cifra de 10 bilhões de dólares anuais (REGINSTER *et*

al., 1999). É pertinente ressaltar que a osteoporose afeta principalmente mulheres pós-menopausadas, mas também homens. Devido ao aumento da incidência nesse gênero, tem se tornado evidente a necessidade da inclusão dos homens nos programas de prevenção (EBELING, 1998; PRAKASAM *et al.*, 1999).

A fratura é o efeito clínico mais importante da osteoporose, cuja incidência aumenta com a idade e nos indivíduos da raça branca. As fraturas osteoporóticas podem afetar qualquer ponto do esqueleto, exceto o crânio. Mais comumente, as fraturas ocorrem na porção distal do antebraço, coluna vertebral lombar e torácica e porção proximal do fêmur. Enquanto as fraturas de quadril e rádio constantemente são diagnosticadas, as fraturas vertebrais têm apresentação clínica variável, visto que a maioria delas é assintomática. As fraturas de quadril contraem os maiores custos diretos para os serviços de saúde e ocorrem principalmente em idosos, provocando substancial morbidade e mortalidade. Por outro lado, as fraturas osteoporóticas de vértebra e antebraço são de significância econômica menor, mas também provocam importante morbidade. As conseqüências das fraturas vertebrais incluem dores nas costas e invalidez, cifose e perda de altura. A qualidade de vida começa a ser prejudicada progressivamente com o aumento do número e gravidade das fraturas vertebrais. Além disso, o risco de outras fraturas é grandemente aumentado em pacientes com uma ou mais fraturas vertebrais (MELTON *et al.*, 1999).

Nos Estados Unidos, tem sido estimado que, pelo menos 90% de todas as fraturas de quadril e coluna entre mulheres brancas idosas, acrescidas de mais de 70% daquelas entre homens brancos idosos podem ser atribuídas à osteoporose (MELTON *et al.*, 1997). O risco de fraturas em mulheres de 50 anos é cerca de 16% para as fraturas de quadril, 15% para as de punho e 32% para as de vértebras (CUMMINGS *et al.*, 1993). Aproximadamente, 50% de todas as mulheres irão ter osteoporose aos 80 anos de idade. Inversamente, homens brancos de 50 anos de idade têm cerca de 6% de risco para fraturas de quadril e entre 16 a 25% de

risco de qualquer outra fratura osteoporótica (BILEZIKIAN, 1999). De importância notória, os custos relacionados às fraturas de quadril têm sido calculados a dobrarem nos próximos 25 anos (COOPER *et al.*, 1992b).

Na verdade, por causa do aumento da expectativa de vida da população, o número de indivíduos com osteoporose irá aumentar drasticamente durante os próximos anos, com enormes implicações na saúde de homens e mulheres. A prevenção e tratamento da osteoporose são, portanto, de principal importância para as organizações de saúde em todos os países, pois metade de todos os pacientes acometidos de fraturas dificilmente retorna às condições de vida anteriores (GENNARI *et al.*, 2002). Como agravante, existe um aumento do índice de mortalidade dentro do primeiro ano da fratura (KULAK & BILEZIKIAN, 1998; EPSTEIN & GOODMAN, 1999), com implicações significativas nos orçamentos de todas as nações. Conseqüentemente, a osteoporose é considerada o maior problema de saúde do mundo (ROUSSEAU, 1997; WALKER-BONE *et al.*, 1998; GENNARI *et al.*, 2002).

I.2 Fatores de Risco no Desenvolvimento da Osteoporose

A típica mulher peri-menopausada irá, normalmente, começar a perder osso quando os níveis de estrógeno declinam e as taxas de reabsorção e remodelação ósseas e a atividade osteoclástica aumentam por si próprias, devido à perda dos efeitos supressivos do estrógeno sobre receptores ósseos (RIGGS *et al.*, 1998). Isto pode ocorrer devido à menopausa natural ou de forma precoce decorrente de ooforectomia completa. Por outro lado, os homens também perdem osso com o avanço da idade, por causa da redução na produção dos hormônios (ORWOLL *et al.*, 1990; ORWOLL, 1998). Nessa relação, os osteoclastos causam mais perda óssea do que os osteoblastos podem reconstituir, causando a perda do balanço normal e reparo da remodelação óssea (ETTINGER, 2003).

A massa óssea e as taxas de remodelação (reabsorção) óssea são os principais componentes, tornando mensurável o risco de fratura, que devido à osteoporose, aumenta continuamente conforme a densidade mineral óssea (DMO) declina, com aumento aproximado de duas vezes no risco de fratura para cada desvio padrão diminuído na DMO (CUMMINGS *et al.*, 1993). O idoso, tanto os homens como as mulheres, perde massa óssea e a taxa de perda óssea é inicialmente maior em mulheres do que em homens (BURGER *et al.*, 1998).

Os idosos apresentam, particularmente, alto risco de fraturas por osteoporose, não apenas por causa das anormalidades na massa e arquitetura óssea, mas também devido a fatores que afetam a incidência de quedas (HUI *et al.*, 1988; DE LAET *et al.*, 1997). Embora a DMO reduzida seja um poderoso fator de predição de fraturas ou mesmo de pequenos traumas futuros, há a sugestão de que na osteoporose o risco de fraturas também esteja baseado em outros aspectos de qualidade óssea, não somente a DMO (LINDSAY *et al.*, 2001; ETTINGER, 2003). Em complementação à baixa DMO, o risco de fratura aumenta com a taxa elevada de remodelação, independentemente da DMO (RIGGS & MELTON, 2002).

É intuitivo que a fragilidade óssea seja afetada pelo tamanho, formato, pela arquitetura e qualidade óssea (TURNER, 2002), mas fatores nutricionais também contribuem para a perda óssea e retardam a velocidade do reparo de fraturas. Esses incluem a baixa ingestão de cálcio e vitamina D, má-nutrição, hábito de fumar, etilismo, diminuição na absorção de cálcio ao longo do trato gastrintestinal (ocorre com o aumento da idade), e desequilíbrio na conversão renal da vitamina D (KYRO *et al.*, 1993; KEIVER *et al.*, 1997; ROSEN & KIEL, 1999; UENG *et al.*, 1999).

A nutrição, particularmente com relação ao consumo de proteínas, produtos lácteos e verduras, tem sido referida como contribuinte da formação da massa óssea (ANDERSON,

1999; RIZZOLI & BONJOUR, 1999). A suplementação de cálcio e vitamina D na infância parece também desempenhar papel importante na saúde dos ossos (WARDLAW, 1993). Estudos retrospectivos em adultos sugerem que o consumo de cálcio na primeira fase do desenvolvimento está associado com o risco de ocorrência de fraturas e o desenvolvimento de osteoporose na fase adulta (STALLINGS, 1997). Entretanto, é possível que a sensibilidade de absorção desse nutriente varie dependendo do genótipo do indivíduo (NAKAMURA, 1997).

O uso de cafeína, o consumo de álcool e o hábito de fumar parecem influir na diminuição da densidade óssea (ULLOM-MINNICH, 1999). Com relação à cafeína, seu efeito provavelmente está associado com o fato de que ela aumenta a excreção de cálcio. De um modo geral, seu consumo diário de mais de duas xícaras por dia está moderadamente associado com o aumento de fraturas (KIEL *et al.*, 1990; HERNANDEZ-AVILA *et al.*, 1991). Contudo, outros autores discordam desses resultados, afirmando ser inconsistente a associação da cafeína com o aumento do risco de fratura e o desenvolvimento da osteoporose (COOPER *et al.*, 1992a; LLOYD *et al.*, 1997).

Uma maior concordância de resultados ocorre, todavia concernente à relação entre o hábito de fumar e o consumo de álcool com o risco de fraturas. O cigarro é considerado um fator de risco moderado para a osteoporose (ILL & ALEXANDRE, 1993), uma vez que os seus componentes químicos, entre eles a nicotina, atuam deprimindo a atividade do osteoblasto, tanto diretamente ou por via hormonal (LAROCHE *et al.*, 1994). O hábito de fumar induz estresse bioquímico em diversos tecidos. Tal estresse faz parte dos componentes ambientais, que contribuem para a nutrição e circulação sanguíneas, ambas alteradas no osso, além de aumentar a excreção de cálcio urinário favorecendo o desenvolvimento da osteoporose (ODA *et al.*, 2004). A ocorrência de um déficit médio de 5 a 10% na densidade óssea de indivíduos fumantes também é relatada (HOPPER & SEEMAN, 1994). Por seu efeito prejudicial na DMO, o cigarro tem sido também apontado como capaz de aumentar o

risco a fraturas (MAY *et al.*, 1994), bem como de induzir a perda de massa óssea em homens e mulheres, provavelmente pelo seu efeito anti-estrogênico, que reduz o nível de estradiol e aumento de globulinas ligantes de hormônios sexuais (DANIEL *et al.*, 1992; HOLLENBACH *et al.*, 1993; EGGER *et al.*, 1996).

É pertinente ressaltar que os efeitos deletérios do cigarro não ficam restritos apenas aos indivíduos idosos. Ortego-Centeno *et al.* (1997) relatam perda de massa óssea em homens jovens e saudáveis, considerados fumantes pesados (mais de 21 cigarros/dia). A partir de um estudo realizado em gêmeos monozigóticos, constatou-se que os indivíduos fumantes apresentaram incidência 20% superior de degeneração discal e deficiência da densidade mineral óssea vertebral, comparada com indivíduos não fumantes (BATTIÉ *et al.*, 1991). Evidências epidemiológicas vêm adicionar provas de que fumantes crônicos possuem vértebras menos resistentes e apresentarem avanço da desmineralização óssea, o que pode acelerar o desenvolvimento de osteoporose (OKTENOGU *et al.*, 2002). Em suma, o hábito de fumar parece estar envolvido com a osteoporose, como importante fator de risco para a doença em humanos.

A atividade física tem sido apontada como fator favorável no aumento da massa óssea reduzindo, conseqüentemente, o risco de fraturas (GREGG *et al.*, 1998). Os benefícios específicos de um programa regular de exercícios incluem o controle da obesidade, melhora do perfil lipídico sérico e a otimização da ingestão de micronutrientes (SHEPHARD, 1989; NGUYEN *et al.*, 1998). Aconselha-se o exercício físico desde a infância, por ser esse o período de formação da massa óssea (BASS *et al.*, 1998). Ao mesmo tempo, é prudente evitar a atividade física exagerada durante a puberdade, uma vez que numerosos estudos demonstram distúrbios hormonais ao nível do eixo pituitário do hipotálamo, em atletas jovens (AEBERSOLD-SCHUTZ, 1997).

A idade, o sexo feminino, corpo longilíneo e a raça branca também são fatores de risco bem estabelecidos para fraturas osteoporóticas (CADARETTE *et al.*, 2001). Homens e mulheres negros, tanto os de meia idade, como os mais idosos têm massa óssea maior e taxas de fraturas substancialmente menores do que indivíduos brancos (BARRET-CONNOR *et al.*, 2005). Desse modo, em parte devido ao seu risco reduzido, os negros têm sido apenas recentemente incluídos em estudos prospectivos de osteoporose com medidas de DMO e incidência de fraturas (BARRET-CONNOR *et al.*, 2005; CAULEY *et al.*, 2005).

A densidade mineral óssea é altamente indicativa do risco de fraturas em mulheres brancas (MARSHALL *et al.*, 1996). Entretanto, a cada unidade de DMO (desvio-padrão), as taxas de fratura para mulheres negras foram de 30 a 40% menores do que as de mulheres brancas. Quando ajustados para DMO e outros fatores de risco que diferem entre os dois grupos, mulheres negras no grupo de estudo de fraturas osteoporóticas (CAULEY *et al.*, 2005) tiveram menos que a metade do risco de fraturas comparadas com as mulheres brancas.

Uma doença multifatorial como a osteoporose, resulta de processos genéticos, ambientais, comportamentais e sociais (KEITA *et al.*, 2004). A descoberta de diferenças na história natural das fraturas entre os grupos populacionais é o primeiro passo para a definição de medidas clínicas da diferença individual à suscetibilidade a fraturas (KRAVITZ *et al.*, 2004). A definição dos fatores genéticos e ambientais responsáveis pelas variações na massa óssea durante o crescimento esquelético pode ajudar na identificação de crianças com risco para osteoporose e fraturas na fase adulta (RIGGS & MELTON, 1986). Os desafios são a identificação e o tratamento de mulheres suscetíveis, mas assintomáticas até que o risco de fratura possa ser reduzido tão rapidamente quanto possível, uma vez que uma fratura, de pequeno trauma em um paciente idoso, pode ser o gatilho que provoca a osteoporose (ETTINGER, 2003).

I.3 Suscetibilidade Genética à Osteoporose

O crescimento e desenvolvimento do esqueleto iniciam-se nos primórdios da vida fetal e procede por duas décadas em uma série de eventos bem definidos. O osso nunca está metabolicamente inativo, sua matriz e suplementos minerais estão sendo remodelados constantemente, ao longo das linhas de estresse mecânico (MARCHIGIANO,1997).

Baseado nas medidas de DMO estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente oito milhões de mulheres e dois milhões de homens nos Estados Unidos, atualmente são portadores de osteoporose (LINDSAY & COSMAN, 2001).

Muitos tipos de genes estão envolvidos no metabolismo ósseo, entre eles figuram aqueles que codificam para hormônios esteróides, calcitropicos e seus receptores, proteínas da matriz óssea, citocinas e fatores de crescimento, entre outros (LIU *et al.*, 2003), referidos como candidatos participativos da osteoporose (GENNARI & BRANDI, 2001).

Em raras instâncias, a osteoporose pode ser herdada como uma forma mendeliana simples, como por exemplo, as síndromes osteoporóticas familiares, que ocorrem devido a mutações nos genes para aromatase e receptor alfa de estrógeno (SMITH *et al.*, 1994; MORISHIMA *et al.*, 1995). Têm sido descritas famílias, em que a alta taxa de massa óssea é herdada como um traço autossômico dominante, consistente com o efeito de um único gene localizado no cromossomo 11 (JOHNSON *et al.*, 1997).

A maioria das doenças multifatoriais exibe um claro componente genético e são frequentemente chamadas doenças poligênicas, para enfatizar sua determinação por múltiplos fatores genéticos. Considerando a complexidade biológica do esqueleto, é provável que a massa óssea esteja sob controle de grande número de genes, muitos dos quais exercem relativamente pequenos efeitos sobre a DMO, enquanto poucos contribuem substancialmente para a variação nesse traço. É provável também que existam complexas interações gene-

ambiente (GENNARI *et al.*, 2002). Possivelmente, um mesmo fenótipo para osteoporose pode ser o resultado de diferentes interações genéticas e ou ambientais.

Estudos epidemiológicos e clínicos têm delineado a importância da genética na patogênese da osteoporose. Nesse contexto, incluem-se diferenças raciais para DMO e remodelação óssea, com mulheres negras mostrando valores de DMO maiores para diferentes pontos do esqueleto comparados aos de mulheres brancas semelhantes em idade, peso, altura, ingestão de cálcio e nível de atividades físicas (LUCKEY *et al.*, 1989; SCHNITZLER *et al.*, 1990; DANIELS *et al.*, 1995). Além disso, valores de DMO diferentes têm sido observados entre populações polinésias e européias (CUNDY *et al.*, 1995). Essas variações na incidência de osteoporose entre grupos raciais e populacionais podem estar relacionadas a fatores ambientais, mas também podem refletir diferenças na suscetibilidade herdada.

Estudos familiares também confirmam a existência de contribuição genética na osteoporose, mostrando correlação nos valores de DMO entre mães e filhas, particularmente na região da coluna lombar (EVANS *et al.*, 1988; SEEMAN *et al.*, 1989; HANSEN *et al.*, 1992; LOZER *et al.*, 1996). Além disso, pares de gêmeos têm sido avaliados com sucesso em estudos genéticos e quantitativos de várias doenças, incluindo a osteoporose. A análise comparativa das diferenças intrapares em gêmeos monozigóticos e dizigóticos pode resultar de forma útil no cálculo da contribuição genética e ambiental na massa óssea, com a possibilidade de medir o quanto da variação fenotípica é causada pelo ambiente. Nos últimos anos, os resultados de vários estudos de gêmeos demonstraram alta concordância em massa óssea nos pares de monozigóticos, comparados aos dizigóticos, delineando influência genética relevante no metabolismo ósseo (SMITH *et al.*, 1973; POCOCK *et al.*, 1987; CHRISTIAN *et al.*, 1989; SLEMENDA *et al.*, 1991; KELLY *et al.*, 1993; FLICKER *et al.*, 1995; ARDEN & SPECTOR, 1997; HARRIS *et al.*, 1998; HOPPER *et al.*, 1998; ARDEN *et al.*, 1996).

A DMO tem alta determinação genética e é herdada como um traço poligênico em uma frequência aproximada de 50-90% (SMITH *et al.*, 1973; DEQUEKER *et al.*, 1987; POCOCK *et al.*, 1987; LUTZ & TESAR, 1990; SLEMENDA *et al.*, 1991; SOWERS *et al.*, 1992; KRALL & DAWSON-HUGHES, 1993; GUEGUEN *et al.*, 1995; DENG *et al.*, 1999b; DENG *et al.*, 2000; LIVSHITS *et al.*, 2001; DENG *et al.*, 2002a; PEACOCK *et al.*, 2002; RALSTON *et al.*, 2002; RECKER & DENG, 2002; SHEN *et al.*, 2004). Nesse contexto, estudos genético-moleculares têm sido lançados para a pesquisa de candidatos envolvidos na variação da DMO (MORRISON *et al.*, 1994; JOHNSON *et al.*, 1997; DENG *et al.*, 1998; KLEIN *et al.*, 1998; AUDÍ *et al.*, 1999; BEAMER *et al.*, 1999; DENG *et al.*, 1999a; DUNCAN *et al.*, 1999; BENES *et al.*, 2000; KOLLER *et al.*, 2000; DENG *et al.*, 2001; SHMOOKLER *et al.*, 2001).

Estudos de rastreamento do genoma (WGS) têm sido desenvolvidos para procurar por locos de traços quantitativos (QLT) subordinados à variação da DMO (DEVOTO *et al.*, 1998; NIU *et al.*, 1999; KOLLER *et al.*, 2000; DENG *et al.*, 2002b; KARASIK *et al.*, 2002; KAMMERER *et al.*, 2003; STYRKARSDOTTIR *et al.*, 2003; WILSON *et al.*, 2003; ECONS *et al.*, 2004). As regiões genômicas reveladas apresentam uma grande variabilidade, o que reflete a complexidade da herança genética da DMO (LIU *et al.*, 2003). No entanto, a densidade óssea não é o único fator envolvido no processo de fragilidade esquelética, pois também influenciam, nesse caso, propriedades micro-arquitetônicas, tamanho total e geometria do osso, embora esses aspectos também envolvam influências genéticas (ZMUDA *et al.*, 1999). A variação genética em uma variedade de vias metabólicas contribui para a perda óssea e origem da osteoporose (NIU & XU, 2001; PEACOCK *et al.*, 2002; RALSTON *et al.*, 2002).

A fragilidade esquelética é amplamente determinada pela massa óssea e micro-estrutura do osso. O pico de massa óssea é o maior fator na quantificação de risco à fratura.

Variações alélicas no gene receptor da vitamina D (VDR) têm sido relatadas como responsáveis pela alteração da homeostase de cálcio, com efeitos subsequentes sobre o tamanho e a densidade óssea (WOOD & FLEET 1988; RALSTON, 1997; FERRARI *et al.*, 1998; SOSA - HENRIQUEZ *et al.*, 1998).

A vitamina D tem efeitos diretos sobre o esqueleto, e seus metabólitos ativos regulam a diferenciação, proliferação e migração de osteoblastos e dos condrócitos da placa de crescimento epifiseal, células que determinam o crescimento esquelético (CORVOL *et al.*, 1978; SCHWARTZ *et al.*, 1989; BOUILLON *et al.*, 1995). Provavelmente, de grande importância, a vitamina D afeta o metabolismo esquelético indiretamente via regulação da homeostase do cálcio e fosfato através do estímulo da absorção intestinal desses íons (BOUILLON *et al.*, 1995; HAUSSLER *et al.*, 1998). A deficiência de vitamina D causa falhas no crescimento, tais como aquelas em indivíduos raquíticos (RASMUSSEN & ANAST, 1983; BOUILLON *et al.*, 1995). Os polimorfismos do gene VDR têm sido associados com parâmetros de tamanho corporal em crianças, dos gêneros masculino e feminino (KEEN *et al.*, 1997; SUAREZ *et al.*, 1997).

O VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares de proteínas que contém aminoácidos homólogos dentro de dois domínios funcionais separados (EVANS, 1988; HAUSSLER *et al.*, 1988; BEATO, 1989; HAUSSLER *et al.*, 1995). A região N-terminal do VDR é configurada em forma de dois “*zinc-fingers*”, responsáveis pelo reconhecimento e ligação ao DNA, enquanto o segmento C-terminal liga-se a 1,25-(OH)₂D₃ (HAUSSLER *et al.*, 1995). Essa estrutura modular comum reflete as ações moleculares similares empregadas pelos membros da superfamília de receptores nucleares em traduzir um sinal hormonal em uma resposta transcricional. Uma vez ligado a 1,25-(OH)₂D₃, o VDR regula a transcrição específica para o gene, por meio da ligação heterodímero com o receptor X retinóico (RXR) a uma seqüência de DNA chamada elemento responsivo à vitamina D (VDRE), presente na

região promotora dos genes controlados pela vitamina D (LIAO *et al.*, 1990; NODA *et al.*, 1990; OZONO *et al.*, 1990; MACDONALD *et al.*, 1991; TERPENING *et al.*, 1991; ROSS *et al.*, 1992). De fato, tem sido relatada a interação do VDR diretamente, com os componentes da maquinaria basal de transcrição (BLANCO *et al.*, 1995; MACDONALD *et al.*, 1995; GUO *et al.*, 1997; MASUYAMA *et al.*, 1997; MENGUS *et al.*, 1997; LAVIGNE *et al.*, 1999; NAKAJIMA *et al.*, 1998) (Figura 2).

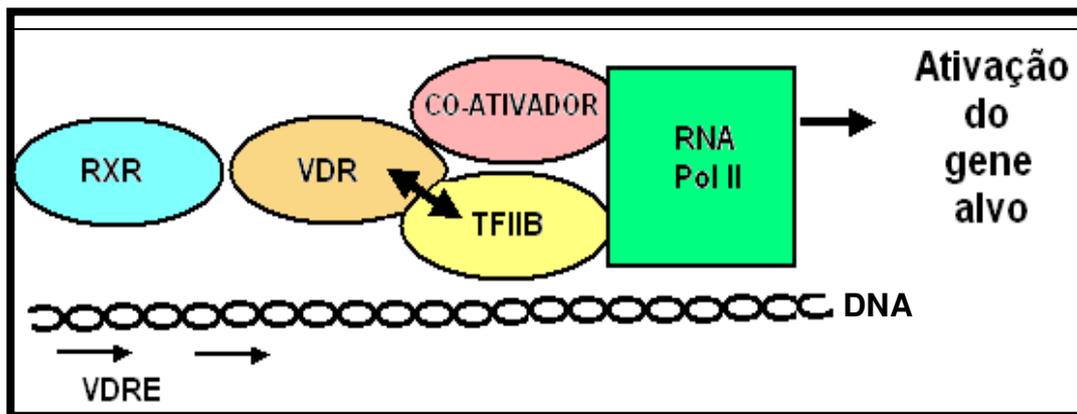


Figura 2. Atuação da vitamina D na ativação da transcrição de um gene alvo, por meio do complexo molecular múltiplo. (JURUTKA *et al.*, 2000)

O gene VDR possui vários polimorfismos, tanto na região codificadora, quanto na não codificadora do gene (HAUSSLER *et al.*, 1998; WOOD & FLEET, 1998). Entretanto, somente um desses polimorfismos resulta em uma mudança na seqüência primária do VDR. Esse polimorfismo ocorre dentro do primeiro códon de iniciação (ATG) do VDR humano e contém um sítio de restrição *Fok* I (designado f). A ausência do sítio *Fok* I (denominado F) indica que o primeiro códon é ACG, resultando na iniciação traducional *in-frame* no segundo códon ATG, três códons abaixo (GROSS *et al.*, 1996; ARAI *et al.*, 1997). Além disso, o polimorfismo *Fok* I produz ou uma proteína com 424 (F) ou com 427 aminoácidos (f). Essas duas isoformas são, portanto, estruturalmente distintas, diferentemente das VDRs que contém polimorfismos em regiões não codificadoras ou com mudanças silenciosas de códons (HAUSSLER *et al.*, 1998).

Por causa do papel central do VDR na homeostase de cálcio e fosfato para assegurar a deposição mineral óssea, o polimorfismo *Fok I* tem sido estudado no contexto de sua influência na densidade mineral óssea. Sabe-se que indivíduos portadores de genótipos desfavoráveis apresentam maior prevalência e incidência de fraturas e perda de massa óssea (BALTZER *et al.*, 1999; GENNARI *et al.*, 1999; GOMEZ *et al.*, 1999). No entanto, existem resultados contraditórios, como os de Zmuda *et al.* (1999) que não encontraram associação entre a presença de polimorfismo *FokI* e influência no risco de osteoporose em mulheres afro-americanas. Esses dados, contudo reforçam a tese de que por ser o fator genético preponderante nessa doença, é necessário considerar as diferenças raciais e, além disso, a interação desse gene com outros envolvidos no processo.

Um outro gene que se destaca como candidato no processo da osteoporose é o da apolipoproteína E (apo E). A apoE é o principal constituinte protéico das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e possui papel importante no metabolismo das lipoproteínas (DAVIGNON *et al.*, 1998) e no transporte de lipídios nos tecidos (CORBO & SCACCHI, 1999). Está presente também nos quilomícrons e em seus remanescentes, assim como nas lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) (MAHLEY, 1988). A apo E, codificada por um gene no cromossomo 19 humano, media a absorção das lipoproteínas nos tecidos, tais como o fígado e osso (ZANNIS *et al.*, 1993). As três isoformas da apo E, codificadas pelos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, diferem em sua habilidade para facilitar a remoção de lipoproteínas intestinais, ricas em vitamina K, da circulação na ordem $E2 < E3 < E4$ (WEINTRAUB *et al.*, 1987). Os polimorfismos da apo E são associados a várias doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer (ST AMAND *et al.*, 1999). Recentemente, o gene *APOE* foi introduzido como candidato para osteoporose, devido sua influência nos osteoblastos e menor absorção intestinal de vitamina K, que é essencial para a carboxilação das proteínas ósseas contendo resíduos glutamílicos, resultando em altos níveis de osteocalcina

descarboxilada em indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ de apo E (KOHLMEIER *et al.*, 1996; NEWMAN *et al.*, 2002). Cauley *et al.* (1999) relataram que mulheres com pelo menos um alelo $\epsilon 4$ do gene, possuem risco aumentado de fraturas nos quadris e pulso, resultados esses confirmados por outros autores (SZULC *et al.*, 1993; 1994).

Vários estudos têm mostrado associações entre os genótipos para apo E e DMO (SHIRAKI *et al.*, 1997b; CAULEY *et al.*, 1999; PLUIJM *et al.*, 2002; ZAJICKOVA *et al.*, 2003), remodelação óssea (SHIRAKI *et al.*, 1997a), e risco de fratura (KOHLMEIER *et al.*, 1998; CAULEY *et al.*, 1999), enquanto outros têm falhado em confirmar tais associações (BOOTH *et al.*, 2000; HEIKKINEN *et al.*, 2000; MUHLEN *et al.*, 2001; SENNELS *et al.*, 2003). Long *et al.* (2004) estudaram quatro polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene APOE usando testes quantitativos de desequilíbrio de ligação (QTD) em núcleos familiares caucasóides e observaram associação de haplótipos do gene APOE com valores de DMO em homens, mas não em mulheres.

Pluijm *et al.* (2002) confirmaram a importância de apo E4 como possível fator genético de risco relacionado à DMO e deformidades vertebrais, demonstrando que esses efeitos estão associados ao sexo e com a idade nos homens, o que pode explicar parcialmente, as diferenças entre homens e mulheres no desenvolvimento da osteoporose. No entanto, ainda é controversa a relação do alelo Apo E4 como fator de risco para a osteoporose. Há relatos de valores reduzidos de DMO na coluna lombar em indivíduos idosos portadores do alelo $\epsilon 4$ (SHIRAKI *et al.*, 1997a; CAULEY *et al.*, 1999; SALAMONE *et al.*, 2000). Além disso, apresentam também níveis mais altos de osteocalcina descarboxilada (SHIRAKI *et al.*, 1997a), e risco aumentado de fraturas, em duas a quatro vezes (KOHLMEIER *et al.*, 1998; CAULEY *et al.*, 1999; JOHNSTON *et al.*, 1999), comparado à ausência de $\epsilon 4$. Por outro lado, outros estudos não confirmaram estas diferenças na osteoporose relacionadas aos genótipos da

apo E (BOOTH *et al.*, 2000; HEIKKINEN *et al.*, 2000; VON MÜHLEN *et al.*, 2001; ZAJICKOVA *et al.*, 2003).

A identificação de outros fatores genéticos de risco pode ser útil para a predição de fraturas e elucidação dos mecanismos biológicos relacionados à osteoporose (PLUIJM *et al.*, 2002). Destacam-se, nesse caso, os genes para as Glutatião-S-transferases M1 (GSTM1) e T1 (GSTT1), envolvidos na Fase II do metabolismo de agentes xenobióticos.

Dois tipos de reações principais, as reações de Fase I e de Fase II, estão envolvidos na metabolização dos agentes ambientais. Na Fase I, ocorre a ativação desses compostos tornando-os mais reativos, enquanto na fase II, ao contrário da primeira, ocorre a conjugação enzimática dos compostos químicos, originando derivados metabólicos inativos. Participam ativamente dessas reações, a família de isoenzimas das glutatião – S – transferases (GST), que também apresenta caráter polimórfico (CONFORTI – FROES *et al.*, 1997). Dentre os agentes detoxificados pela GST encontram-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, presentes na dieta alimentar e fumaça do cigarro. Desse modo, a presença de genótipos desfavoráveis em um indivíduo, torna-o menos capaz de inativar metabólicos reativos. Assim sendo, é fundamental intensificar as pesquisas para a precisa identificação de marcadores genéticos de suscetibilidade a doenças, a interação entre esses marcadores, sua relação com o ambiente, fornecendo conseqüentemente, subsídios nos campos da saúde pública e medicina preventiva.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Foram objetivos deste estudo:

1. identificar a frequência dos polimorfismos nos genes para a apolipoproteína E (apo E), receptor da vitamina D (*VDR*) e gene codificador das glutatíon S-transferases M1 e T1 (*GSTM1* e *GSTT1*) em pacientes com osteoporose e ou osteopenia em comparação com indivíduos sem a doença;
 2. associar os polimorfismos descritos acima com os achados obtidos pela densitometria óssea e hábito de fumar;
 3. correlacionar os genótipos com a suscetibilidade à ocorrência de osteoporose.
-

MATERIAL E MÉTODOS

II. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Casuística

Foram estudados 53 pacientes, não relacionados e triados independente do gênero, de clínicas de ortopedia da cidade de São José do Rio Preto, SP. De raça miscigenada, os pacientes tinham idade variando entre 35 e 79 anos (valor médio = 58 anos), apresentando diagnóstico clínico positivo de osteopenia ou osteoporose, revelado por meio de densitometria óssea. Foram excluídos os indivíduos sob terapia com esteróides por mais de seis meses ou aqueles submetidos à quimio ou radioterapia para tratamento de câncer (atual ou passado). Os pacientes foram pareados, por gênero e faixa etária (+/- 5 anos) com indivíduos controles, clinicamente sem diagnóstico da doença, triados nas mesmas clínicas que os pacientes, bem como na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo, após o que consentiram em participar, assinando o Termo de Consentimento (Apêndice1).

III.2 Método

Os participantes responderam a um questionário detalhado sobre suas atividades físicas e ocupacionais, tipo de alimentação, hábitos de vida e antecedentes pessoais (Apêndice 2).

Os indivíduos foram estudados, considerando-se as frequências alélicas e genotípicas para os genes APOE, VDR- *FokI*, GSTM1 e GSTT1. Foi realizada uma coleta de sangue por punção venosa para o estudo dos polimorfismos genéticos referidos.

III.2.1. Avaliação dos pacientes

A avaliação dos pacientes foi realizada por médicos especialistas em ortopedia e reumatologia. A análise consistiu de anamnese, história familiar para osteoporose e fraturas,

exames físico e de imagem de densitometria óssea. Da densitometria foram extraídas informações de densidade mineral óssea (DMO) para vários pontos do esqueleto (coluna, fêmur e triângulo de Ward). Os dados de DMO foram obtidos em termos de desvio padrão (DP) em relação a um adulto jovem saudável, segundo as normas estabelecidas pela Sociedade Internacional de Densitometria Clínica em 2001, de acordo com os seguintes critérios.

- 0 à -1 DP = Normal
- -1 à -2,5 DP = Osteopenia
- Abaixo de -2,5 DP = Osteoporose

III.2.2. Genotipagem

III.2.2.1. Extração de DNA

De cada indivíduo foram puncionados 5mL de sangue periférico, usando-se EDTA como anticoagulante. O DNA foi obtido pela técnica de extração descrita por Gustincich *et al.* (1991). As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500rpm por dez minutos, seguida da aspiração de cerca de 0,5 mL da camada de leucócitos e adição de 0,5mL de DTAB (brometo de dodeciltrimetilamônio) a 12%, sendo este responsável pela lise das células sanguíneas. Após cinco minutos de incubação a 70°C, foram adicionados 900 µL de clorofórmio (desnaturante protéico) aos leucócitos e após a centrifugação houve formação de três camadas: a fase orgânica inferior, uma intermediária contendo as proteínas desnaturadas e uma fase aquosa superior contendo o DNA genômico.

A última etapa desse processo incluiu lavagem do DNA com 100µL de CTAB a 5% (brometo de cetiltrimetilamônio), responsável pela precipitação do DNA. O material foi dissolvido em 300µL de NaCl 1,2M e 750µL de etanol 90%. Após a centrifugação e

eliminação do sobrenadante, o DNA foi lavado com 750 µL de etanol 70% sendo este descartado para a secagem do DNA em temperatura ambiente, seguido de sua hidratação com 200 µL de água deionizada autoclavada. O material foi armazenado em freezer - 20°C até sua utilização.

III.2.2.2 Polimorfismo apo E - *HhaI*

O segmento do gene *APOE* estudado foi amplificado por PCR em termociclador (Eppendorf®), sendo usado em cada tubo de reação 0,5 µL de cada desoxinucleotídeo (0,8mM); 2,5 µL de tampão PCR 10 X; 2,5 µL de dimetil sulfóxido 10 %; 2,5 µ L de cada *primer* (2,5 µM); 0,2 µ L de *Taq polimerase* (5U/µL); 7 µL de água ultra-pura (Milli Q®); 5 µL de DNA genômico.

Para os polimorfismos de apo E foram utilizados *primers* complementares às regiões próximas aos códons polimórficos 112 e 158, localizados no exon 4 do gene para apo E. P1: 5'-ACA GAA TTC GCC CGG CCT GGT ACA C-3'; P2: 5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGC A-3' (HIXSON & VERNIER, 1990). A desnaturação inicial do DNA foi obtida a 94°C por 5 minutos e a mistura de reação submetida em seguida a 40 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação e 65°C por 2 minutos para o anelamento dos *primers*, com ciclo final a 72°C, por 7 minutos para a extensão das cadeias (HIXSON & VERNIER, 1990, com modificação).

O produto de amplificação da PCR foi submetido à enzima de restrição *Hha I* (5 U por 25µL de reação) em banho-maria à 37°C, durante 8 horas, para clivagem das seqüências amplificadas dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ em regiões específicas (GCG↑C).

Os alelos distinguem-se entre si pelo conteúdo de cisteína e arginina nas posições 112 e 158 do éxon 4. A isoforma mais comum, a apo E3 exibe uma cisteína e uma arginina nas posições 112 e 158, respectivamente. A apo E4 e a apo E2 têm respectivamente, arginina e

cisteína em ambas as posições (ZANNIS *et al.*, 1981; UTERMAN *et al.*, 1982; DAVIGNON *et al.*, 1988; GOEDERT *et al.*, 1991; FAZEKAS *et al.*, 2006).

Foram obtidos após restrição com a enzima *Hha* I, fragmentos com 91 e 83 pares de bases (ϵ 2), 91 e 48 pares de base (ϵ 3) e 72 e 48 pares de base (ϵ 4) que foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não desnaturado, sob corrente constante de 180 Volts, por 50 minutos. Como controle foi utilizada uma amostra de DNA padrão (100pb Invitrogen[®]). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,2 mg/L) por 10 minutos e os fragmentos de DNA visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados por câmera Polaroid (filme Polaroid[®] 667). (Figuras 3 e 4)

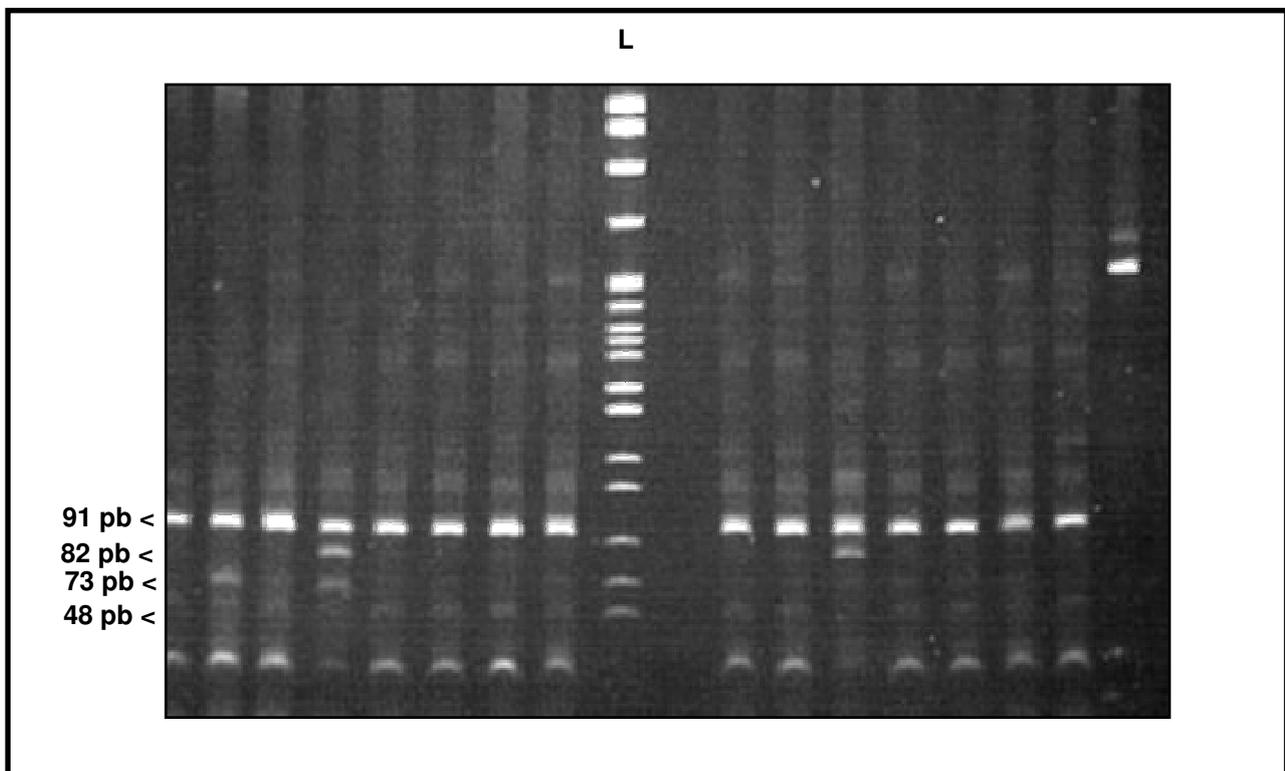


Figura 3. Perfil de bandas eletroforéticas em gel de poliacrilamida 6 % com amostras de DNA submetidas à análise de polimorfismo de fragmento de restrição do gene para a apolipoproteína E por restrição enzimática com *Hha*I. A letra L designa uma amostra de DNA padrão (pBR 322). pb = pares de bases

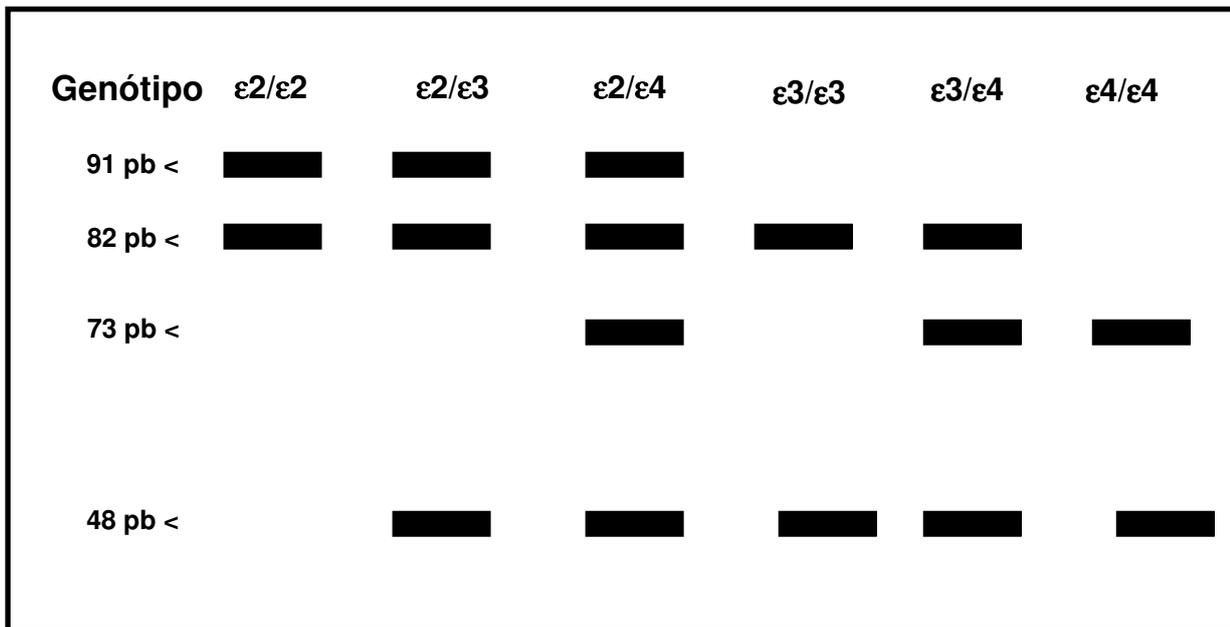


Figura 4. Esquema mostrando a disposição dos fragmentos representados por pares de bases (pb) para cada genótipo da apolipoproteína E, sob ação da restrição enzimática com *Hha* I.

