

FRANCINE TERESA BRIONI NUNES

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM
DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL**



1910001406



UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-graduação em Genética

FRANCINE TERESA BRIONI NUNES

AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL

T. 1406/05



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética.

São José do Rio Preto - SP

2005



UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-graduação em Genética

FRANCINE TERESA BRIONI NUNES

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM
DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes

Co-orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

São José do Rio Preto - SP

2005



Nunes, Francine Teresa Brioni.

Avaliação genética de pacientes com degeneração do disco intervertebral / Francine Teresa Brioni Nunes – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

115 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Coluna vertebral - Doenças. 4. Disco intervertebral - Degeneração. 6. Gene VDR. 7. Genes GSTT1-GSTM1. I. Froes, Nívea Dulce Tedeschi Conforti. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.711

FRANCINE TERESA BRIONI NUNES

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM
DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:.....

1º Examinador:.....

2º Examinador:.....

São José do Rio Preto, ____/____/____.



O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-IBILCE/UNESP, campus de São José do Rio Preto e no Núcleo de Pesquisas em Biologia Molecular e Bioquímica da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, sob a orientação da Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes e co-orientação da Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Terezinha e Lécio**,
meu irmão **Giovani** e ao **Fabiano**.



MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

... À Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes, minha iniciadora nos caminhos da pesquisa e mentora deste trabalho, mantendo-se sempre presente com orientação criteriosa e segura, mesmo diante das adversidades inesperadas.

... À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, pela disponibilidade com que aceitou prontamente a co-orientação deste trabalho, durante o período crítico de licença saúde da orientadora, a Profa. Nívea. Agradeço ainda o acolhimento, consideração e amizade.

...Ao Dr. Wilson Fábio Negrelli pela cessão de pacientes e pela análise dos dados clínicos e elucidação de dúvidas.

... Ao Dr Helton Luis Aparecido Defino e seu residente Dr Fabiano T. Canto, do Departamento de Biomecânica, Reabilitação e Medicina do Aparelho Locomotor, da Universidade de São Paulo, câmpus de Ribeirão Preto, pela presteza com que sempre me atenderam, mesmo com o ambulatório sempre lotado.

... 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. Ana Elizabete Silva 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 e colaboração, quando precisei.

... À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, primeira a orientar-me com muita sabedoria e apreço.

... À funcionária do IBILCE Kikuê, e às enfermeiras Gabriela Tayar e Alice pela preciosa contribuição na coleta de amostras de sangue.

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

... Aos pacientes da Clínica do Dr. Negrelli, em São Paulo, que participaram do estudo cedendo as amostras, indispensáveis para a realização do trabalho e aos funcionários Iza, Daniel, Sívia e Railda.

... À Giulliana Tayar e Marcela Pinhel pela ajuda indispensável e amizade sincera.

... Aos amigos e companheiros de laboratório Carolina Barros, Rosa Maria do Vale Bosso, Vivian Ferreira, Fernanda Toledo, Fernanda Barbosa, Marcelo Nakazone, Rafael Piteri e Jean Tosta pela ajuda, e pelas horas agradáveis que passamos juntos.

... Às colegas de Pós- Graduação, Juliana, Natália, Márcia, Tatiana e Marília.

... À Unesp e a Famerp pela oportunidade.

... Ao CNPq pelo incentivo financeiro.

...À minha querida família por toda a dedicação e amor. Ao Fabiano pela paciência, companheirismo e amor. À Ba, pelo cuidado e carinho durante tanto tempo. Ao Teco por me divertir sempre.

...À Deus por me fazer quem sou.

"Olhe esta janela:
ela é apenas um buraco na parede,
mas por causa dele
a sala inteira está iluminada."