III.2.2.3 Polimorfismo do VDR-*Fok* I

A amplificação do seguimento polimórfico do gene VDR-*Fok* I ocorreu por PCR. A detecção do polimorfismo *Fok* I seguiu o protocolo descrito por Harris *et al.* (1997). Os primers: 5'-AGCTGGCCC TGGCACTGACTCTGCTCT-3' e 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' foram diluídos em 1,5 mM de cloreto de magnésio, 60 mM de Tris HCl, pH 9,0, 15 mM NH₄SO₄ 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), dNTPs (200[um]M cada), 0,25μL de *Taq* polimerase e DNA genômico a concentração de 200ng/50μL. As condições de amplificação em termociclador (Eppendorf®) foram as seguintes: 94°C por 30 segundos para desnaturação do DNA, temperatura para anelamento dos primers de 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos durante 35 ciclos de extensão. Os produtos gerados foram digeridos pela enzima *Fok* I a 37°C por 3 horas e então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo tampão Tris-EDTA e brometo de etídeo (10mg/mL). As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz ultravioleta e as imagens registradas por câmera fotográfica Polaroid (filme Polaroid® 667).

O genótipo homocigoto denominado de FF, não contém o sítio de restrição para a enzima *FokI*, resultando, assim, em um fragmento completo de 265 pb. A presença do sítio de restrição desta enzima resulta em um fragmento de 196 pb e outro de 69 pb. Nessas condições, classifica-se o genótipo homocigoto ff, sendo que o genótipo heterocigoto Ff contém três bandas: uma de 265 pb, outra de 196pb e a última com 69 pb (Figuras 5 e 6).

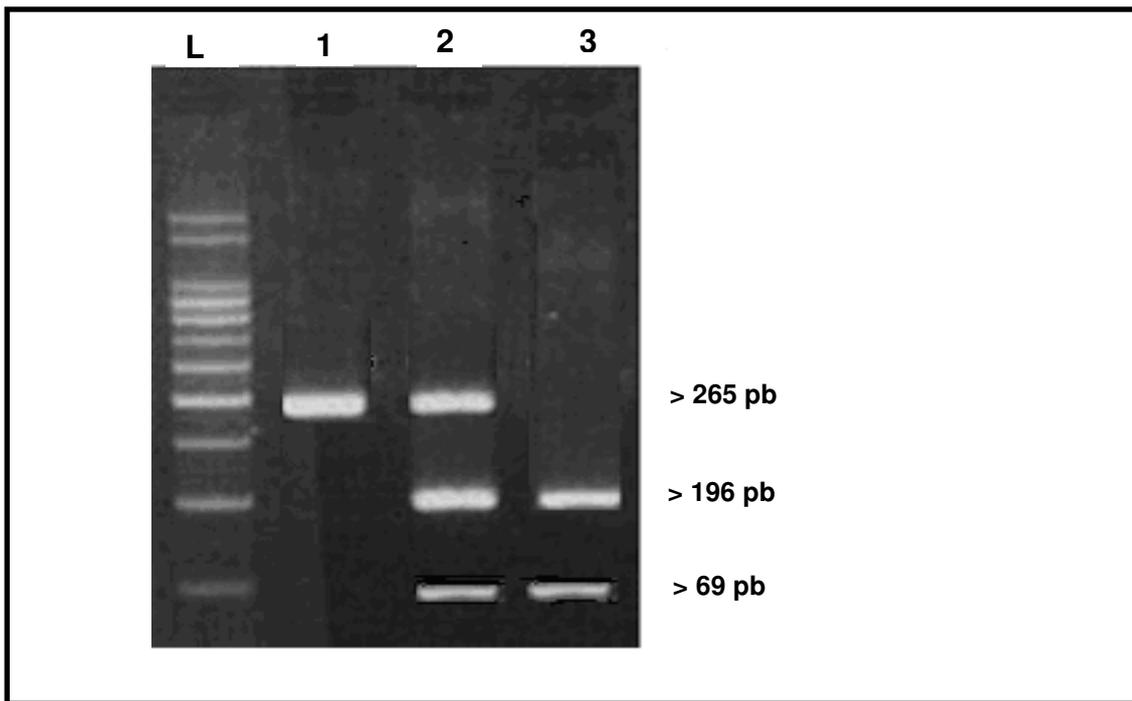


Figura 5. Perfil de bandas eletroforéticas em gel de agarose 2 % com amostras de DNA submetidas à análise de polimorfismo de fragmento de restrição do gene receptor da vitamina D, por restrição enzimática com *FokI*. A coluna de número 1 corresponde ao genótipo FF; número 2 ao genótipo Ff e número 3 ao genótipo ff. A letra L designa o marcador de tamanho molecular (100pb Ladder, Fermentas®).

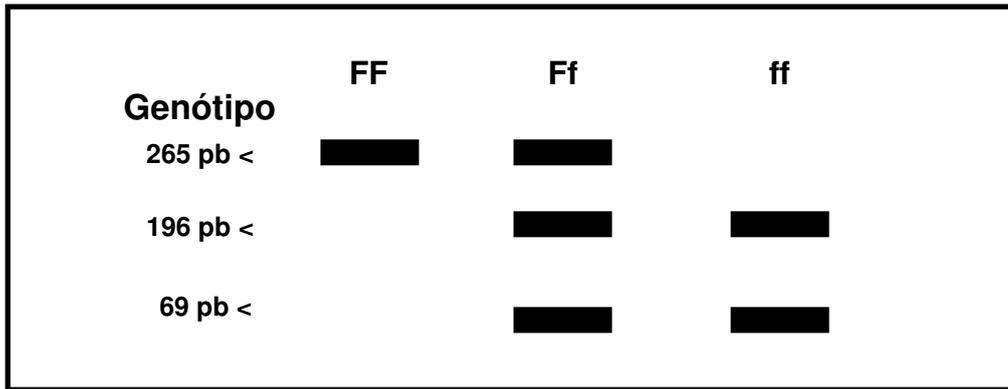


Figura 6. Esquema mostrando a disposição dos fragmentos representados por pares de bases (pb) para cada genótipo VDR, sob ação da restrição enzimática com *Fok I*.

III.2.2.4 Polimorfismos de GSTT1 e GSTM1

Os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* foram detectados pela amplificação gênica por PCR Multiplex descrita por Abdel-Rahman *et al.* (1996). No procedimento da PCR utilizaram-se 30 pmol de cada um dos *primers* para o genes *GSTM1* (5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC; 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG), *GSTT1* (5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC; 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA) e *CYP1A1* (5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT; 5'-CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC), este último usado como um controle interno de amplificação. O *mix* de reação foi feito utilizando 1,5 mM de cloreto de magnésio, 60 mM de Tris HCl, pH 9,0, 15 mM NH₄SO₄, dNTPs (200[um]M cada), 0,25µL de *Taq polimerase* e DNA genômico na concentração de 200ng/50µL. O material foi processado em termociclador automático (Eppendorf[®]), sendo inicialmente submetido a uma temperatura de 94°C por 4 minutos para pré-denaturação do DNA e, em seguida, por 40 ciclos com parâmetros de denaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 59°C por 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 1 minuto. A extensão final deu-se a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). A presença ou ausência dos genes foi visualizada com a utilização de um transiluminador e fotografada para posterior análise. Os produtos da reação foram observados como fragmentos de 480 pb para a presença do gene *GSTT1*, 215 pb para a presença do gene *GSTM1* e 312 pb para o gene *CYP1A1*. Na ausência de *GSTT1* e *GSTM1*, genótipo nulo (0/0) visualizou-se somente a banda intermediária correspondente ao gene *CYP1A1* (presente obrigatoriamente em todos os indivíduos, já que a mutação deste gene seria deletéria) (Figuras 7 e 8).

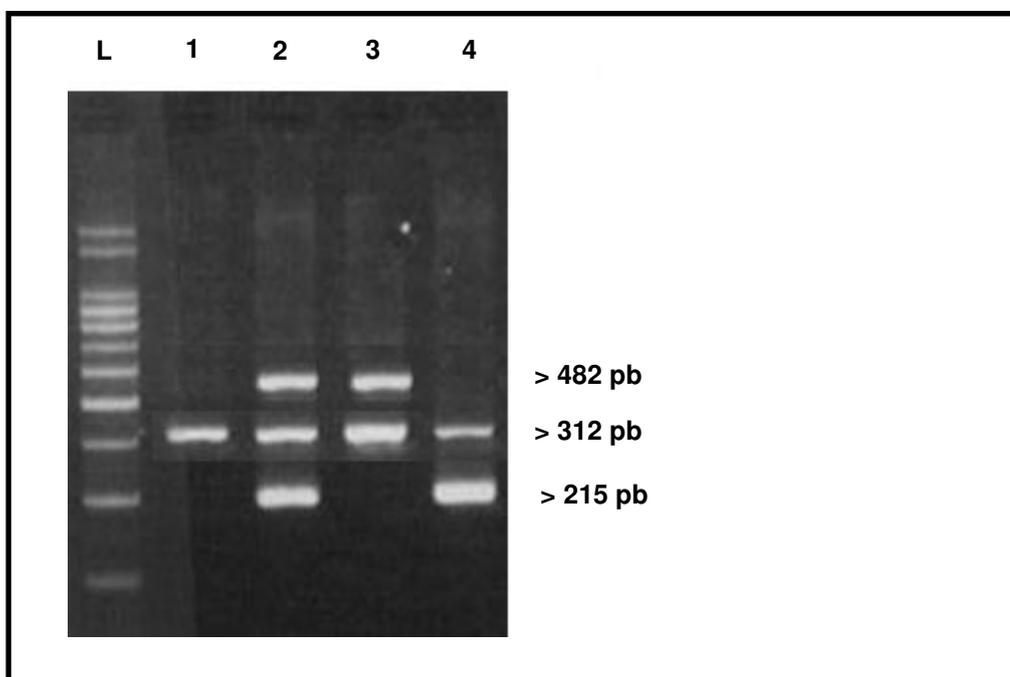


Figura 7. Perfil de bandas eletroforéticas em gel de agarose 2 % com amostras de DNA submetidas à análise dos polimorfismos genéticos *GSTT1* e *GSTM1*. A coluna de número 1 corresponde aos genótipos nulos de *GSTT1/M1* (0/0); número 2 aos genótipos presentes (+/+); número 3 ao genótipo *GSTT1* presente (+/0); e o número 4 ao genótipo *GSTM1* presente (0/+). A letra L designa o marcador de tamanho molecular (100pb Ladder, Fermentas[®]).

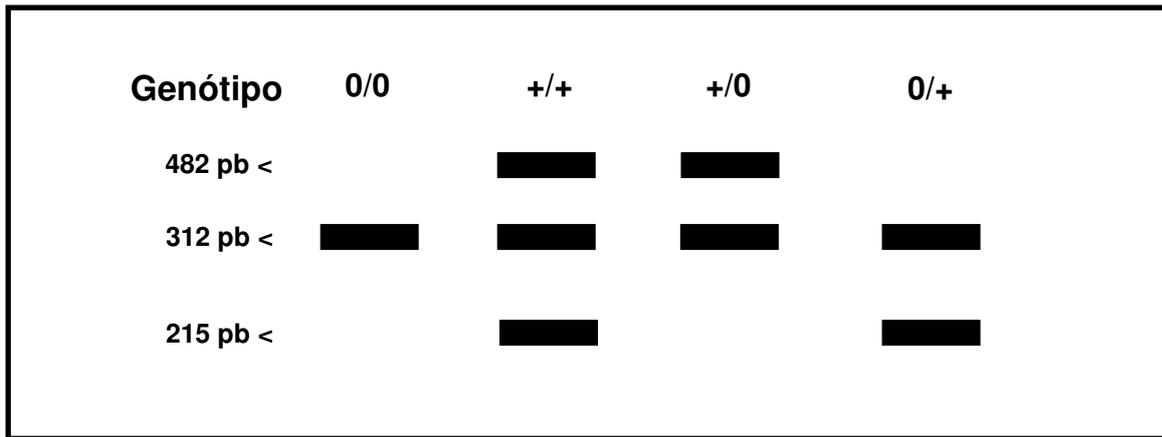


Figura 8. Esquema mostrando a disposição dos fragmentos representados por pares de bases (pb) para cada genótipo GSTT1/GSTM1 (0 = deleção do gene; + = presença do gene).

III.2.3 Análise estatística

Para o estudo de variáveis com distribuição não-gaussiana foram utilizados os valores de mediana, mínimo e máximo e teste de Mann-Whitney. Já para as variáveis com distribuição gaussiana foram utilizados os valores de média e desvio-padrão e teste t. Para as variáveis discretas aplicou-se o teste exato de Fisher. Para estimar a influência dos polimorfismos e antecedentes pessoais estudados na osteoporose foi utilizado o teste de regressão multivariada. Para analisar o tipo de segregação dos alelos estudados utilizou-se o teste de Hardy-Weinberg. Admitiu-se erro α de 5% com nível de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1 Frequências Alélicas e Genóticas para apoE-*HhaI*, *VDR-FokI*, *GSTT1* e *GSTM1*

A Tabela 1 apresenta a distribuição das frequências alélicas e genóticas para o gene *APOE* em pacientes com osteoporose e seus respectivos controles. A frequência do alelo $\epsilon 3$ foi significativamente maior nos controles (0,85; $P=0,0431$), enquanto o alelo $\epsilon 4$ foi nos pacientes (0,20; $P=0,0075$). O genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ destacou-se no grupo de pacientes (32,1%), em relação aos controles (13,2%; $P=0,0493$).

Referente ao gene *VDR*, observa-se que pacientes e controles não diferiram quanto às frequências alélicas ($P=0,1917$), de acordo com a Tabela 2, que contém as frequências alélicas e genóticas para esse gene. O mesmo ocorreu para os genótipos FF e Ff ($P=1,1546$; $P=0,0755$, respectivamente), ao contrário do genótipo ff, cuja frequência mostrou-se significativamente maior nos pacientes (22,6%; $P=0,0078$).

A Tabela 3 apresenta as frequências genóticas para os genes *GSTT1* e *GSTM1*. Pode-se denotar que pacientes e controles não diferiram quanto à presença (+/+) e ausência (0/0) do gene *GSTT1* ($P=0,5328$). Por outro lado, para o gene *GSTM1*, o genótipo nulo (0/0) mostrou-se significativamente mais frequente nos pacientes (64,1%) comparados aos controles (37,7%; $P=0,0112$).

Tabela 1: Frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo apo E-*HhaI* em pacientes com osteoporose e controles.

Apo E	Paciente		Controle		P*
	n	Frequência	n	Frequência	
Alelo					
ε2	8	0,07	9	0,08	1,0000
ε3	77	0,73	90	0,85	0,0431
ε4	21	0,20	7	0,07	0,0075
Total		1,00		1,00	
Genótipo	N	%	N	%	
ε2/ ε2	1	1,9	1	1,9	1,5024
ε2/ ε3	4	7,5	7	13,2	0,5378
ε2/ ε4	2	3,8	0	0	0,4976
ε3/ ε3	28	52,8	38	71,7	0,1817
ε3/ ε4	17	32,1	7	13,2	0,0493
ε4/ ε4	1	1,9	0	0	1,0000
Total	53	100	53	100	

*Teste exato de Fisher; n = número de alelos; N= número de indivíduos; apo E= apolipoproteína E.

Tabela 2: Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo VDR-*FokI* em pacientes com osteoporose e controles.

VDR- <i>FokI</i>	Paciente		Controle		P*
	n	%	n	%	
Alelo					
F	65	0,61	75	0,71	
f	41	0,39	31	0,29	0,1917
Total		1,00		1,00	
Genótipo					
	N	%	N	%	
FF	24	45,3	24	45,3	1,1546
Ff	17	32,1	27	50,9	0,0755
ff	12	22,6	2	3,8	0,0078
Total	53	100	53	100	

*Teste exato de Fisher; n = número de alelos; N= número de indivíduos; VDR= receptor da vitamina D.

Tabela 3: Frequências genótípicas para os polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com osteoporose e controles.

Genótipo	Paciente		Controle		P*
	N	%	N	%	
GSTT1					
+/+	38	71,7	34	64,1	
0/0	15	28,3	19	35,9	
Total	53	100	53	100	0,5328
GSTM1					
+/+	19	35,9	33	62,3	
0/0	34	64,1	20	37,7	
Total	53	100	53	100	0,0112

*Teste exato de Fisher; N = número de indivíduos; +/+ = presença do gene; 0/0 = ausência do gene.

IV.2 Antecedentes Pessoais

O hábito de fumar esteve em destaque entre os pacientes (43,4%; $P < 0,0001$), comparados com o grupo controle. Os pacientes que eram fumantes apresentaram o valor médio para DMO significativamente diminuído (-3,11), em comparação às medidas para os pacientes não fumantes (-2,11; $P < 0,0001$) (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição da frequência do hábito de fumar e densidade mineral óssea (DMO) de pacientes com osteoporose e controles.

DMO (g/cm ³)	Hábito de Fumar								P*
	Sim				Não				
	Paciente		Controle		Paciente		Controle		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
	23	43,4	3	5,7	30	56,6	50	94,3	<0,0001
Média	-3,11		—		-2,11		—		<0,0001
DP	0,7018				0,5886				

*Teste exato de Fisher; N = número de indivíduos; DP = desvio padrão; DMO = densidade mineral óssea em g/cm³, (-) = sem registro.

IV.3 Associação entre Antecedentes Pessoais e Polimorfismos apoE-*HhaI*, VDR-*FokI*, *GSTT1* e *GSTM1*

A Tabela 5 mostra a relação entre os polimorfismos apoE-*HhaI*, VDR-*FokI*, *GSTT1* e *GSTM1* com o hábito de fumar e DMO em pacientes e controles. As frequências genóticas de apoE-*HhaI*, VDR-*FokI*, *GSTT1* e *GSTM1*, analisadas em conjunto com o hábito de fumar, não apresentaram diferenças significantes entre pacientes e controles.

Em relação à densidade mineral óssea (DMO), verificou-se valor para DMO significativamente diminuído em pacientes com o genótipo $\epsilon 4$ (-2,835) comparado àqueles portadores de genótipos sem $\epsilon 4$ (-2,200; P=0,0028).

Tabela 5: Polimorfismos apoE-*HhaI*, VDR-*FokI*, GSTT1 e GSTM1 e antecedentes pessoais em pacientes com osteoporose e controles e sua relação com DMO nos pacientes.