Chuang Tzu

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	02
I. Considerações Gerais	02
II. Caracterização do Disco Intervertebral	03
II.1 Processo Degenerativo do Disco Intervertebral	07
III. A Genética na Degeneração Discal	10
III.1. Polimorfismo do Gene Receptor da Vitamina D na Degeneração Discal	11
IV. Fatores Ambientais na Degeneração do Disco Intervertebral	16
IV.1. Hábito de Fumar	16
IV.1.1 Biometabolismo dos Componentes do Cigarro	19
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
I. Casuística	26
II. Método	26
II.1 Avaliação dos Pacientes	26
II.2 Genotipagem	29
II.2.1 Extração de DNA	29
II.2.2 Polimorfismo do VDR- <i>Fok I</i>	29
II.2.3 Polimorfismos de GSTT1 e GSTM1	30
II.2.4 Análise Estatística	33
RESULTADOS	35
I. Frequências Alélicas e Genotípicas para VDR, GSTT1 e GSTM1	35
II. Antecedentes Pessoais	38
III. Associação entre Antecedentes Pessoais e Polimorfismos VDR, GSTT1 e GSTM1	39
IV. Dados Clínicos e Genotipagem para VDR- <i>Fok I</i> , GSTT1 e GSTM1	41
V. Associação entre os Polimorfismos VDR- <i>Fok I</i> e GSTT1/M1	43
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
RESUMO	67
ABSTRACT	69
APÊNDICE 1	71
APÊNDICE 2	73
APÊNDICE 3	83
APÊNDICE 4	101



INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

I.Considerações Gerais

As doenças que afetam os sistemas muscular e esquelético acometem centenas de milhões de pessoas no mundo e estão entre as causas mais comuns de invalidez e sofrimento crônico. Elas compreendem as lesões nos ossos, articulações, músculos, ligamentos, tendões e nervos periféricos.

Essas condições patológicas figuram como as principais responsáveis pela liderança no número de consultas médicas e serviços de pronto atendimento, quando comparadas às outras enfermidades. Apesar da gravidade dos fatos, é real a falta de atenção, por parte da comunidade médica, mídia e autoridades governamentais com relação a elas. Embora, todos os setores da sociedade estejam passíveis de apresentar uma dessas doenças, há a percepção errônea de que elas sejam menos sérias do que outras, em consequência de sua menor fatalidade (Cats-Baril, 1996).

As lombalgias figuram entre as lesões musculares e esqueléticas de maior prevalência, sendo uma das causas mais freqüentes de absenteísmo no trabalho, gerando conseqüentemente perda de produtividade nos países industrializados. Quatro entre cinco adultos apresentarão um episódio de dor nas costas em suas vidas e em muitos casos, esses eventos são graves e não melhoram, a menos que seja administrado tratamento específico. É importante ressaltar que 5% do total desses casos conduzem à invalidez permanente, com enorme prejuízo em diferentes níveis, haja vista a necessidade de pagamento de salários e benefícios, bem como a substituição e treinamento de mão de obra especializada. (National Council on Compensation Insurance, 1991; Lawrence *et al.*, 1998; National Safety Council, 2000). Apesar da incidência dessas lesões não ter se alterado com o tempo, as taxas de



invalidez têm demonstrado um aumento definido nos últimos vinte anos (McGeary et al., 2004).

Os supostos fatores causais para lombalgias incluem várias estruturas espinais e processos patofisiológicos, tais como ruptura do anel fibroso, irritação da raiz nervosa por compressão ou efeitos bioquímicos de exposição do núcleo pulposo, mudanças neuropáticas e inflamação das células nervosas que enervam os tecidos. Contudo, o disco intervertebral destaca-se como a estrutura de maior interesse, uma vez que sua degeneração pode influenciar uma variedade de estruturas e processos que se acredita serem participativos na origem da dor (Videman & Battié, 1999; Adams, 2004). A partir disso, o processo discogênico degenerativo tem sido estudado amplamente, pela sua importância nas algias da coluna vertebral (Setton & Chen, 2004).

II. Caracterização do Disco Intervertebral

A coluna vertebral do homem é constituída de vértebras, ligamentos, músculos e discos intervertebrais. Os discos intervertebrais permitem o movimento de cada par de vértebras, além de desempenharem importantes funções de amortecimento, como resposta às pressões sofridas pela coluna na sustentação de peso.

Ao longo da coluna, os discos variam de forma e espessura e se apresentam em formato de cunha nas regiões cervical e lombar. As curvaturas côncavas existentes nessas regiões permitem que a coluna exerça, com precisão, suas funções de flexibilidade e elasticidade. A densidade celular do disco é extremamente baixa, de aproximadamente 6.000 células/mm³ em adultos. Essas células, responsáveis pela manutenção e remodelamento dos componentes do tecido, vão sendo perdidas ao longo do processo de envelhecimento (Hunter *et al.*, 2003).



Em cada uma das articulações observam-se três partes, ou seja, a cartilagem hialina das placas terminais que recobrem as superfícies opostas de cada corpo vertebral, a parte central do disco e a periférica. A central é composta por um material viscoso, semelhante a um gel, chamado núcleo pulposo, enquanto a parte periférica é composta de anéis de fibras colágenas, denominada anel fibroso (Figura 1) (Boos *et al.*, 2002).

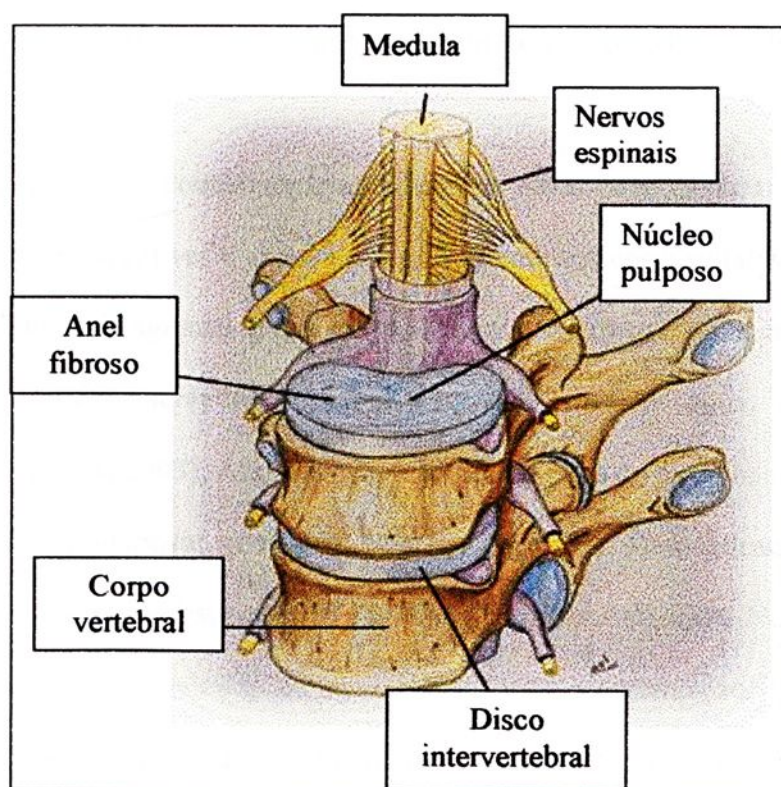


Figura 1. Características do disco intervertebral (modificado de <http://www.discherniation/spinehealth.images.html>).

O disco intervertebral é uma estrutura biológica complexa, composto de abundante matriz extra-celular de proteoglicanos e colágeno. Os proteoglicanos são proteínas que possuem uma modificação pós-traducional típica, o glicosaminoglicano (GAG). Diferentes proteoglicanos podem carregar desde uma única cadeia de GAG até centenas delas (Kreis

& Vale, 2000), sendo que as cadeias laterais de glicosaminoglicanos promovem alta concentração de cargas negativas, que resultarão na propriedade de compressão e resistência da cartilagem (Horton *et al.*, 1998). O anel fibroso consiste principalmente de colágeno I, enquanto o núcleo pulposo é constituído por cerca de 50% de proteoglicanos, principalmente o agrecan e 20% de colágeno II. Ambos contêm pequenas quantidades de colágeno IX (Annunen *et al.*, 1999). Os proteoglicanos criam um ambiente hidrofílico levando à retenção de fluído e ao entumescimento do núcleo pulposo (Bhatia & Wang, 2003).

A matriz do disco contém aproximadamente 65 a 80% de água, devido à alta densidade de cargas negativas e cátions dos grupos carboxílicos e sulfatos das cadeias de glicosaminoglicanos do agrecan. Esses cátions e ânions, resultam em alta pressão osmótica no núcleo do disco intervertebral, capacitando-o a absorver água, constantemente (Eisenstein & Roberts, 2003). Assim sendo, a hidrodinâmica do disco resulta da estrutura em gel do núcleo pulposo, conferida pela presença dos proteoglicanos (Figura 2), permitindo que o mesmo absorva nove vezes o seu volume de água. Nenhuma ligação química influencia esse conteúdo de água, dessa forma a sustentação de peso causa a diminuição de 1% da altura média em um dia (De Pukey 1935; apud Cox, 2002).