Grupos	Hábito de fumar				P*	DMO (g/cm ³)		P*
	Sim		Não			Média	DP	
	N	%	N	%		Mediana	Mínimo/ Máximo	
Paciente								
apoE- <i>HhaI</i>								
-/ ε4	12	22,6	08	15,1		-2,835	-4,58/-1,74	
Sem ε4	11	20,8	22	41,5	0,087	-2,200	-4,50/-1,14	0,0028
VDR- <i>FokI</i>								
FF	11	20,8	14	26,4		-2,252	1,351	
-/f	12	22,6	16	30,2	1,000	-2,598	0,760	0,2466
GSTT1								
++	15	28,3	23	43,4		-2,527	0,795	
00	08	15,1	07	13,2	0,378	-2,495	1,059	0,8880
GSTM1								
++	09	17,0	10	18,9		-2,516	0,534	
00	14	26,4	20	37,7	0,775	-2,552	0,933	0,8797
Controle								
apo E- <i>HhaI</i>								
-/ ε4	01	1,9	06	11,3				
Sem ε4	02	3,8	44	83,0	0,352			
VDR- <i>FokI</i>								
FF	03	5,7	21	39,6				
-/f	-	-	29	54,7	0,086			
GSTT1								
++	03	5,7	31	58,5				
00	-	-	19	35,8	0,545			
GSTM1								
++	02	3,8	31	58,5				
00	01	1,9	19	35,8	1,000			

*Teste exato de Fisher; N = número de indivíduos; DP = desvio padrão; ++ = presença do gene; 0/0 = ausência do gene; -/ ε4 = presença de pelo menos um alelo ε4, -/f = presença de pelo menos um alelo f; DMO = densidade mineral óssea em g/cm³; apo E= apolipoproteína E.

IV.4 Associação entre os Polimorfismos apoE-*Hha*I, VDR-*Fok*I, *GSTT1* e *GSTM1*

A Tabela 6 apresenta a relação entre os genótipos da apoE (sem $\epsilon 4$, com pelo menos um alelo $\epsilon 4$), VDR-*Fok*I (FF, com pelo menos em alelo f), *GSTT1* e *GSTM1* (ausência dos dois genes; presença de pelo menos, um dos genes). Os genótipos com pelo menos, um alelo f (-/f) para VDR-*Fok*I associaram-se com frequência significativamente mais elevada com o genótipo apresentando pelo menos, um alelo $\epsilon 4$ (-/ $\epsilon 4$) (24,5%) em pacientes, quando comparados aos controles (5,7%; P=0,0127). A combinação do genótipo com a presença de pelo menos, um gene *GSTT1* ou *GSTM1*, com os genótipos com pelo menos um alelo f (-/f) e um alelo $\epsilon 4$ (-/ $\epsilon 4$) apresentou frequência significativamente aumentada em pacientes (22,6%) comparada aos controles (3,8%; P=0,008).

Tabela 6: Associação dos polimorfismos apoE-*HhaI*, VDR-*FokI*, *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com osteoporose e controles.

Combinções Genotípicas	Paciente		Controle		P*
	N= 53	%	N= 53	%	
T1*0 e M1*0 ; FF	4	7,5	1	1,9	0,363
T1*0 e M1*0 ; -/f	4	7,5	5	9,4	1,000
T1+ e/ou M1+ ; FF	20	37,7	23	43,4	0,693
T1+ e/ou M1+ ; -/f	25	47,3	24	45,3	1,000
FF ; -/ ε4	4	7,5	4	7,5	1,284
FF ; Sem ε4	20	37,7	20	37,7	1,159
-/f ; -/ ε4	13	24,5	3	5,7	0,013
-/f ; Sem ε4	16	30,3	26	49,1	0,073
T1*0 e M1*0 ; -/ ε4	3	5,7	1	1,9	0,618
T1*0 e M1*0 ; Sem ε4	5	9,4	5	9,4	1,258
T1+ e/ou M1+ ; -/ ε4	14	26,4	6	11,3	0,081
T1+ e/ou M1+ ; Sem ε4	31	58,5	41	77,4	0,060
T1*0 e M1*0 ; FF ; -/ ε4	2	3,8	0	0,0	0,495
T1*0 e M1*0 ; FF ; Sem ε4	2	3,8	1	1,9	1,000
T1*0 e M1*0 ; -/f ; -/ ε4	1	1,9	1	1,9	1,505
T1*0 e M1*0 ; -/f ; Sem ε4	3	5,7	4	7,5	1,000
T1+ e/ou M1+ ; FF ; -/ ε4	2	3,8	4	7,5	0,678
T1+ e/ou M1+ ; FF ; Sem ε4	18	33,9	19	35,9	1,000
T1+ e/ou M1+ ; -/f ; -/ ε4	12	22,6	2	3,8	0,008
T1+ e/ou M1+ ; -/f ; Sem ε4	13	24,5	22	41,5	0,098

*Teste exato de Fisher; N = número de indivíduos; T1+ e/ou M1 = presença do gene *GSTT1* e/ou *GSTM1*; T1*0 e M1*0 = ausência dos genes *GSTT1* e *GSTM1*; -/ ε4 = presença de pelo menos um alelo ε4, -/f = presença de pelo menos um alelo f.

IV.5 Influência da idade, hábito de fumar e dos polimorfismos de apoE-HhaI, VDR-FokI, GSTT1 e GSTM1 na Osteoporose

Os cálculos de regressão múltipla ($OP = 0,25 + 0,0036 [idade] - 0,0585 [GSTT1nulo] + 0,2251 [GSTM1nulo] - 0,0149 [-/f] + 0,1624 [-/\epsilon 4] + 0,4381 [fumo]$), mostraram associação significativa ($P = 0,0001$) entre a osteoporose (OP), idade superior a 50 anos, hábito de fumar e os alelos $\epsilon 4$, f, M1 e T1 nulos. Houve maior contribuição do genótipo GSTM1 nulo ($P = 0,0115$) e do hábito de fumar ($P = 0,0001$), confirmado pelo teste do efeito de uma variável, excluindo-se os efeitos dos genótipos $-/f$ ($P = 0,8668$), GSTT1 nulo ($P = 0,5288$) e $-/\epsilon 4$ ($P = 0,1267$), e da idade ($P = 0,9705$).

IV.6 Segregação dos alelos apoE-HhaI, VDR-FokI, GSTT1 e GSTM1 na população estudada

Os cálculos de Hardy-Weinberg mostraram que os genótipos e alelos apoE-HhaI, GSTT1 e GSTM1 estão distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em pacientes e controles. Por outro lado, as frequências alélicas e genotípicas de VDR-FokI apresentaram um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo de pacientes ($0,01 < P < 0,02$), o que não foi observado nos controles.

Gene	Paciente			Controle		
	GL	X ²	P	GL	X ²	P
apo E-HhaI	3	3,40	0,30 < P < 0,50	3	2,21	0,50 < P < 0,70
VDR-FokI	1	5,53	0,01 < P < 0,02	1	2,86	0,05 < P < 0,10
GSTT1	0	0	1,0000	0	0	1,0000
GSTM1	0	0	1,0000	0	0	1,0000

*Teste de Hardy-Weinberg; GL=grau de liberdade; X²= Qui-Quadrado.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Devido ao aumento de longevidade, a osteoporose tem causado ônus ao sistema de cuidado à saúde, pelo extenso número de médicos e custo econômico de tratamento. Aproximadamente, um milhão e quinhentas mil fraturas são causadas pela osteoporose a cada ano nos Estados Unidos (NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2001). Os custos associados com fraturas osteoporóticas são consideráveis, especialmente para fraturas de quadril (RAY *et al.*, 1997; JOHNELL, 1997). Assim sendo, os resultados obtidos neste trabalho corroboram no melhor entendimento dessa doença, cuja prevenção parece ser o melhor caminho.

Nesse particular aspecto, é evidente a importância da participação genética para o desenvolvimento da osteoporose e de como esses novos conhecimentos podem auxiliar na detecção de grupos de risco. De abordagem inédita, este estudo examinou a relação dos polimorfismos dos genes da apolipoproteína E (APOE) e o receptor de vitamina D (VDR) e das glutatíon-S-transferases M1 e T1 (GSTM1e GSTT1) na densidade mineral óssea (DMO), em indivíduos normais e com osteoporose do sudeste do estado de São Paulo.

A análise da distribuição alélica e genotípica para o gene APOE revelou frequência significativamente maior do alelo $\epsilon 3$, nos controles (0,85; $P=0,0431$), e do alelo $\epsilon 4$ nos pacientes (0,20; $P=0,0075$). O genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ destacou-se nos pacientes (32,1%), com relação aos controles (13,2%; $P=0,0493$). Quando examinada a relação entre os genótipos APOE com a densidade mineral óssea em pacientes, verificou-se uma DMO significativamente diminuída em pacientes com o genótipo portadores de pelo menos, um alelo $\epsilon 4$ (-/ $\epsilon 4$) (-2,835 DP) comparado àqueles portadores de genótipos sem $\epsilon 4$ (-2,200 DP; $P=0,0028$). Estes resultados foram confirmados por estudos anteriores que demonstraram que pessoas idosas portadoras do alelo Apo E4, comparadas a pessoas sem Apo E4, têm

valores mais baixos de DMO da coluna lombar (SHIRAKI *et al.*, 1997a; CAULEY *et al.*, 1999; SALAMONE *et al.*, 2000).

Outros autores também demonstram associação entre esse genótipo com marcadores não pesquisados neste estudo, como por exemplo, o do padrão de osteocalcina descarboxilada, cujos níveis se mostraram elevados (SHIRAKI *et al.*, 1997b) e associados com um risco aumentado de fraturas, em duas a quatro vezes (KOHLMEIER *et al.*, 1998; CAULEY *et al.*, 1999; JOHNSTON *et al.*, 1999). Esses dados não são corroborados por outros, que relatam essas relações com a osteoporose associadas aos genótipos da Apo E (BOOTH *et al.*, 2000; HEIKKINEN *et al.*, 2000; VON MÜHLEN *et al.*, 2001).

A ApoE é uma proteína plasmática, codificada por um gene no cromossomo 19 (ZANNIS *et al.*, 1993), que media a absorção das lipoproteínas nos tecidos. O gene da apolipoproteína E (APOE) tem sido considerado como um candidato para a osteoporose, dada sua influência nos osteoblastos e absorção de vitamina K, sendo o alelo Apo E4 um fator genético de risco para a osteoporose. Pluijm *et al.* (2002) estudaram a associação entre a presença do alelo ϵ 4 de ApoE com diferentes aspectos, por exemplo a diminuição da DMO, alta remodelação óssea e o risco de fratura em idosos (homens e mulheres), tendo verificado se tais relações são modificadas pelo gênero e/ou idade. Os resultados confirmaram a importância de Apo E4 como um possível fator genético de risco relacionado à densidade mineral óssea e deformidades vertebrais, bem como sua relação com o gênero e a idade nos homens.

Long *et al.* (2004) analisaram quatro polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene APOE, usando testes quantitativos de desequilíbrio de ligação (QTD) em núcleos familiares caucásicos e observaram que os haplótipos do gene APOE estavam associados com os valores de DMO em homens, mas não em mulheres.

Referente ao gene *VDR*, nossos dados mostraram que pacientes e controles não diferiram quanto às frequências dos alelos F e f ($P=0,1917$). O mesmo ocorreu para os genótipos FF e Ff ($P=1,1546$; $P=0,0755$, respectivamente), ao contrário do genótipo ff, cuja frequência mostrou-se significativamente maior nos pacientes (22,6%; $P=0,0078$). Estes dados mostram-se de acordo com os achados da literatura, que associam a presença do alelo f de *VDR-FokI* com a maior prevalência e incidência de fraturas e perda de massa óssea (BALTZER *et al.* 1999; GENNARI *et al.* 1999; GOMEZ *et al.* 1999), e o alelo F com DMO aumentada em várias populações (GROSS *et al.*,1996; ARAI *et al.*,1997; HARRIS *et al.*,1997; FERRARI *et al.*,1998; AMES *et al.*,1999; GENNARI *et al.*,1999).

O VDR é um membro da família dos receptores esteróides que media os efeitos do metabólito ativo da vitamina D3, pela regulação da transcrição de um número de diferentes genes celulares (WHITFIELD *et al.*, 1995). Por causa do papel central do VDR na homeostase de cálcio e fosfato para assegurar a deposição mineral óssea, o polimorfismo *FokI* tem sido estudado no contexto de sua possível influência na densidade mineral óssea. Loretzon *et al.* (2000) investigando a associação dos polimorfismos do gene VDR com o crescimento esquelético observaram também que os genótipos VDR influenciam o tamanho ósseo em todas as fases do desenvolvimento. Porém, o papel dos diferentes alelos do gene *VDR* na suscetibilidade à osteoporose permanece ainda pouco entendido, devido aos achados obtidos em pesquisas serem conflitantes ou de difícil replicação (KEEN *et al.*, 1997; UITTERLINDEN *et al.*, 1997).

Neste estudo, a avaliação da relação entre os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e o desenvolvimento da osteoporose demonstrou que 28,3% dos pacientes e 35,9% dos controles apresentavam deleção completa do gene *GSTT1* (*GSTT1* 0/0), não havendo diferenças estatisticamente significantes entre esses grupos ($P=0,5328$). Por outro lado,

quando analisada a frequência dos genótipos GSTM1, observou-se que o genótipo nulo esteve em maior frequência entre pacientes (64,1%) comparados aos controles (37,7%; P= 0,0112).

A frequência de nulidade do gene GSTT1 na população, em geral é de 20 a 60% (PEMBLE, 1994). Entre as diferentes etnias, 60% dos asiáticos, 40% dos africanos e 20% dos caucasianos não expressam essa enzima (STRANGE & FRYE, 1999). No presente estudo, 32% dos indivíduos mostraram nulidade para GSTT1. Com relação ao gene GSTM1, as frequências elevadas do genótipo nulo caracterizado pela deleção homocigota desse gene, têm sido observadas na população em geral, variando de 20 a 50% (SEIDGARD, 1998; Rossini, 2002). Neste trabalho, 51% dos indivíduos estudados apresentaram o genótipo GSTM1 nulo, o que está em concordância com o de outros estudos. Nesse caso, destacam-se os caucasóides e asiáticos com frequências mais elevadas de indivíduos que não expressam essa enzima, comparado aos africanos (BAILEY, 1998, ROTH, 2000).

Reconhecidamente, as glutatíon-S-transferases são um dos principais grupos de enzimas detoxificantes (PAVANELLO & CLONFERO, 2000). As enzimas codificadas pelos genes GSTM1 e GSTT1 estão envolvidas na detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), um dos principais componentes da fumaça do cigarro, e de muitos poluentes ambientais (PAVANELLO & CLONFERO, 2000). Desse modo, as células de indivíduos com GSTM1/T1 nulos estão mais suscetíveis a danos ao DNA causados por esses agentes (Strange & Frye, 1999). Muthusami *et al.* (2005) estudando ratas ooforectomizadas, como modelo para osteoporose, observaram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio juntamente com a diminuição na atividade de complexos de detoxificação, incluindo as enzimas glutatíon-S-transferases (GST). Esses resultados sugerem claramente que o estresse oxidativo induzido, pela deficiência de estrógenos, nas ratas sem ovários é o principal fator por trás da perda óssea nesses animais. Desse modo, a associação da osteoporose com o

estresse oxidativo permite concluir sobre a importância das enzimas da fase II do biometabolismo, na etiopatogênese da osteoporose.

Embora o fator genético exerça grande influência no processo de osteoporose, os fatores nutricionais e antecedentes pessoais parecem influir no desenvolvimento dessa doença, tais como o hábito de fumar e a densidade mineral óssea.

O hábito de fumar esteve em destaque entre os pacientes (43,4%; $P < 0,0001$), quando comparado com o grupo controle (5,7%). Os pacientes que eram fumantes apresentaram DMO média significativamente diminuída (-3,11 DP), quando comparada a dos pacientes não fumantes (-2,11; $P < 0,0001$). Estes resultados eram esperados, uma vez que os componentes químicos do cigarro, entre eles a nicotina, atuam deprimindo a atividade do osteoblasto, tanto diretamente ou por via hormonal (LAROUCHE *et al.*, 1994).

Dentre os constituintes químicos de maior toxicidade do cigarro, encontram-se a nicotina, o benzopireno e outros hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos. Esses conduzem às lesões endoteliais e induzem a um aumento de catecolaminas, resultando em vasoconstrição, limitando o suprimento de oxigênio nos tecidos e gerando danos às vértebras e ossos (SLOSAR *et al.*, 2002).

O déficit médio de 5 a 10% na densidade óssea de indivíduos fumantes também é relatado (HOPPER & SEEMAN, 1994). Por seu efeito prejudicial na densidade mineral óssea, o cigarro tem sido também apontado como capaz de aumentar o risco a fraturas (MAY *et al.*, 1994), bem como de induzir a perda de massa óssea em homens e mulheres, provavelmente pelo seu efeito anti-estrogênico, que reduz o nível de estradiol e aumento de globulinas ligantes de hormônios sexuais (DANIEL *et al.*, 1992; HOLLENBACH *et al.*, 1993; EGGER *et al.*, 1996). É pertinente ressaltar que os efeitos deletérios do cigarro não ficam restritos apenas a indivíduos idosos. Ortego-Centeno *et al.* (1997) relatam perda de massa óssea em homens jovens e saudáveis, considerados fumantes pesados (mais de 21

cigarros/dia), ratificando o cigarro como fator de risco moderado para a osteoporose (ILL & ALEXANDRE,1993).

A análise da relação entre os polimorfismos *APOE-HhaI*, *VDR-FokI*, *GSTT1* e *GSTM1* com o hábito de fumar não apresentou diferenças significantes entre pacientes e controles, para nenhum dos genes estudados.

Quando analisada a relação entre os genótipos *APOE* (sem $\epsilon 4$; com pelo menos, um alelo $\epsilon 4$), *VDR-FokI* (FF ; com pelo menos um alelo f), *GSTT1* e *GSTM1* (ausência dos dois genes; presença de pelo menos, um dos genes) em pacientes e controles, os genótipos com pelo menos, um alelo f (-/f) para *VDR-FokI* associaram-se com frequência significativamente maior com o genótipo com pelo menos, um alelo $\epsilon 4$ (-/ $\epsilon 4$) (24,5%) em pacientes, quando comparados aos controles (5,7%; P=0,0127). A combinação do genótipo com a presença de pelo menos, um gene *GSTT1* ou *GSTM1* com os genótipos com pelo menos, um alelo f (-/f) e um alelo $\epsilon 4$ (-/ $\epsilon 4$) apresentou frequência significativamente aumentada em pacientes (22,6%) comparado aos controles (3,8%; P=0,0078).

Estes resultados reforçam a teoria de que a osteoporose é resultado de uma complexa interação entre os polimorfismos genéticos sutis e influências ambientais, tornando extremamente relevante o estudo das interações gene-gene e gene-ambiente nessa doença. Isso conduzirá certamente ao melhor entendimento dessa doença, facilitando seu diagnóstico, auxiliando, sobremaneira na identificação e detecção de grupos de risco, bem como propiciando a condução de tratamentos individualizados específicos, por permitir a seleção de opções terapêuticas mais apropriadas. Como conseqüência, estratégias de prevenção poderão ser adotadas e marcadores genéticos possivelmente serão, em futuro próximo, utilizados não apenas em estudos epidemiológicos, como também na prática clínica.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

1. O alelo $\epsilon 4$ e os genótipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ para apolipoproteína E (apo E), ff para receptor da vitamina D (*VDR-FokI*) e *GSTM1* nulo para a glutatíão-S-transferase M1 (*GSTM1*) associam-se à osteoporose, sendo a nulidade do gene *GSTM1* um fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose, o mesmo não ocorrendo para a glutatíão-S-transferase T1 (*GSTT1*);

2. O hábito de fumar apresenta-se como fator de risco para a osteoporose entre os pacientes, mostrando influenciar a densidade mineral óssea (DMO) de pacientes fumantes, que mostra-se reduzida em pacientes portadores de genótipos com pelo menos, um alelo $\epsilon 4$ para apo E;

3- A associação dos genótipos com pelo menos, um alelo f de *VDR-FokI* e um alelo $\epsilon 4$ para apo E-*HhaI* (-/f; -/ $\epsilon 4$) apresenta-se como fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose; similarmente para a associação dos genótipos com a presença de *GSTT1* e/ou *GSTM1* com pelo menos, um alelo f de *VDR-FokI* e um alelo $\epsilon 4$ para apo E-*HhaI* (T1+ e/ou M1+; -/f; -/ $\epsilon 4$).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S.Z.; EL-ZEIN, R.A.; ANWAR, W, AU, W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters*, v.107, p.229-233, 1996.

AEBERSOLD-SCHUTZ, G. Do endurance sports lead to osteoporosis in women? *Orthopade*, v.26, p.955-960, 1997.

AMES, S.K.; ELLIS, K.J.; GUNN, S.K.; COPERLAND, K.C.; ABRAMS, S.A. Vitamin D receptor gene *Fok1* polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, p.740-746, 1999.

ANDERSON, J.J. Plant- based diets and bone health: nutritional implications. *Am J Clin Nutr*, v. 70, p.539-542, 1999.

ARAI, H.; MIYAMOTO, K.; TAKETANI, Y.; YAMAMOTO, Y.I.; MORITA, K.; TONAI, T.; NISHISHO, T.; MORI, S.; TAKEDA, E. A vitamin D receptor gene polymorphism in translation códon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J. Bone Miner. Res.*, v.12, p.915, 1997.

ARDEN, N.K.; BAKER, J.; HOGG, C.; BAAN, K.; SPECTOR, T.D. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneous and hip axis length: a study of post-menopausal twins. *J. Bone Miner. Res.*, v.11, p.530-534, 1996.

ARDEN, N.K.; SPECTOR, T.D. Genetic influences on muscle strength, lean body mass and bone mineral density: a twin study. *J. Bone Miner. Res.*,v.12, p.2076-2081, 1997.

AUDÍ, L.; CARCÍA-RAMÍREZ, M.; CARRASCOSA, A. Genetic determinants of bone mass. *Horm. Res.*, v.51, p.105-123, 1999.

BALTZER, A.W.; REINECKE, J.; WEHLING, P.; GRANRATH, M.; SCHULIT, K. P.; Bone density and bone metabolism regulated by vitamin D receptor allele polymorphism in a German study sample. *Orthop Ihre Grenzgeb*, v. 137, p. 273-279, 1999.

BARRET-CONNOR E.; SIRIS E.S.; WEHREN L.E. *et al.* Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups. *J Bone Miner Res*. V.20, p.185-194, 2005.

BASS, S.; PEARCE, G.; BRADNEY, M.; HENDRICH, E.; DELMAS, P.D.; HARDING, A.; SEEMAN, E. Exercise before puberty may confer residual benefits in bone density in adulthood: studies in active prepubertal and retired female gymnasts. *J Bone Miner Res*, v.13, p.500-507, 1998.

BATTIÉ, M.C.; VIDEMAN, T.; GILL, K. Smoking and lumbar intervetebral disc degeneration: An MRI study in identical twins. *Spine*, v.16, p.1015-1021, 1991.

BAILEY, L.R.; ROODIN VERIER, C.S.; YEE, C.J.; DUPONT, W.D.; PARL, F.F. Breast cancer risk and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. *Cancer Re*. v.58, p.65-70, 1998.

BEAMER, W.G.; SHULTZ, K-L.; CHURCHILL, G.A.; FRANKEL, W.N.; BAYLINK, D.J.; ROSEN, C.J.; DONAHUE, L.R. Quantitative trait loci for bone density in C57BL/6J and CAST/EiJ inbred mice. *Mamm. Genome*, v.10, p.1043-1049, 1999.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, v.56, p.335-344, 1989.

BENES, H.; WEINSTEIN, R.S.; ZHENG, W.; THADEN, J.J.; JILKA, R.L.; MANOLAGAS, S.C.; SHMOOKLER REIS, R.J. Chromosomal mapping of osteopenia-associated quantitative trait loci using closely related mouse strains. *J. Bone Miner. Res.*, v.15, p.626-633, 2000.

BILEZIKIAN JP. Osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, p.3431-3434, 1999.

BLANCO, J.C.G.; WANG, I.M.; TSAY, M.J.; O'MALLEY, B.W.; JURUTKA, P.W.; HAUSSLER, M.R.; OZATO, K. Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.92, p.1535-1539, 1995.

BOOTH, S.L.; TUCKER, K.L.; CHEN, H. *et al.* Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.71, p.1201-1208, 2000.

BOUILLON, R.; OKAMURA, W.H.; NORMAN, A.W. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.*, v.16, p.200-257, 1995.

BURGER, H.; DE LAET, C.E.; VAN DAELE, P.L.; *et al.* Risk factors for increased bone loss in an elderly population: the Rotterdam Study. *Am J Epidemiol.* v.147, p. 871-879, 1998.

CADARETTE, S.M.; JAGLAL, S.B.; MURRAY, T. *et al.* Evaluation of decision rules for referring women for bone densitometry by dual-energy x-ray absorptiometry. *JAMA*, v.286, p.57-63, 2001.

CAULEY, L.A.; ZMUDA, J.M.; YAFFE, K.; KULLER, L.H.; FERREL, R.E.; WISNIEWSKI, S.R.; CUMMINGS, S.R.; Apolipoprotein E polymorphism: a new genetic marker of hip fracture risk- The study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*, v.14, p. 1175-1181, 1999.

CAULEY, J.A.; LUI, L-Y.; ENSRUD, K.E.; *et al.* Bone mineral density and the risk of incident nonspinal fractures in black and white women. *JAMA*, v.293, p.2102-2108, 2005.

CHRISTIAN, J.C.; YU, P.L.; SLEMENDA, C.W.; JOHNSTON, C.C. Heritability of bone mass: longitudinal study in aging male twins. *Am. J. Hum. Genet.*, v.44, p.429-433, 1989.

CONFORTI-FROES, N.; EL-ZEIN, R.; ABDEL- RAHMAN, S.; AU, W. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutation Research*, v. 379, p.53-59, 1997.

Consensus Development Conference, Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, *Am J. Med*, v.94, p.646-650, 1993.

COOPER, C.; ATKINSON, E.J.; WAHNER, H.W, O'FALLON, W.M.; RIGGS, B.L.; JUDD, H.L.; MELTON, L.J. Is caffeine consumption a risk actor for osteoporosis? *J Bone Miner Res*, v. 7, p. 465-471, 1992a.

COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON III, L.J. Hip fractures in the elderly: a wolrd-wide projection. *Osteoporos Int*, v.2, p.285-289, 1992b.

CORBO, R.M.; SCACCHI, R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a "thrifty" allele? *Ann Hum Genet*. v. 63, n.4, p.301-310, 1999.

CORVOL, M.T.; DUMONTIER, M.F.; GARABÉDIAN, M.; RAPPAPORT, R. Vitamin D and cartilage. II. Biological activity of 25-hydroxycholecalciferol and. 24:25- and 1,25-dihydroxycholecalciferol on cultured growth plate chondrocytes. *Endocrinology*, v.102, p.1269-1276, 1978.

CUMMINGS SR, BLACK DM, NEVITT MC, *ET AL*. Bone density at various sites for prediction of hip fractures: the Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet*, v.341, p.72-75, 1993.

CUNDY, T.; CORNISH, J.; EVANS, M.C.; GAMBLE, G.; STAPLETON, J.; REID I.R. Sources of inter-racial variation in bone mineral density. *J. Bone Miner. Res.*, v.10, p.368-373, 1995.

DANIEL, M.; MARTIN, A.D.; DRINKWATER, D.T. Cigarette smoking, steroid hormones, and bone mineral density in young women. *Calcif Tissue Int.*, v.50, p.300-305, 1992.

DANIELS, L.D.; PETTIFOR, J.M.; SCHINITZLER, C.M.; RUSSELL, S.W.; PATEL, D.N. Ethnic differences in bone density in female South African nurses. *J. Bone Miner. Res.*, v.10, p.359-367, 1995.

DAVIGNON J.; GREGG R.E.; SING C.F. Apolipoprotein E polymorphism and arteriosclerosis. *Arteriosclerosis*. V.8, p.1-21, 1988.

DE LAET C.E.; VAN HOUT B.A.; BURGER H.; HOFMAN A.; POLS H.A. Bone density and risk of hip fracture in men and women: cross sectional analysis. *BMJ*. V.315, p.221-225, 1997.

DENG, H.W.; CHEN, W.M.; CONWAY, T.; ZHOU, Y.; DAVIES, K.M.; STEGMAN, M.R.; DENG, H.Y.; RECKER, R.R. Determination of bone mineral density of the hip and spine in human pedigrees by genetic and life-style factors. *Genet. Epidemiol.*, v.19, p.160-177, 2000.

DENG, H.W.; LI, J.; LI, J.L.; JOHNSON, M.; GONG, G.; DAVIS, K.M.; RECKER, R.R. Change of Bone mass in postmenopausal Caucasian women with and without hormone replacement therapy is associated wih vitamin D receptor and estrogen receptor genotypes. *Hum Genet*, v.103, p.576-585, 1998.

DENG, H.W.; LI, J.; LI, J.L.; JOHNSON, M.; RECKER, R.R. Association of VDR and ER genotypes with bone mass in postmenopausal women: different conclusions with different analyses. *Osteoporos. Int.*, v.9, p.499-507, 1999a.

DENG, H.W.; LIVHSHITS, G.; XU, F.H.; CONWAY, T.; DAVIES, K.M.; DENG, H.Y.; RECKER, R.R. Evidence of a major gene for bone mineral density/content in human pedigrees identified via probands with extreme bone mineral density. *Ann. Hum. Genet.*, v.66, p.61-74, 2002a.

DENG, H.W.; STEGMAN, M.R.; DAVIES, M.; CONWAY, T.; RECKER, R.R. Genetic determination of peak bone mass (PBM) at hip and spine an common familiar environmental effects on bone qualities. *J. Clin. Densitom.*, v.2, p. 251-263, 1999b.

DENG, H.W.; XU, F.H.; CONWAY, T.; DENG, X.T.; DAVIES, K.M.; LI, J.L.; DENG, H.Y.; RECKER, R.R. Is population bone mineral density linked to the marker d11s987 on chromosome 11q12-13?. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.86, p.3735-3741, 2001.

DENG, H.W.; XU, F.H.; HUANG, Q.Y., *et al.* A whole-genome linkage scan suggest several genomic regions potentially containing quantitative trait loci for osteoporosis. *J. Clin. Endocr. Metab.*, v.87, p.5151-5159, 2002b.

DEQUEKER J, NIJIS N, VERSTRATEN A, GEUSENS P, GEVERS G. Genetic determinants of bone mineral content at the spine and radius: a twin study. *Bone*, v.8, p.207-209, 1987.

DEVOTO, M.; SHIMOYA, K.; CAMINIS, J.; OTT, J.; TENENHOUSE, A.; WHYTE, M.P.; SEREDA, L.; HALL, S.; CONSIDINE, E.; WILLIAMS, C.J.; TROMP, G.; KUIVANIEMI, H.; ALA KOKKO, L.; PROCKOP, D.J.; SPOTILA, L.D. First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggests genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4p. *Eur. J. Hum. Genet.*, v.6, p.151-157, 1998.

DUNCAN, E.L.; BROWN, M.A.; SINSHEIMER, J.; BELL, J.; CARR, A.J.; WORDSWORTH, B.P.; WASS, J.A.H. Suggestive linkage of the parathyroid receptor type 1 to osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, p.1993-1999, 1999.

EBELING, P.R. Osteoporosis in men. New insights into aetiology, pathogenesis, prevention and management. *Drugs Aging*, v.13, p.421-434, 1998.

ECONS, M.J.; KOLLER, D.L.; HUI, S.L.; FISHBURN, T.; CONNEALLY, P.M.; JOHNSTON, C.C.; PEACOCK, M.; FOROUD, T.M. Confirmation of linkage to chromosome 1q for peak vertebral bone mineral density in premenopausal white women. *Am. J. Hum. Genet.*, v.74, p.223-228, 2004.

EGGER, P.; DUGGLEBY, S.; HOBBS, R.; FALL, C.; COOPER, C. Cigarette smoking and bone mineral density in the elderly. *J Epidemiol Community Health*, v. 50, p.47-50, 1996.

EPSTEIN, S.; GOODMAN, G.R. Improved strategies for diagnosis and treatment of osteoporosis. *Menopause*, v.6, p.242-250, 1999.

ETTINGER, M.P. Aging Bone and Osteoporosis: Strategies for Preventing Fractures in the Elderly. *Arch Intern Med*, v.163, p.2237-2246, 2003.

EVANS, R.A.; MAREL, G.M.; LANCASTER, E.K.; KOS, S.; EVANS, M.; WONG, S.Y. Bone mass in low relatives of osteoporotic patients. *Ann. Intern. Med.*, v.109, p.870-873, 1988.

FAZEKAS F.; ENZINGER, C.; ROPELE S.; SCHMIDT H.; SCHMIDT R.; STRASSER-FUCHS S. The impact of our genes: Consequences of the apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer disease and multiple sclerosis. *J Neurol Sci.*, v.21, p.22-28, 2006.

FERRARI, S.; RIZZOLI, R.; BONJOUR, J.P. Genetic aspects of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol*, v.11, p.294-300, 1999.

FERRARI, S.; RIZZOLI, R.; MANEN, D.; SLOSMAN, D.; BONJOUR, J.P. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (*Fok I*) and bone mineral density : interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms. *J Bone Miner Res*, v. 13, p.925-930, 1998.

FLICKER, L.; HOPPER, J.L.; RODGERS, L.; KAYMAKCI, B.; GREEN, R.M.; WARK, J.D. Bone density in elderly women: a twin study. *J. Bone Miner. Res.*, v.10, p.1607-1613, 1995.

GENNARI, L.; BECHERINI, L.; FALCHETTI, L.; MASI, F.; MASSART, F.; BRANDI M.L. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.81, p.1-24, 2002.

GENNARI, L.; BECHERINI, L.; MANSANI, R.; BRANDI, M.L. Fok I polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *J Bone Miner Res*, v.14, p.1379-1386, 1999.

GENNARI, L.; BRANDI, M.L. Genetics of male osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.*,v.69, p.200-204, 2001.

GOMEZ, C.; NAVES, M.L.; BARRIOS, Y.; DIAZ, J.B.; FERNANDEZ, J.L.; SALIDO, E.; TORRES, A.; CANNATA, J.B. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mass, bone loss and prevalence of vertebral fracture: differences in postmenopausal women and men. *Osteoporos Int*, v.10, p.175-182, 1999.

GOEDERT, M.; STRITTMATER, W.J.; ROSES, A.D. Alzheimer's disease: Risk apolipoprotein in brain. *Nature*, v.372, p.45-46, 1994.

GREGG, E.W.; CAULEY, J.A.; SEELEY, D.G.; ENSRUD, K.E.; BAUER, D.C. Study of osteoporotic fractures research group. *Ann Intern Med*, v. 129, p.133-134, 1998.

GROSS, C.; ECCLESHALL, T.R.; MALLOY, P.J.; LUZ VILLA, M.; MARCUS, R.; FELDMAN, D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the

vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J. Bone Miner. Res.*, v.11, p.1850-1855, 1996.

GUERGUEN. R.; JOUANNY, P.; GUILLEMIN, F.; KUNTZ, C.; POUREL, J.; SIEST, G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res*, v.12, p.2017-2022, 1995

GUO, B.; ASLAM, F.; VAN WIJNEN, A.J.; ROBERTS, S.G.E.; FRENKEL, B.; GREEN, M.R.; DELUCA, H.; LIAN, J.B.; STEIN, G.S.; STEIN, J.L. YY1 regulates vitamin D receptor/retinoid X receptor mediated transactivation of the vitamin D responsive osteocalcina gene. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, v.94, p.121-126, 1997.

GUSTINCICH S, MANFIOLETT GG, DEL SG. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques* 1991;11:298-301.

HANSEN, M.A.; HASSAGER, C.; JENSEN, S.B.; CHRISTIANSEN, C. Is Heritability a risk factor for post-menopausal osteoporosis?. *J. Bone Miner. Res.*, v.79, p.1037-1043, 1992.

HARRIS, M.; NGUYEN, T.V.; HOWARD, J.M.; KELLY, P.J.; EISMAN, J.A. Genetic and environmental correlations between bone formation and bone mineral density: a twin study. *Bone*, v.22. p.141-145, 1998.

HARRIS, S.; ECCLESHALL, T.; GROSS, C.; DAWSON-HUGHES, B.; FELDMAN, D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (*FokI*) and bone mineral density in premenopausal american black and white women. *Journal of bone and mineral research*, v.12, p.1043-1048, 1997.

HAUSSLER, M.R.; JURUTKA, P.W.; HSIEH, J.C.; THOMPSON, P.D.; SELZNICK, S.H.; HAUSSLER, C.A.; WHITFIELD, G.K. New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone*, v.17, p.33S-38S, 1995.

HAUSSLER, M.R.; TERPENING, C.M.; JURUTKA, P.W.; MEYER, J.; SCHULMAN, B.A.; HASSLER, C.A.; WHITFIELD, G.K.; KOMM, B.S. Vitamin D hormone receptors: structure, regulation and molecular function. In: IMURA, H.; SHIZUME, K.; YOSHIDA, S.; (eds). *Progress in Endocrinology*, p.763-770, 1988.

HAUSSLER, M.R.; WHITFIELD, G.K.; HAUSSLER, C.A.; HSIEH, J.C.; THOMPSON, P.D.; SELZNICK, S.H.; ENCINAS DOMINGUEZ, C.; JURUTKA, P.W. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.*, v.13, p.325-349, 1998.

HEIKKINEN, A.M.; KROGER, H.; NISKANEN, L.; KOMULAINEN, M.H.; RYYNANEN, M.; PARVIAINEN, M.T.; TUPPURAINEN, M.T.; HONKANEN, R.; SAARIKOSKI, S. Does apolipoprotein E genotype relate to BMD and bone markers in postmenopausal women?. *Maturitas*, v.34, p.33-41, 2000.

HERNANDEZ-AVILA, M.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J.; ROSNER, B.; SPEIZER, F.E.; WILLET, W.C. Caffeine moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-age women.

HIXSON, J.P.; VERNIER, D.T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J L Res.*, v.31, p.545-548, 1990.

HOLLENBACH, K.A.; BARRET-CONNOR, E.; EDELTEIN, S.L.; HOLLBROOK, T. Cigarette smoking and bone mineral density in older men and women. *Am J Public Health*, v.83, p.1265-1270, 1993.

HOOPER, J.L.; GREEN, R.M.; NOWSON, C.A.; YOUNG, D.; SHERWIN, A.J.; KAYMAKCI, B.; LARKINS, R.G.; WARK, J.D. Genetic, common environment and individual-specific components of variance for bone mineral density in 10-26-year-old females: a twin study. *Am. J. Epidemiol.*, v.147, p.17-29, 1998.

HOOPER, J.L.; SEEMAN, E. The bone density of female twins discordant for tobacco use. *N Engl J Med*, v.330, p.387-392, 1994.

HUI, S.L.; SLEMENDA, C.W.; JOHNSTON, C.C. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest*, v.81, p.1804-1809, 1988.

ILL, P O, ALEXANDRE, C. Tobacco as risk factor of osteoporosis, myth or reality? *Rev Rhum Ed Fr*, v. 60, p.280-286, 1993.

JOHNELL, O. The socioeconomic burden of fractures: today and in the 21st century. *Am. J. Med.*, v.103, p.20S-25S, 1997.

JOHNSON, M.L.; GONG, G.; KIMBERLING, W.; RECKER, S.M.; KIMMEL, D.B.; RECKER, R.B. Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am. J. Hum. Genet.*, v.60, p.1326-1332, 1997.

JOHNSTON, J.M.; CAULEY, J.A.; GANGULI, M. APOE4 and hip fracture risk in a community-based study of older adults. *J Am Geriatr Soc*, v. 47, p. 1342-1345, 1999.

JURUTKA, P.W.; REMUS, L.S.; THOMPSON, P.D. Molecular characterization of polymorphic human vitamin D receptor that are associated with differences in bone mineral density: basic residues n-terminal of the first zinc enhance transcriptional activity by contacting TFIIB, *Bone*, v.23, p.186, 2000.

KAMMERER, C.M.; SCHNEIDER, J.L.; COLE, S.A.; HIXSON, J.E.; SAMOLLO, P.B.; O'CONNELL, J.R.; PEREZ, R.; DYER, T.D.; ALMASY, L.; BLANGERO, J.; BAUER, R.L.; MITCHELL, B.D. Quantitative trait loci on chromosomes 2p, 4p, and 13q influence bone mineral density of the forearm and hip in Mexican Americans. *J. Bone Miner. Res.*, v.18, p.2245-2252, 2003.

KARASIK, D.; MYERS, R.H.; CUPPLES, L.A.; HANNAN, M.T.; GAGNON, D.R.; HERBERT, A; KIEL, D.P. Genome screen for quantitative trait loci contributing to normal variation in bone mineral density: the Framingham Study. *J. Bone Miner. Res.*, v.17,1718-1727, 2002.

KEEN, R.W.; EGGER, P.; FALL, C.; *et al.* Polymorphisms of the vitamin D receptor, infant growth, and adult bone mass. *Calcif. Tissue Int.*, v.60, p.233-235, 1997.

KEITA, S.O.; KITTLES, R.A.; ROYAL C.D.M, *et al.* Conceptualizing human variation. *Nat. Genet.*, v.36, p.17-20, 2004.