De modo geral, com os movimentos de extensão, flexão e curvatura lateral, os corpos vertebrais deslizam sobre o núcleo pulposo túrgido, que se comporta como um ponto de apoio esférico. O núcleo pulposo não possui nervos, tampouco vasos sanguíneos, sendo sua nutrição efetuada por meio da difusão do líquido intersticial, ao longo de minúsculos canais situados nas placas cartilaginosas terminais dos corpos vertebrais (Melrose *et al.*, 2003). Por ser elástico, o núcleo é resistente às lesões e, visto que ocupa cerca da metade da área da superfície do disco, suporta a carga vertical, enquanto o anel fibroso o faz para a carga



tangencial (Salter, 2001). Constantemente, o disco encontra-se submetido a uma pressão devida à posição adotada entre dois corpos vertebrais. Essa pressão será maior ou menor, dependendo da postura executada pelo indivíduo e à sobrecarga a pesos adicionais a que a coluna está exposta.

Na verdade, o modelo biomecânico da coluna do homem não foi construído para permanecer longo período na posição sentada, mantendo posturas estáticas fixadas e realizando movimentos repetitivos (Battié *et al.*, 1995). Isso explica porque a degeneração do disco é uma doença musculoesquelética comum, que afeta cerca de 5% da população e caracteriza-se principalmente pela herniação do disco (Ala-Kokko, 2002).

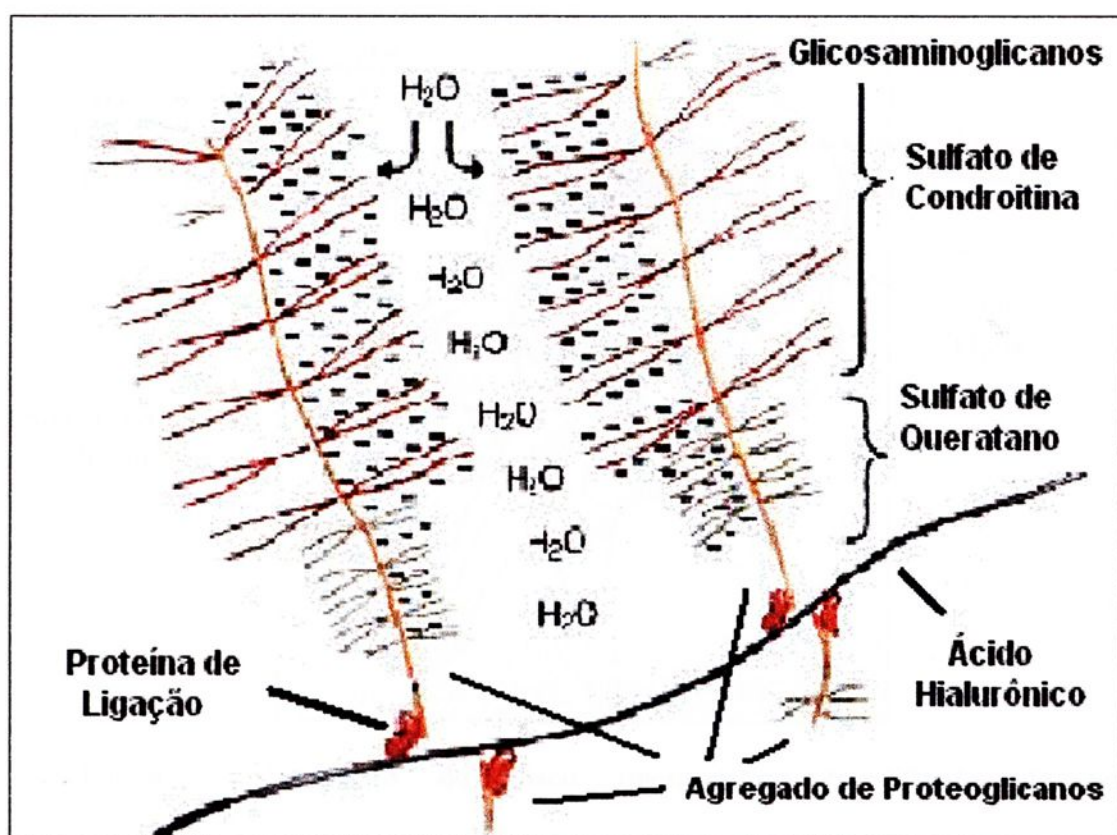


Figura 2. Proteoglicanos com numerosas cadeias de glicosaminoglicanos gerando um ambiente altamente hidrofílico (modificado de Salter, 2001)