KEIVER, K, ELLIS, L, ANZARUT, A, WEINBERG, J. Effect of prenatal ethanol exposure on fetal calcium metabolism. *Alcohol Clin Exp Res*, v.21, p.1612-1618, 1997.

KELLY, P.J.; NGUYEN, T.; HOPPER, J.; POCOCK, N.; SAMBROOK, P.; EISMAN, J. Changes in axial bone density with age: a twin study. *J. Bone Miner. Res.*, v.8, p.11-17, 1993.

KIEL, D.P.; FELSON, D.T.; HANNAN, M.T.; ANDERSON, J.J.; WILSON, P.W. Caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. *Am J Epidemiol*, v.132, p. 675-684, 1990.

KLEIN, R.F.; MITCHELL, S.R.; PHILLIPS, T.J.; BELKNAP, J.K.; ORWOL, E.S. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. *J. Bone Miner. Res.*, v.13, p.1648-1656, 1998.

KOLLER, D.L.; ECONS, M.J.; RODRIGUEZ, L.A.; CHRISTIAN, J.C.; HUI, S.L.; MORIN, P.; CONNEALLY, P.M.; JOSLYN, G.; PEACOCK, M.; JOHNSTON, C.C. Genome scan for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.85, p.3116-3120, 2000.

KOHLMEIER, M.; SALOMON, A.; SAUPE, J.; SHEARER, M.J. Transport of vitamin K to bone in humans. *J. Nutr.*, v.126, p.1192S-1196S, 1996.

KOHLMEIER, M.; SAUPE, J.; SCHAEFER, K.; ASMUS, G. Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. *Calcif. Tissue Int.*, v.62, p.278-281, 1998.

KRALL, E.A.; DAWSON-HUGHES, B. Heritability and life-style determinants of bone mineral density. *J. Bone Miner. Res.*, v.8, p.1-9, 1993.

KRAVITZ, R.L.; DUAN, N.; BRASLOW, J. Evidence-based medicine, heterogeneity of treatment effects, and the trouble with averages. *Milbank Q.* v.13, p.661-687, 2004.

KULAK, C.A.; BILEZIKIAN, J.P. Osteoporosis: preventive strategies. *Int J Fertl Women Med*, v. 43, p. 56-64, 1998.

KYRO, A.; USENIUS, J.P.; AARNIO, M.; KUNNAMO, I.; AVIKAINEN, V. Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures? *Ann Chir Gynaecol*, v 82, p.254-262, 1993.

LAROCHE, M.; LASNE, Y.; FELEZ, A.; MOULINIER, L.; BON, E.; CANTAGREL, A.; LEOPHONTE, P.; MAZIERES, B. Osteocalcin and smoking. *Rev Rhum Ed Fr*, v. 61, p. 433-436, 1994.

LAVIGNE, A.C.; MENGUS, G.; GANGLOFF, Y.G.; WURTZ, J.M.; DAVIDSON, I. Human TAF₁₁₅₅ interacts with the vitamin D₃ and thyroid hormone receptors and with derivatives of the retinoid X receptor that have altered transactivation properties. *Mol. Cell. Biol.*, v.19, p.5486-5494, 1999.

LIAO, J.; OZONO, K.; SONE, T.; MCDONNELL, D.P.; PIKE, J.W. Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.87, p.9751-9755, 1990.

LINDSAY, R.; COSMAN, F. Osteoporosis. In: BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; *et al.*, (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, v.15, p.2226-2237, 2001.

LINDSAY R.; SILVERMAN S.L.; COOPER C. *et al.*. Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *JAMA*, v.285, p.320-323, 2001.

LIU, Y.Z.; LIU, Y.J.; RECKER, R.R.; DENG, H.W. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J. Endocrinol.*, v.177, p.201-217, 2003.

LIVSHITS, G.; KARASIK, D.; KOBLYANSKY, E. Major gene control of bone mineral density in two human populations. *J. Bone Miner. Res.*, v.17, p.152-161, 2001.

LLOYD, T, ROLLINGS, N, EGGLI, D F, KIESELHORST, K, CHINCHILLI, V M. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, v.65, p.1826-1830, 1997.

LONG, J.R; DENG, H.W.; XIONG, D.H.; ZHAO, L.J.; SHEN, H.; LU, Y.; LIU, Y.J.; LIU, P.Y. APOE Haplotypes influence bone mineral density in caucasian males but not females. *Calc. Tissue Int.*, v.223,p.04-34, 2004.

LONZER, M.D.; IMRIE, R.; ROGERS, D.; WORLEY, D.; LICATA, A.; SECIC, M. Effects of heredity, age, weight, puberty, activity and calcium intake on bone mineral density in children. *Clin. Pediatr.*, v.35, p.185-189, 1996.

LORENTZON, M.; LORENTZON, R.; NORDSTRÖM, P. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with birth height, growth to adolescence, and adult stature in healthy caucasian men: a cross-sectional an longitudinal study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.85, p.1666-1671, 2000.

LUCKEY, M.M.; MEIER, D.L.; MANDELI, I.P.; DA COSTA, M.C.; HUBBARD, M.L.; GOLDSMITH, S.I. Radial and vertebral bone density in white and black women: Evidence for racial differences in pre-menopausal bone homeostasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, v.69, p.762-770, 1989.

LUTZ, J.; TESAR, R. Mother-daughter pairs: spinal and femoral densities and dietary intakes. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.52, p.872-877, 1990.

MACDONALD, P.N.; HAUSSLER, C.A.; TERPENING, C.M.; GALLIGAN, M.A.; REEDER, M.C.; WHITFIELD, G.K.; HAUSSLER, M.R. Baculovirus-mediated expression of the human vitamin D receptor: functional characterization, vitamin D response element interactions, and evidence for a receptor auxiliary factor. *J. Biol. Chem.*, v.266, p.18808-18813, 1991.

MACDONALD, P.N.; SHERMAN, D.R.; DOWD, D.R.; JEFcoat JR., S.C.; DELISLE, R.K. The vitamin D receptor interacts with general transcription factor IIB. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.4748-4752, 1995.

MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E: from cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, v.240, p.622-630, 1988.

MARCHIGIANO, G. Osteoporosis: primary prevention and intervention strategies for women at risk. *Home Care Provid.*, v.2, p.76-81, 1997.

MARSHALL, D.; JORNELL, O.; WEDEL, H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *B M J.*, v.312, p.1254-1259, 1996.

MASUYAMA, H.; JEFEROAT JR., S.C.; MACDONALD, P.N. The N-terminal domain of transcription factor IIB is required for direct interaction with the vitamin D receptor and participates in vitamin D-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.*, v.11, p.218-228, 1997.

MAY, H.; MURPHY, S.; KHAW, K.T. Cigarette smoking and bone mineral density in older men. *Q J M*, v.87, p.625-630, 1994.

MELTON, L.J.; ATKINSON, E.J.; COOPER, C.; O'FALLON, W.M.; RIGGS, B.L. Vertebral fractures predict subsequent fractures. *Osteoporos Int.* v.10, p.214-221, 1999.

MELTON, L.J.; THAMER, M.; RAY, N.F.; CHAN, J.K.; CHESNUT, C.H.; EINHORN, T.A.; JOHNSTON, C.C.; RAISZ, L.G.; SILVERMAN, S.L.; SIRIS, E.S. Fractures attributable to osteoporosis: report from the national osteoporosis foundation. *J Bone Miner Res*, v.12, p.16-23, 1997.

MENGUS, G.; MAY, M.; CARRE, L.; CHAMBON, P.; DAVIDSON, I. Human TAF₁₁₁₃₅ potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D₃, and thyroid hormone receptor in mammalian cells. *Genes Dev.*, v.11, p.1381-1395, 1997.

MORISHIMA, A.; GRUMBACH, M.M.; SIMPSON, E.R.; FISCHER, C.; QIN, K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*, v.80, p.3689-3698, 1995.

MORRISON, N.A.; QI, J.C.; TOKITA, A.; KELLY, P.J.; CROFTS, L.; NGUYEN, T.V.; SAMBROOK, P.N.; EISMAN, J.A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, v.367, p.284-287, 1994.

MUHLEN, D.G.; BARRET-CONNOR, E.; SCHINEIDER, D.L.; MORIN, P.A.; PARRY, P. Osteoporosis and apolipoprotein E genotype in older adults: the Rancho Bernardo study. *Osteoporos. Int.*, v.12, p.332-335, 2001.

MUTHUSAMI, S.; RAMACHANDRAN, I.; MUTHUSAMY, B.; *et al.* Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin. Chim. Acta.*, v.360, p.81-86, 2005.

NAKAJIMA, S.; YAMAGATA, M.; SAKAI, N.; OZONO, K. Characterization of the activation function-2 domain of the human 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.139, p.15-24, 1998.

NAKAMURA, T. The importance of genetic and nutritional factors in response to vitamin D and its analogs in osteoporotic patients. *Calcif. Tissue. Int.*, v. 60, p. 119-123, 1997.

National Osteoporosis Foundation. Physician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Belle. Mead.*, NJ: Excerpta Medica; 1998.

NEWMAN, P.; BONELLO, F.; WIERZBICKI, A.S.; LUMB, P.; SAVIDGE, G.F.; SHEARER, M.J. The uptake of lipoprotein-borne phyloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: role of heparin sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Bone Miner. Res.*, v.17, p.426-433, 2002.

NIU, T.; CHEN, C.; CORDELL, H.; YANG, J.; WANG, B.; WANG, Z.; FANG, Z.; SCHORK, N.J.; ROSEN, C.J.; XU, X. A genome-wide scan for loci linked to forearm bone mineral density. *Hum Genet*, v. 104, p. 226-233, 1999.

NIU, T.; XU, X. Candidate genes for osteoporosis: therapeutic implications. *Am. J. Pharm.*, v.1, p.11-19, 2001.

NGUYEN, T.V.; SAMBROOK, P.N.; EISMAN, J.A. Bone loss, physical activity, and weight change in elderly women: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *J Bone Miner Res*, v.13, p.1458-1467, 1998.

NODA, M.; VOGEL, R.L.; CRAIG, A.M.; PRAHL, J.; DELUCA, H.F.; DENHARDT, D.T. Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (Spp-1 or osteopontin) gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.87, p.9995-9999, 1990.

ODA, H.; MATSUZAKI, H.; TOKUHASHI, Y.; WAKABAYASH, K.; UEMATSU, Y.; IWHASHI, M. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model. *J. Orthop. Sci.*, v.9, p.135-141, 2004

OKTENOGU, T.; OZER, A.F.; BODEN, S.D.; RECHTINE, G.R. *Surgical Procedures*. 1^a Ed. Cap 99. Smoking, The Spine, and Spinal Fusion, 1333-1339, 2002.

ORTEGO-CENTENO, N.; MUNOZ- TORRES, M.; JODAR, E.; HERNANDEZ-QUERO, J.; JURADO-DUCE, A.; DE LA HIGUERA TORRES-PUCHOL, J. Effect of tobacco consumption on bone mineral density in healthy young males. *Calcif Tissue Int*, v.60, p.496-500, 1997.

ORWOLL, E.S.; OVIATT, S.K.; MCCLUNG, M.R.; DEFTOS, L.J.; SEXTON, G. The rate of bone mineral loss in normal men and the effects of calcium and cholecalciferol supplementation. *Ann Intern Med*, v.112, p.29-34, 1990.

ORWOLL, E.S. Osteoporosis in men. *Endocrinol Metab Clin North Am*, v.27, p.349-367, 1998.

OZONO, K.; LIAO, J.; KERNER, S.A.; SCOTT, R.A.; PIKE, J.W. The vitamin D-responsive element in the human osteocalcina gene: association with a nuclear proto-oncogene enhancer. *J. Biol. Chem.*, v.265, p.21881-21888, 1990.

PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res.*, v.465, p.285-308, 2000.

PEACOCK, M.; TURNER, C.H.; ECONS, M.J.; FOROUD, T. Genetics of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, v.23, p.303-326, 2002.

PEMBLE, S.; SCHOROEDER, K.R.; SPENCER, S.R.; MEYER, D.J.; HALLIER E.; BOLT, H.M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J.B. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1):cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*, v.300, p.271-76, 1994

PIETSCHMANN, P.; PETERLIK, M. *Wien Med Wochenschr*, v. 149, p. 454-462, 1999.

PLUIJM, S.M.; DIK, M.G.; JONKER, C.; DEEG, D.J.; KAMP, G.J.; LIPS, P. Effects of gender and age on the association of apolipoprotein E epsilon4 with bone mineral density, bone turnover and the risk of fractures in older people. *Osteoporos. Int.*, v.13, p.701-709, 2002.

POCOCK, N.A.; EISMAN, J.A.; HOPPER, J.L.; YEATES, M.G.; SAMBROOK, P.N.; EBERL, S. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest*, v.80, p.706-710, 1987.

PRAKASAM, G.; YEH, J.K.; CHEN, M.M.; CASTRO-MAGANA, M.; LIANG, C.T.; ALOIA, J.F. Effects of growth hormone and testosterone on cortical bone formation and bone density in aged orchietomized rats. *Bone*, v.24, p.491-497, 1999.

RALSTON, S.H. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.87, p.2460-2466, 2002.

RALSTON, S.H. What determines peak bone mass and bone loss? *Baillieres Clin Rheumatol*, v.11, p.470-494, 1997.

RASMUSSEN, H.; ANAST, C. Familial hypophosphatemic rickets and vitamin D-dependent rickets. In: STANBURY, J.B.; WYNGARDEN, J.B.; FREDERICKSON, D.S.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; eds. *The metabolic basis of inherited bone disease*, v.5, p.1743-1773, 1983.

RAUBENHEIMER, E J. Histopathologic Changes in Metabolic Bone Disease. *Adv Anat Pathol*, v.11, p.38-48, 2004.

RAY, N.F.; CHAN, J.K.; THAMER, M.; *et al.* Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. *J. Bone Miner. Res.*, v.12, p.24-35, 1997.

RECKER, R.R.; DENG, H.W. The role of genetics in osteoporosis. *Endocrine*, v.17, p.55-66, 2002.

REGINSTER, J.Y.; GILLET, P.; BEM SEDRINE, W.; BRANDS, G.; ETHGEN, O.; DE FROIDMONT, C.; GOSSET, C. Direct costs of hip fractures in patients over 60 years of age in Belgium. *Pharmacoeconomics*, v.15, p.507-514, 1999.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. Medical progress series: involutional osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, v.314, p.1676-1686, 1986.

RIGGS, B.L.; MELTON III, L.J. Bone turnover matters: the raloxifene treatment paradox of dramatic decreases in vertebral fractures without commensurate increases in bone density. *J Bone Miner Res*, v.17, p.11-14, 2002.

RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON III, L.J. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res*, v.13, p.763-773, 1998.

RIZZOLI, R.; BONJOUR, J.P. Malnutrition and osteoporosis. *Z. Gerontol Geriatr*, v.32, p.31-37, 1999.

ROSEN, C.J.; KIEL, D.P. The aging skeleton. In: Favus MJ, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, p.57-59, 1999.

ROSS, T.K.; MOSS, V.E.; PRAHL, J.M.; DELUCA, H.F. A nuclear protein essential for binding of rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor to its response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.89, p.256-260, 1992.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D.C.M.; AMORIM, L.M.F.; MACEDO, J.M.B.; MEDINA, R.; NETO, J.F.N. et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genetics and Molecular Research*, v.1, p.233-240, 2002.

ROTH, M.J.; DAWSEY, S.M.; WANG, G.Q.; TANGREA, J.A.; ZHOU, B.; RATNASINGHE, D. et al. Association between GSTM1*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the high risk region of Linxian, China. *Cancer Lett.* V.156, p.73-81, 2000.

ROUSSEAU, M.E. Dietary prevention of osteoporosis. *Lippincotts Prim Care Pract*, v.1, p.307-319, 1997.

SALAMONE, L.M.; CAULEY, J.A.; ZMUDA, J.; PASAGIAN-MACAULAY, A.; EPSTEIN, R.S.; FERREL, R.E.; BLACK, D.M.; KULLER, L.H. Apolipoprotein E gene polymorphism and bone loss: estrogen status modifies the influence of apolipoprotein E on bone loss. *J. Bone Miner. Res.*, v.15, p.308-314, 2000.

SCHNITZLER, C.M.; PETTIFOR, J.M.; MESQUITA, J.M.; BIRD, M.D.T.; SCHINAID, E.; SMYTH, A.E. Histomorphometry of iliac crest bone in 346 normal black and white South African adults. *Bone Miner.*, v.10, p.183-199, 1990.

SCHWARTZ, Z.; SCHLADER, D.L.; RAMIREZ, V.; KENNEDY, M.B.; BOYAN, B.D. Effects of vitamin D metabolites on collagen production and cell proliferation of growth zone and resting zone cartilage cells *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.*, v.4, p.199-207, 1989.

SEEMAN, E.; HOPPER, J.L.; BACH, L.A.; COOPER, M.E.; PARKINSON, E.; MCKAY, J.; JERUMS, C. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *New Engl. J. Med.*, v.320, p.554-558, 1989.

SEIDGARD, J.; VORACHEK, W.R.; PERO, R.W.; PEARSON, W.R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione S-transferase activity on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.85, p.7293-7297, 1988.

SENNELS, H.P.; SAND, J.C.; MADSEN, B.; LAURITZEN, J.B.; FENGER, M.; JORGENSEN, H.L. Association between polymorphisms of apolipoprotein E, bone mineral density of the lower forearm, quantitative ultrasound of the calcaneus and osteoporotic fractures in postmenopausal women with hip or lower forearm fracture. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v.63, p.247-258, 2003.

SHEN, H.; ZHANG, Y.Y.; LONG, J.R.; *et al.* A genome-wide linkage scan for bone mineral density in an extended sample: evidence for linkage on 11q23 and Xq27. *J. Med. Genet.*, v.41, p.743-751, 2004.

SHEPHARD, R. J. Nutritional benefits of exercise. *J Sports Med Phys Fitness*, v.29, p.83-90, 1989.

SHIRAKI, M.; AOKI, C.; HOSOI, T.; OHUCHI, Y. Apolipoprotein E type 4 allele associates low bone mineral density in postmenopausal Japanese. *J. Bone Miner. Res.*, v. 12 (in press), 1997a.

SHIRAKI, M.; SHIRAKI, Y.; AOKI, C.; HOSOI, T.; INOUE, S.; KANEKI, M.; OUCHI, Y. Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J. Bone Miner. Res.*, v.12 , p.1438-1445, 1997b.

SHMOOKLER REIS, R.J.; BENES, H.; MCCLURE, T.; KANG, P.; WEINSTEIN, R.S.; SHELTON, R.S.; JILKA, R.L.; MANOLAGAS, S.C. The effect of sex on genetic determinants of pre- and post-maturaty bone accrual in mice. *J. Bone Miner. Res.*, v.16(Suppl), S351, 2001.

SLEMENDA, C.W.; CHRISTIAN, J.C.; WILLIAMS, C.J.; NORTON, J.A.; JOHNSON JR. C.C. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J. Bone Miner. Res.*, v.6, p.561-567, 1991.

SLOSAR, P.J.; PERKINS, R.B.; SNOOK, D. Effects of cigaret smoking on the spine: a focused review. *Spline*, v.3, p.6-9, 2002.

SMITH, D.M.; NANCE, W.E.; KANG, K.W.; CHRISTIAN, J.C.; JOHNSTON, C.C. Genetic factors in determining bone mass. *J. Clin. Invest.*, v.52, p.2800-2808, 1973.

SMITH, E.P.; BOYOD, J.; FRANK, G.R.; TALAHASHI, H.; COHEN, R.M.; SPECKER, B.; WILLIAMS, T.C.; LUBAHN, D.B.; KORACH, K.S. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen receptor gene in a man. *New Engl J Med*, v.331, p.1056-1061, 1994.

SOSA HENRIQUEZ, M.; TORRES RAMIRES, A.; DOMINGUEZ, C.; SALIDO, E.; SAAVEDRA, P.; BETANCOR, L. Genetic polymorphism of vitamin D receptor gene and osteoporosis. *Med Clin (Barc)*, v.110, p.636-650, 1998.

SOWERS, M.R.; BOEHNKE, M.; JANNAUSCH, M.L.; CRUTCHFIELD, M.; CORTON, G.; BURNS, T.L. Familiality and partitioning the variability of femoral bone mineral density in woman of child-bearing age. *Calcif. Tissue Int.*, v.50, p.110-114, 1992.

STALLINGS, V A. Calcium and bone health in children: a review. *Am J Ther*, v.4, p.259-273, 1997.

ST AMAND, J.; PRUD'HOMME, D.; MOORJANI, S.; NADEAU, A.; TREMBLAY, A.; BOUCHARD, C.; LUPIEN, P.J.; DESPRES, J.P. Apolipoprotein E polymorphism and the relationship of physical fitness to plasma lipoprotein-lipid levels in men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.31, p.692-697, 1999.

STRANGE, R.C.; & FRYER, A.A. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. In: *Metabolic Polimorphisms and Susceptibility to cancer* (Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P. IARC Scientific Publications, v.148, p.231-49, 1999.

STYRKARSDOTTIR, U.; CAZIER, J.B.; KONG, A.; ROLFSSON, O.; et al. Linkage of osteoporosis to Chromosome 20p12 and Association to BMP2. *PLoS Biol.*, v.1, p.E69, 2003.

SUAREZ, F.; ZEGHOUD, F.; ROSSIGNOL, C.; WALRANT, O.;GARABEDIAN, M. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and sex-dependent growth during the first two years of life. *J. Endocrinol. Metab.*, v.82, p.2966-2970, 1997.

SZULC, P.; ARLOT, M.; CHAPUY, M.C.; DUBOEUF, F.; MEUNIER, P.J.; DELMAS, P.D. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women. *J. Bone Miner. Res.*, v.9, p. 1591-1595, 1994 .

SZULC, P.; CHAPUY, M.C.; MEUNIER, P.J.; DELMAS, P.D. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J. Clin. Invest.*, v.91, p.1769-1774, 1993.

TERPENING, C.M.; HAUSSLER, C.A.; JURUTKA, P.W.; GALLIGAN, M.A.; KOMM, B.S.; HAUSSLER, M.R. The vitamin D-responsive element in the rat bone gla protein is an imperfect direct repeat that cooperates with other cis-elements in 1,25-dihydroxyvitamin D₃ –mediated transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.*, v.5, p.373-385, 1991.

TURNER, C.H. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int*, v.13, p.97-104, 2002.

UENG, S.W.; LIN, S.D.; WANG, C.R.; LIU, S.J.; TAI, C.L.; SHIH, C.H. Bone healing of tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. *J Trauma*, v.46, p.110-115, 1999.

ULLOM- MINNICH, P. Prevention of osteoporosis and fractures. *Am Fam Physician*, v.60, p. 194- 202, 1999.

UTERMANN, G.; STEINMETZ, A.; WEBER, W. Genetic control of apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet.*, v.60, p. 344-351, 1982.

VON MÜHLEN, D.G.; BARRET-CONNOR, E.; SCHNEIDER, D.L.; MORIN, P.A.; PARRY, P. Osteoporosis and apolipoprotein E genotype in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Osteoporos. Int.*, v.12, p.332-335, 2001.

VON MÜHLEN, D.G.; VISBY, L.; BARRET-CONNOR, E.; BETTENCOURT, R. Evaluation of the simple calculated osteoporosis risk estimation (SCORE) in older caucasian women: the Rancho Bernardo Study. *Osteoporos. Int.*, v.10, p.79-84, 1999.

WALKER- BONE, K.; REID, D.M.; COOPER, C. Is screening for osteoporosis worthwhile? *Brit Med Bull*, v.54, p. 915-927, 1998.

WARDLAW, G.M. Putting osteoporosis in perspective. *J Am Diet Assoc*, v.93, p.1000-1006, 1993.

WEINTRAUB, M.S.; EISENBERG, S.; BRESLOW, J.L. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J. Clin. In.*, v.80, p.1571-1577, 1987.

WHITFIELD, G.K.; HSIEH, J-C.; NAKAJIMA, S.; *et al.* A highly conserved region in the hormone binding domain of the human vitamin D receptors contains residues vital for heterodimerization with retinoid X receptor and for transcriptional activation. *Mol Endocrinol.*, v.9, p.1166-1179, 1995.

WILSON, S.G.; REED, P.W.; BANSAL, A.; CHIANO, M.; LINDERSSON, M.; *et al.* Comparison of genome screens for two independent cohorts provides replication of suggestive linkage of bone mineral density to 3p21 and 1p36. *Am. J. Hum. Genet.*, v.72, p.144-155, 2003.

WOOD, R.J.; FLEET, J.C. The genetics of osteoporosis: vitamin D receptor polymorphisms. *Ver Nutr*, v.18, p.233-258, 1998.

World Health Organization, Assessment of fractures risk and its application to screening for post-menopausal osteoporosis, *Technical report series*, WHO, Geneva, 1994.

ZAJICKOVA, K.; ZOFKOVA, I.; HILL, M.; HORINEK, A.; NOVAKOVA, A. Apolipoprotein E4 allele is associated with low bone density in postmenopausal women. *J. Endocrinol. Invest.*, v.26, p.312-315, 2003.

ZANNIS, V.I.; JUST, P.W.; BRESLOW, J.L. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet.*, v.33, p.11-24, 1981.

ZANNIS, V.I.; KARDASSIS, D.; ZANINI, E.E. Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. *Adv Hum Genet.*, v.21, p.145-319, 1993.

ZMUDA, J.M.; CAULEY, J.A.; FERREL, R.E. Recent progress in understanding the genetic susceptibility to osteoporosis. *Genet Epidemiol*, v. 16, p.356-367, 1999.

RESUMO

RESUMO

A osteoporose é uma doença metabólica, que se caracteriza por baixa massa e deterioração do tecido ósseo, conduzindo à fragilidade do osso com conseqüente aumento do risco de fraturas. O início da doença é influenciado por uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais, que pode afetar diferentemente os indivíduos. Por essa razão, faz-se necessário o estudo dos polimorfismos dos genes associados ao metabolismo ósseo, como os do Receptor para Vitamina D (VDR) e da Apolipoproteína E (APOE), além dos envolvidos no biometabolismo de agentes ambientais, como as Glutatio-S-Transferases (GSTs). Foram estudados 53 pacientes, homens e mulheres, com osteoporose e ou osteopenia, pareados por sexo e faixa etária com um grupo controle. O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico e amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os polimorfismos GSTM1 e GSTT1 foram analisados em gel de agarose 2%, enquanto os da APOE e VDR foram submetidos à restrição enzimática com as enzimas *Hha* I e *Fok* I, respectivamente, seguido da análise em gel de poliacrilamida 6%, corados com brometo de etídeo e visualizados em luz UV. A análise estatística dos dados foi realizada, utilizando-se o teste t, teste de Fisher, a regressão multivariada e o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. O genótipo nulo (0/0) de GSTM1 mostrou-se significativamente mais freqüente nos pacientes (64,1%) comparado ao dos controles (37,7%; P= 0,00112). Por outro lado, pacientes e controles não diferiram quanto à presença (+/+) e ausência (0/0) do gene GSTT1 (P=0,5328). A distribuição genotípica do polimorfismo VDR – *Fok* I revelou freqüência significativamente aumentada do genótipo ff nos pacientes (22,6%; P=0,0078). Para o gene da APOE, o alelo ε3 foi significativamente mais freqüente nos controles (0,85; P=0,0431), enquanto o alelo ε4 nos pacientes (0,20; P=0,0075). O genótipo ε3/ε4 destacou-se nos pacientes (32,1%), com relação aos controles (13,2%; P=0,0493). O hábito de fumar predominou entre os pacientes (43,4%; P<0,0001), comparado com os controles. Os pacientes fumantes apresentaram o valor médio para densidade mineral óssea (DMO) significativamente diminuído (-3,11) comparado às medidas para os pacientes não fumantes (-2,11; P<0,0001). As freqüências genotípicas de apo E, VDR-*Fok* I, *GSTT1* e *GSTM1*, analisadas em conjunto com os valores médios de DMO revelaram que pacientes portadores de genótipo apo E com pelo menos, um alelo ε4 (-/ε4) apresentaram DMO significativamente diminuída (-2,835) comparados àqueles portadores de genótipos sem ε4 (-2,200; P=0,0028). A análise da relação entre os genótipos da apoE (sem ε4, com pelo menos um alelo ε4), VDR-*Fok* I (FF, com pelo menos em alelo f), *GSTT1* e *GSTM1* (ausência dos dois genes; presença de pelo menos, um dos genes) revelou que os genótipos com pelo menos, um alelo f (-/f) para VDR-*Fok* I associaram-se com freqüência significativamente maior com o genótipo com pelo menos, um alelo ε4 (-/ε4) (24,5%) em pacientes, quando comparados aos controles (5,7%; P=0,0127). De modo semelhante, a combinação do genótipo com a presença de pelo menos, um gene *GSTT1* ou *GSTM1* com os genótipos com pelo menos, um alelo f (-/f) e um alelo ε4 (-/ε4) apresentou também, freqüência significativamente aumentada em pacientes (22,6%), em relação aos controles (3,8%; P=0,0078). Em conclusão, a presença dos alelos ε4 de apo E, o alelo f de VDR-*Fok* I, o genótipo GSTM1 nulo, bem como o hábito de fumar podem desencadear o processo degenerativo da osteoporose, provavelmente por interferirem nas reações do metabolismo ósseo e na inativação de compostos químicos.

Palavras-chave: polimorfismos genéticos, osteoporose, VDR, apo E, *GSTT1*, *GSTM1*, hábito de fumar e DMO.

ABSTRACT

ABSTRACT

Osteoporosis is a metabolic disease characterized by low body mass and bone deterioration, leading to bone fragility with the consequent increase of fractures risk. The disease onset is influenced by a complex interaction between genetic, and environment factors that can affect differently the individuals' response. Therefore, the study of polymorphisms regarding the genes involved in bone metabolism is of upgrade necessity, such as the Vitamin D Receptor gene (VDR), Apolipoprotein E (APOE), besides the genes involved in xenobiotic metabolism, it means, the Glutathion-S-Transferases (GSTs). We have studied 53 patients, men and women, with osteoporosis and/or osteopenia, matched by gender and age with a control group. The DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes and amplified through Polymerase Chain Reaction (PCR). GSTM1, and GSTT1 polymorphisms were analyzed in 2% agarose gel, while APOE, and VDR had been submitted to enzymatic restriction with Hha I and Fok I enzymes, respectively, followed by the analysis in 6% polyacrilamide gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The statistic analysis was carried on using test t, test of Fisher, the multi-varied regression and the test of Hardy-Weinberg balance. The GSTM1 null genotype (0/0) was significantly more frequent in patients (64.1%) compared to the controls (37.7%; P= 0.00112). On the other hand, patients, and controls did not differ concerning the presence (++) and absence (0/0) of GSTT1 gene (P=0.5328). The genotypic distribution of VDR *-Fok I* polymorphism showed a significantly increased frequency of the genotype ff in patients (22.6%; P=0.0078). For the APOE, the allele $\epsilon 3$ was significantly more frequent in controls (0.85; P=0.0431), while the allele $\epsilon 4$ was in patients (0.20; P=0.0075). The genotype $\epsilon 3/\epsilon 4$ was evidenced in patients (32.1%), compared to the controls (13.2%; P=0.0493). The smoking habit was prevalent among the patients (43.4%; P<0.0001), compared to the controls. The smoker patients presented a significant reduction of the bone mineral density (BMD) mean value (- 3.11) compared to non-smoker patients (- 2.11; P<0.0001). The genotype frequencies of apo E, VDR-*Fok I*, GSTT1 and GSTM1, grouped with the BMD average values disclosed that patients carrying apoE genotype with at least, one allele $\epsilon 4$ ($-\epsilon 4$) presented significantly decreased BMD (- 2.835) compared to those carrying genotypes without $\epsilon 4$ (- 2.200; P=0.0028). The analysis of the relationship among apoE genotypes (without $\epsilon 4$, with at least, one allele $\epsilon 4$), VDR-*Fok I* (FF, with at least, one allele f), *GSTT1* and *GSTM1* (absence of the two genes; presence of at least, one of the genes) disclosed that in patients, the genotypes with at least, one allele f ($-f$) for VDR-*Fok I* were associated with a significantly higher frequency to the genotype presenting at least, one allele $\epsilon 4$ ($-\epsilon 4$) (24.5%), compared to the controls (5.7%; P=0.0127). Likewise, the combination of the genotypes with the presence of at least, a gene GSTT1 or GSTM1 with the genotypes with at least, one allele f ($-f$), and one allele $\epsilon 4$ ($-\epsilon 4$) also presented a significantly increased frequency in patients (22.6%), regarding the controls (3.8%; P=0.0078). In conclusion, the presence of the alleles $\epsilon 4$ of apo E, allele f of VDR-*Fok I*, GSTM1 null genotype, as well as the smoking habit are likely to trigger the degenerative osteoporotic process for intervening in the bone metabolism, and chemical inactivation.

Keywords: genetic polymorphisms, osteoporosis, VDR, Apo E, GSTT1, GSTM1, smoking habit, and Bone Mineral Density (BMD).

APÊNDICE 1

**UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS**

**CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA
CIENTÍFICA**

Estou ciente de haver concordado em participar, voluntariamente, da pesquisa que vem sendo realizada pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas- IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto-SP. Para tanto, fornecerei sangue.

Fui informado também que os resultados a serem obtidos só serão válidos quando analisados em conjunto, nunca individualmente. Esse estudo poderá ser apresentado em publicações científicas sem a minha identificação.

São José do Rio Preto, ----- de ----- de 200 .

NOME

Assinatura

APÊNDICE 2

**QUESTIONÁRIO A SER RESPONDIDO PELOS PARTICIPANTES DO PROJETO
SOBRE OSTEOPOROSE.**

DATA:

Nº DO PACIENTE NO ESTUDO:

Nº DO PACIENTE NO HOSPITAL OU CLÍNICA

PRIMEIRO NOME:

NOME DO MEIO:

SOBRENOME:

IDADE:

SEXO:

ENDEREÇO:

CIDADE:

ESTADO:

TELEFONE RESIDENCIAL:

TELEFONE COMERCIAL:

INFORMAÇÕES BÁSICAS

1- GRUPO ÉTNICO:
(INDICAR DE QUE PARTE DO PAÍS É ORIGINÁRIO):

2- ESTADO CIVIL: CASADO, VIÚVO, SEPARADO, DIVORCIADO, SOLTEIRO

3- DATA DE NASCIMENTO (/ /)

4- LOCAL DE NASCIMENTO:

CIDADE:

ESTADO:

PAÍS:

5- QUAL É A RENDA FAMILIAR?

6- INCLUINDO VOCÊ, QUANTAS PESSOAS VIVEM EM SUA CASA?

HISTÓRICO OCUPACIONAL

- 1- QUE TIPO DE TRABALHO VOCÊ TEM ATUALMENTE?
- 2- QUAIS SÃO SUAS MAIORES RESPONSABILIDADES NO TRABALHO?
- 3- QUAL TIPO DE FERRAMENTA, EQUIPAMENTO OU COMPOSTO QUÍMICO VOCÊ MANUSEIA?
- 4- PARA QUE TIPO DE COMPANHIA VOCÊ TRABALHA?
- 5- POR QUANTOS ANOS VOCÊ DESENVOLVE ESTA ATIVIDADE?
- 6- QUAL OUTRO TRABALHO VOCÊ TEVE ? QUANTO TEMPO?
- 7- VOCÊ TEVE ALGUM TRABALHO EM QUE SE EXPÔS A PRODUTOS QUÍMICOS OU PESTICIDAS?
SE SIM DÊ DETALHES:
- 8- VOCÊ VIVE PRÓXIMO DE ÁREA INDUSTRIALIZADA? (DENTRO DE 8,0 KM DE FÁBRICA OU USINA)
- 9- SE SIM, POR QUANTOS ANOS VOCÊ VIVE NESTE LUGAR?
- 10- EM SEU TRABALHO OU PASSATEMPO, VOCÊ SE EXPÔS A ALGUMAS DAS SUBSTÂNCIAS CITADAS ABAIXO? SE SIM, INDIQUE QUAL E POR QUANTO TEMPO SE EXPÔS.

MATERIAL	TRABALHO	PASSATEMPO	SIM	ANOS		NÃO
				DE	ATÉ	
AMIANTO						
ARSÊNICO						
CRÔMIO						
SOLVENTE						
COLA						
PINTURA						
PESTICIDA						
HERBICIDA						
FERTILIZANT E						
ÓLEOS MOTOR						
GASOLINA						
FUMAÇA CARRO						
DIESEL						
POEIRA MADEIRA						

MATERIAL RADIOATIVO					
OUTRAS SUBTS.					

HISTÓRICO DE FUMO

1- VOCÊ JÁ FUMOU, PELO MENOS 100 CIGARROS EM SUA VIDA?

SIM

NÃO

2- SE SIM, QUÃO FREQUENTE VOCÊ FUMA OU FUMOU CIGARROS?

3- VOCÊ ESTÁ FUMANDO ATUALMENTE?

4- QUANTOS ANOS VOCÊ TINHA QUANDO COMEÇOU A FUMAR?

5- EM MÉDIA, QUANTOS ANOS VOCÊ FUMOU CIGARROS REALMENTE? NÃO INCLUA O TEMPO QUE VOCÊ PODE TER PARADO POR MESES OU ANOS.

6- EM MÉDIA, QUANTOS CIGARROS VOCÊ FUMA POR DIA?

7- VOCÊ FUMOU NESTE ÚLTIMO MÊS?

8- SE NÃO, QUANTO TEMPO FAZ QUE VOCÊ PAROU?

9- VOCÊ JÁ ESTEVE EXPOSTO À FUMAÇA DE OUTROS FUMANTES DIARIAMENTE OU REGULARMENTE? VERIFIQUE O QUADRO ABAIXO E RESPONDA-O.

	NUNCA/ RARAMENTE	ALGUMAS VEZES	REGULARME NTE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (DE / A) IDADE / ANOS
DURANTE A INFÂNCIA EM CASA				A
ADULTO: EM CASA				A
NO TRABALHO				A

10. VOCÊ JÁ USOU ALGUM DESSES PRODUTOS DE TABACO?

	SIM / DESISTI / NÃO	FREQÜÊNCIA?	POR QUANTOS ANOS?
TABACO DE MASCAR			
CACHIMBO			
RAPÉ			
CIGARRO DE PALHA			
CHARUTO			

HISTÓRICO DE ÁLCOOL

- 1- VOCÊ JÁ BEBEU, PELO MENOS 4 DRINKES POR SEMANA DURANTE SEIS MESES OU MAIS?
- 2- COM QUE IDADE VOCÊ COMEÇOU A BEBER REGULARMENTE?
- 3- NESTE MOMENTO, VOCÊ AINDA BEBE?
- 4- TANTO PARA OS QUE BEBEM ATUALMENTE COMO PARA OS EX-BEBEDORES:

IDADE OU ANOS INÍCIO / PARADA	QUANTIDADE/ SEMANA CERVEJA	QUANTIDADE/ SEMANA VINHO	QUANTIDADE/ SEMANA OUTROS
A			
A			
A			
A			

5. QUÃO FREQUENTEMENTE VOCÊ BEBE OS SEGUINTE TIPOS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS DURANTE A REFEIÇÃO? INCLUA AQUELAS QUE VOCÊ BEBE ANTES OU APÓS A REFEIÇÃO.

ÁLCOOL NA REFEIÇÃO	NUNCA/ RARAMENTE	ALGUMAS VEZES	REGULARMENTE
CERVEJA			
VINHO			
LICOR			

6. QUÃO FREQUENTEMENTE VOCÊ BEBE ENQUANTO FUMA?
 7. VOCÊ SENTE CALOR NA FACE APÓS BEBER ÁLCOOL?
-

EXPOSIÇÃO À LUZ SOLAR

1. QUAL SUA COR DE OLHOS?

- a) AZUL/ CINZA
- b) VERDE
- c) CASTANHO CLARO
- d) CASTANHO ESCURO

2. COMO VOCÊ CLASSIFICA SUA PELE EM UMA ESCALA DE 1 (MUITO CLARA) A 10 (MORENA ESCURA)? ASSINALE UMA:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

2. CARACTERÍSTICAS SOBRE BRONZEAMENTO. VOCÊ SEMPRE:

- a) QUEIMA-SE FACILMENTE COM QUEIMADURAS DOLOROSAS E FORMAÇÃO DE BOLHAS SEGUIDA DE ESCAMAÇÃO;
- b) QUEIMA-SE FACILMENTE SEM FORMAÇÃO DE BOLHAS, BRONZEIA-SE MINIMAMENTE;
- c) QUEIMA-SE MODERADAMENTE E BRONZEIA-SE FACILMENTE;
- d) BRONZEIA-SE FACILMENTE, NUNCA SE QUEIMA.

3. SE VOCÊ FOR JOVEM, QUANTAS HORAS POR DIA VOCÊ SE EXPÕE AO SOL?

HISTÓRICO MÉDICO

1. VOCÊ JÁ SE SUBMETEU A RAIOS- X PARA TRATAMENTO DE QUALQUER DOENÇA OU CONDIÇÕES QUE POSSAM INCLUIR TRATAMENTO PARA ACNE, TIMO OU AMÍGDALA AUMENTADOS, TIRÓIDE, TINHA OU CÂNCER? NÃO INCLUA RAIOS- X DENTÁRIO PARA OSSOS QUEBRADOS.

DOENÇA OU CONDIÇÃO	PARTE DO CORPO TRATADA	ANOS DE TRATAMENTO

2. VOCÊ TEVE FRATURA ÓSSEA QUANDO CRIANÇA OU NA FASE ADULTA?

4. SUA(S) FRATURA(S) DEMOROU (ARAM) MAIS DE 6 SEMANAS PARA REPARAR?

5. VOCÊ TEM HISTÓRIA NA SUA FAMÍLIA DE FRATURA ÓSSEA?

6. SE SIM, POR FAVOR, INDIQUE EM QUAL MEMBRO DA FAMÍLIA E QUAL O TIPO DE FRATURA.

FAMILIAR	TIPO DE FRATURA
MÃE	
PAI	
IRMÃ	
IRMÃO	
AVÓ MATERNA	
AVÔ MATERNO	
AVÓ PATERNA	
AVÔ PATERNO	

7. VOCÊ JÁ TEVE ALGUM TIPO DE CÂNCER? POR FAVOR, INDIQUE CÂNCER DE PELE, MELANOMA, LEUCEMIA, LINFOMA OU DOENÇA DE HODKINS, ETC.

8. VOCÊ JÁ FOI DIAGNOSTICADO COM ALGUMA DESSAS CONDIÇÕES?

DIAGNÓSTICO	ANO	NÃO	IDADE QUANDO DIAGNOSTICADO
DIABETES DEPENDENTE DE INSULINA, FORMA JUVENIL			
DIABETES DEPENDENTE DE INSULINA, FORMA ADULTA			
CONDIÇÕES DA TIREÓIDE (ESPECIFICAR)			
LÚPUS			
ARTRITE REUMATÓIDE			
ESCLEROSE MÚLTIPLA			

9. VOCÊ JÁ TOMOU CORTICÓIDE POR TRÊS MESES OU MAIS, POR ALGUMA RAZÃO?

10. SE SIM, POR FAVOR INDIQUE QUANDO, POR QUE E POR QUANTO TEMPO.

TIPO DE CORTICÓIDE	RAZÃO DE TOMAR CORTICÓIDES	POR QUANTO TEMPO FOI ADMINISTRADO	EM QUE ANOS

11. A SER COMPLETADO PELAS MULHERES PARTICIPANTES DO ESTUDO.

Complete a tabela abaixo, assinalando se você toma algum desses tipos de hormônios ou pílulas anticoncepcionais listados abaixo, a idade que iniciou o uso desses medicamentos, a idade de suspensão dos mesmos, ou se ainda os usa, e por quantos meses ou total de anos (circule meses ou anos) você usou esses hormônios ou anticoncepcionais. Por favor, não inclua o tempo de gravidez, amamentação ou de suspensão do medicamento, por alguma razão.

TIPO DE HORMÔNIO	SIM	NÃO	IDADE EM QUE INICIOU	IDADE EM QUE PAROU	AINDA USA	TOTAL DE MESES/ ANOS
PÍLULA ANTICONCEP.						
IMPLANTES						
INJEÇÕES EX.: PROVERA						
DISPOSITIVO INTRA-ÚTERO						
OUTROS						

GRAVIDEZ

1. VOCÊ JÁ FICOU GRÁVIDA? INCLUA TODOS OS NATIMORTOS, NASCIDOS VIVOS, INSUCESSOS E ABORTOS.
2. COMPLETE A TABELA ABAIXO PARA TODAS AS GRAVIDEZES QUE VOCÊ TEVE, INICIANDO COM SUA PRIMEIRA GRAVIDEZ. INCLUA A DATA DO TÉRMINO DA GRAVIDEZ, DURAÇÃO, SEU GANHO DE PESO E OS EFEITOS DE CADA GESTAÇÃO. SE A GRAVIDEZ RESULTOU EM NASCIMENTO VIVO, PREENCHA O NÚMERO DE BEBÊS NASCIDOS E OS MESES QUE VOCÊ AMAMENTOU.

GRAVIDEZ	DATA TÉRMINO	DURAÇÃO EM MESES	GANHO DE PESO	NATIMORTOS	ABORTO ESPONTÂNEO OU MORTE FETAL	ABORTO INDUZIDO	GRAVIDEZ TUBÁRIA	Nº DE BEBÊS	MESES DE AMAMENTAÇÃO
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									

3. VOCÊ TEVE DIFICULDADES PARA ENGRAVIDAR; VOCÊ TENTOU POR, PELO MENOS 12 MESES OU MAIS ?

4. VOCÊ RECEBEU ALGUM TRATAMENTO POR NÃO SER CAPAZ DE ENGRAVIDAR?

4. COMPLETE A TABELA ABAIXO PARA TODOS OS MEDICAMENTOS QUE VOCÊ TOMOU PARA TENTAR ENGRAVIDAR. ESPECIFIQUE A IDADE QUE VOCÊ COMEÇOU A TOMÁ-LOS E O NÚMERO DE CICLOS QUE VOCÊ TOMOU CADA DROGA. SE VOCÊ NÃO SABE O NÚMERO DE CICLOS, COLOQUE NÃO SEI (NS)

MEDICAMENTO	IDADE INÍCIO	1 A 3 CICLOS	4 A 6 CICLOS	7 A 12 CICLOS	> 12 CICLOS	NÃO SEI
CLOMID						
DANAZOL OU DANOCRINE						
LUPRON (ACETATO DE LEUPROLIDE)						
BROMOCRIPTINE (PARLODEL)						
HMG, PERGONAL MENOTROPIN						
GHRH						
FSH						
SYRANEL E/OU SYNAREL SPRAY NASAL						
OUTROS (ESPECIFIQUE)						

HISTÓRICO DA MENSTRUACÃO

1. QUANTOS ANOS VOCÊ TINHA QUANDO SEU PERÍODO MENSTRUAL COMEÇOU?

2. FORNEÇA AS SEGUINTE INFORMAÇÕES SOBRE SEUS CICLOS MENSTRUAIS DURANTE A IDADE DE 18 AOS 50 ANOS. NÃO INCLUA O TEMPO QUE VOCÊ ESTEVE GRÁVIDA, AMAMENTANDO OU USANDO PÍLULA ANTICONCEPCIONAL OU OUTROS HORMÔNIOS.

<i>IDADE AGRUPADA</i>	<i>NÚMERO MÉDIO DE DIAS DE SANGRAMENTO</i>	<i>NÚMERO MÉDIO DE DIAS ENTRE OS PERÍODOS</i>
18-24		
25-29		
30-34		
35-40		

3. COMO VOCÊ DESCREVERIA SEU CICLO MENSTRUAL?

- a) REGULAR SEMPRE OU QUASE SEMPRE
- b) USUALMENTE REGULAR
- c) NUNCA REGULAR
- d) IRREGULAR, MAS REGULADO COM PÍLULA OU OUTROS HORMÔNIOS

4. VOCÊ JÁ ATINGIU A MENOPAUSA, OU SEJA, SUA MENSTRUACÃO PAROU HÁ, PELO MENOS, 12 MESES?

5. POR QUE SEU PERÍODO PAROU?

- a) MENOPAUSA NATURAL
- b) HISTERECTOMIA (REMOÇÃO DO ÚTERO)- APONTE A RAZÃO DA CIRURGIA
- c) REMOÇÃO DE AMBOS OS OVÁRIOS- APONTE A RAZÃO DA CIRURGIA
- d) QUIMIOTERAPIA PARA O CÂNCER
- e) TRATAMENTO DE RADIAÇÃO
- f) OUTROS (ESPECIFIQUE)

6. QUANTOS ANOS VOCÊ TINHA QUANDO SEU PERÍODO PAROU?

7. DURANTE OS ÚLTIMOS 5 ANOS OU NOS 5 ANOS ANTERIORES À CHEGADA DA MENOPAUSA, VOCÊ SENTIU MUDANÇAS NO SEU CICLO MENSTRUAL, OU SEJA, O NÚMERO DE DIAS DE FLUXO, O TEMPO ENTRE OS PERÍODOS OU O TIPO DE FLUXO? COMPLETE A TABELA ABAIXO.

	NENHUMA MUDANÇA	POUCOS DIAS	MAIS DIAS	MESES VARIADOS	FLUXO INTENSO	FLUXO LEVE
--	-----------------	-------------	-----------	----------------	---------------	------------

Nº DIAS						
TEMPO ENTRE OS PERÍODOS						
TIPO DE FLUXO						

REPOSIÇÃO HORMONAL

1. VOCÊ JÁ USOU ALGUM HORMÔNIO DE REPOSIÇÃO?(NÃO INCLUA PÍLULAS ANTICONCEPCIONAIS OU HORMÔNIOS DE FERTILIDADE)

2. QUAL TIPO(S) DE HORMÔNIO(S) VOCÊ TOMOU OU TOMA?

HORMÔNIOS	IDADE DE INÍCIO	DURAÇÃO	
		MESES	ANOS
PÍLULAS DE ESTROGÊNIO (Premarin, Estrace, Estratab, Ogen,Etc.)			
PROGESTERONA (Progestin, Provera, Megace)			
COMBINAÇÃO DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA (PREMPRO)			
ADESIVO DE ESTROGÊNIO (ESTRADERM)			
ADESIVO DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA COMBINADO			
ESTROGÊNIO E TESTOTERONA COMBINADOS (ESTRATEST)			
ESTROGÊNIO VAGINAL			
SUPOSITÓRIOS DE HORMÔNIO			
TESTOSTERONA			
ESTERÓIDES			
OUTROS (ESPECIFICAR)			
NÃO SABE			

2. SE VOCÊ PAROU DE USAR HORMÔNIOS, QUAL IDADE VOCÊ TINHA AO FAZÊ-LO?

3. QUAL ERA A FREQUÊNCIA DE SEUS PERÍODOS MENSTRUAIS ANTES DE VOCÊ COMEÇAR A TOMAR HORMÔNIOS?
- a) EU NÃO TINHA MENSTRUACÃO POR 12 MESES OU MAIS
 - b) EU TIVE, PELO MENOS UM PERÍODO NOS 12 MESES PRECEDENTES, MAS OS CICLOS ERAM IRREGULARES
 - c) MEUS PERÍODOS ERAM QUASE REGULARES DURANTE OS 12 MESES PRECEDENTES.

OUTROS FATORES

1. VOCÊ USOU ALGUM ANALGÉSICO COM PRESCRIÇÃO OU NÃO, EM ALGUMA FASE DE SUA VIDA, PELO MENOS 3 VEZES POR SEMANA POR UM MÊS OU MAIS? MUITOS DELES SÃO USADOS PARA DOR, ENXAQUECA, ARTRITE, DOR DE ESTÔMAGO OU CÓLICA MENSTRUAL.
2. COMPLETE A TABELA ABAIXO, INDICANDO QUAL ANALGÉSICO VOCÊ TOMOU, SUA IDADE QUANDO COMEÇOU A FAZER USO DELES E O NÚMERO TOTAL DE ANOS QUE VOCÊ O TOMOU. LEMBRE-SE DE MARCAR APENAS AQUELES QUE VOCÊ TOMOU, PELO MENOS 3 VEZES POR SEMANA DURANTE UM MÊS OU MAIS.

MEDICAÇÃO	SIM / NÃO	IDADE DE INÍCIO	POR < DE 1 ANO	POR 2-3 ANOS	POR 4-5 ANOS	POR 6-10 ANOS	POR > 10 ANOS
ASPIRINA (BUFFERIN, AAS)							
ACETAMINOFEN (TILENOL, ANACIN-3, DORICO PANADOL)							
IBUPROFEN (ADVIL, INDOCIN, NAPROSIN)							
FELDENE, LODINE							
<i>OUTROS</i> (ESPECIFICAR)							

PERIODOS INDICADOS. PENSE NA MELHOR E MAIS EXATA MEDIA DE PESO DURANTE CADA PERÍODO SOLICITADO.

ANO	14-19	EM	EM	EM	EM	EM	70
-----	-------	----	----	----	----	----	----

	PASSA DO	ANOS	TORNO 20 ANOS	TORNO 30 ANOS	TORNO 40 ANOS	TORNO 50 ANOS	TORNO 60 ANOS	ANOS
PESO EM KG								

4. QUANDO VOCÊ ENGORDA, ONDE SE LOCALIZA ESSE AUMENTO DE PESO?

- a) QUADRIS E COXAS, PRINCIPALMENTE;
- b) CINTURA E ESTÔMAGO
- c) PEITO E PARTE SUPERIOR
- d) NÁDEGAS
- e) TODAS AS PARTES IGUALMENTE
- f) NUNCA CARREGO PESO EXTRA.

5. QUAL SUA ALTURA SEM SAPATOS?

ATIVIDADE FÍSICA

ATIVIDADES RELACIONADAS AO DIA- A- DIA E AO TRABALHO

1. NO ANO PASSADO, QUANTAS HORAS DIÁRIA EM MÉDIA, VOCÊ GASTOU EM CADA UMA DAS ATIVIDADES ABAIXO?

ATIVIDADE	MÉDIA DE HORAS DIÁRIAS	DIAS POR SEMANA
CAMINHADA ATIVA, SUBIR ESCADAS, TRABALHO VIGOROSO		
CAMINHADA, TRABALHO DOMÉSTICO, JARDINAGEM, TRABALHO MODERADO		
FICAR EM PÉ OU ANDAR NO TRABALHO		
FICAR SENTADO, DIRIGIR, ANDAR DE ÔNIBUS		
DORMIR		

ATIVIDADES FÍSICAS DE LAZER

1. QUANTAS HORAS POR SEMANA OU MESES POR ANO, EM MÉDIA, VOCÊ PASSOU PARTICIPANDO DE EXERCÍCIOS VIGOROSOS DURANTE O PERÍODO REQUERIDO? ATIVIDADES OU EXERCÍCIOS VIGOROSOS FAZEM SEU CORAÇÃO

BATER FORTE E PROVOCAM SUOR (NADAR, AERÓBICA, CORRER, JOGGING, BASKETBALL, PEDALAR DE BICICLETA EM SUBIDAS, ETC...)

IDADE POR GRUPO	MÉDIA DE HORAS POR SEMANA	MÉDIA DE MESES POR ANO
<i>ANO PASSADO</i>		
18-24 ANOS		
25-34 ANOS		
35-44 ANOS		
45 OU MAIS		

2. QUANTAS HORAS POR SEMANA OU MESES POR ANO, EM MÉDIA, VOCÊ GASTOU PARTICIPANDO DE EXERCÍCIOS MODERADOS OU ESPORTES, DURANTE O PERÍODO REQUERIDO? ATIVIDADES MODERADAS INCLUEM CAMINHADAS, GOLFE, VOLEIBOL, TÊNIS RECREATIVO E ANDAR DE BICICLETA EM NÍVEL PLANO.

IDADE POR GRUPO	MÉDIA DE HORAS POR SEMANA	MÉDIA DE MESES POR ANO
<i>ANO PASSADO</i>		
18-24 ANOS		
25-34 ANOS		
35-44 ANOS		
45 OU MAIS		

INFORMAÇÕES SOBRE A ALIMENTAÇÃO

1. VOCÊ ESTEVE EM DIETA NO ÚLTIMO ANO OU ANTES EM DECORRÊNCIA DE ALGUMA DOENÇA?

2. SE SIM, QUAL O TIPO DE DIETA?

PERDA DE PESO ()

CONDIÇÃO MÉDICA ()

VEGETARIANO ()

POUCO SAL ()

POUCA GORDURA OU BAIXO COLESTEROL ()

GANHO DE PESO ()

OUTRA ()

1. VOCÊ TOMOU VITAMINAS NO ÚLTIMO ANO?

2. SE VOCÊ TOMA VITAMINAS MÚLTIPLAS, ELAS CONTÊM:

MINERAIS (ZINCO, FERRO, ETC.) NÃO CONTÊM MINERAIS

NÃO SABE

3. QUAL TIPO E QUANTO DE VITAMINAS VOCÊ TOMA?

TIPO:

QUANTIDADE:

4. QUANTOS ANOS FAZ QUE VOCÊ TOMA VITAMINAS?

5. VOCÊ TOMA VITAMINAS DO TIPO STRESS TAB OU SIMILAR?

QUANTIDADE:

REGULARIDADE:

TEMPO:

6. VOCÊ TOMA VITAMINAS MÚLTIPLAS TIPO TERRAGRAN?

QUANTIDADE:

REGULARIDADE:

TEMPO:

7. VOCÊ TOMA ALGUMA VITAMINA ÚNICA EM SEPARADO ÀQUELAS LISTADAS ANTERIORMENTE?

- VITAMINA A (NÃO BETA-CAROTENO)
- BETA-CAROTENO
- VITAMINA C
- VITAMINA E
- CÁLCIO, DOLOMITA, TUMS, OSCAL-D, OSSOPAN
- SELÊNIO
- ZINCO
- FERRO

8. SEU SUPLEMENTO DE CÁLCIO CONTÉM FERRO?

9. SEU SUPLEMENTO DE CÁLCIO CONTÉM VITAMINA D?

10. SEU SUCO DE LARANJA CONTÉM CÁLCIO?

11. VOCÊ TOMA OUTROS SUPLEMENTOS TAIS COMO ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B COM C, ANTIOXIDANTES, ÓLEO DE FÍGADO, LEVEDO OU OUTROS?

12. VOCÊ COMPRA SUA COMIDA PRONTA?

13. QUÃO FREQUENTEMENTE VOCÊ COME A PELE DO FRANGO?

14. VOCÊ COME A GORDURA DA CARNE?

15. COMO É A CARNE QUE VOCÊ COME?

MAL PASSADA

BEM PASSADA

AO PONTO

16. QUAL O TIPO DE GORDURA OU ÓLEO VOCÊ USA PARA COZINHAR?

17. QUAL O TIPO DE GORDURA VOCÊ ADICIONA À SALADA?

18. QUANTO VOCÊ COME DE SALADA POR DIA, SEMANA OU MÊS ?

19. SEM CONTAR OS SUCOS, QUANTO DE FRUTAS VOCÊ COME POR DIA, SEMANA OU MÊS?

20. QUANTO DE CEREAL VOCÊ COME POR DIA? QUAL É O SEU FAVORITO, OU SEJA O QUE COME MAIS FREQUENTEMENTE?

21. QUANTOS COPOS DE LEITE VOCÊ TOMA POR DIA, SEMANA OU MÊS?

22. QUANDO VOCÊ COME OS ALIMENTOS ABAIXO RELACIONADOS, QUÃO FREQUENTEMENTE ELAS SÃO SEM GORDURA (FAT FREE)?

- QUEIJO
- SORVETE E YOGURT:
- MOLHO DE SALADA/MAIONESE:
- BOLACHAS/ BOLO:
- OUTROS ITENS: ESPECIFIQUE QUAL:

23. QUANDO VOCÊ COME OS ALIMENTOS ABAIXO RELACIONADOS, QUÃO FREQUENTEMENTE ELAS SÃO DE BAIXA CALORIA (LIGHT) ?

- QUEIJO
- SORVETE E YOGURT:
- MOLHO DE SALADA/MAIONESE:
- BOLACHAS/ BOLO:
- OUTROS ITENS: ESPECIFIQUE QUAL:

24. QUANDO VOCÊ COME PEIXE, VOCÊ USA LIMÃO?

25. QUANDO VOCÊ COME BACON, CARNES CURADAS, COMO PRESUNTO, SALAME, ETC..., VOCÊ O FAZ JUNTO COM SUCO DE TOMATE, SUCO DE FRUTA OU CERVEJA?

26. QUANDO VOCÊ BEBE CERVEJA, O FAZ COMENDO CARNE?

27. VOCÊ COME VEGETAIS CRUS OU COZIDOS?

Se for necessária alguma informação adicional no futuro, como podemos contactá-lo? Muito obrigado por sua consideração em dispor de seu tempo para preencher este questionário. Estamos tentando aumentar a qualidade de nossa avaliação. Por favor, indique qualquer problema, comentário ou sugestão que você possa ter, com relação à alguma questão ou item, em particular.

APÊNDICE 3 – Artigo publicado

NUNES, F. T. B.; TAYAR, G.; SOUZA PINHEL, M. A.; VALE BOSSO, R. S.; CONFORTI FROES, N. D. T. A Genética na dependência do cigarro. *Revista Sociedades Brasileiras de Câncer*, n.7, p. 59-70, 2005.