II.1 Processo degenerativo do disco intervertebral

O disco pode perder seu poder higroscópico, gerando um processo de desidratação progressiva, caracterizando a discopatia (herniação, abaulamento, protrusão, alterações artríticas, diminuição da altura). Em consequência da perda da sua natureza de distribuir cargas concêntricas, é possível haver a ruptura do anel fibroso. Desse modo, o núcleo pulposó poderá extravasar-se, originando a hérnia do disco, classificada de acordo com o grau de migração desse através da ruptura no anel fibroso (Figura 3). A partir da degeneração do disco intervertebral, a coluna passa a ter instabilidade segmentar progressiva.

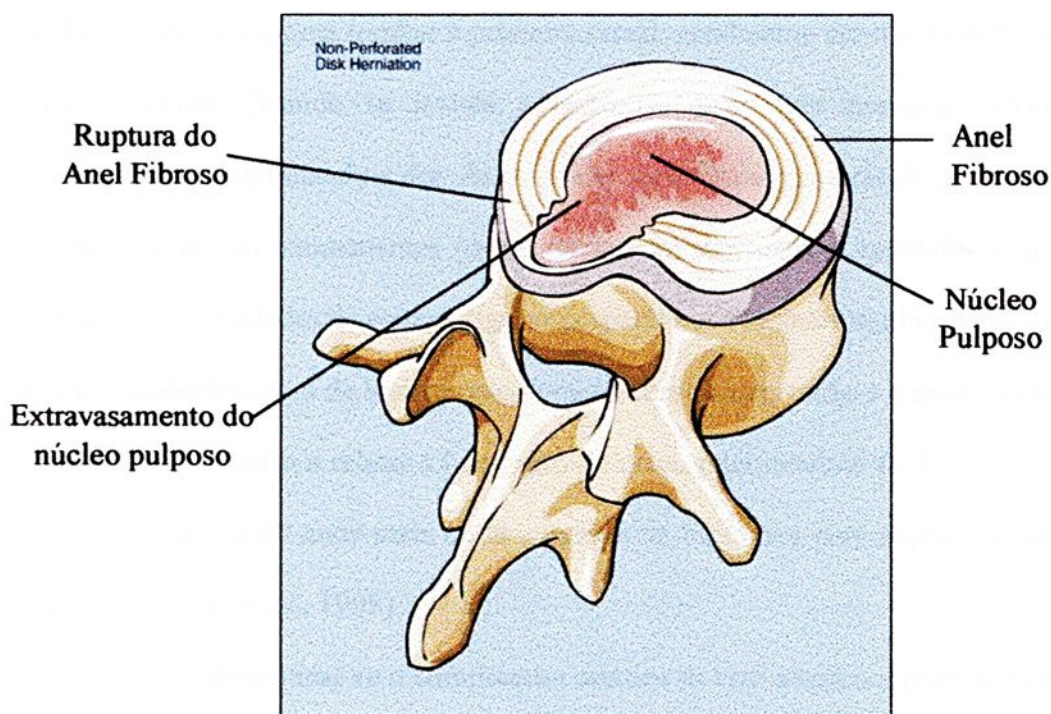


Figura 3. Herniação do disco intervertebral (modificado de <http://www.ultrazonix.com/links/images.html>)

Esses processos reduzem a estrutura discal, ocasionando maior aproximação entre os corpos vertebrais adjacentes, mecanismo que gera o pinçamento. Todos eles determinam a formação da unidade vertebral dolorosa, que ocasiona crises álgicas periódicas (Seymour, 1991). A evolução da degeneração conduz ao estreitamento ou estenose do canal e ou do forame de conjugação, comprimindo o saco dural e a raiz nervosa (Hietala *et al.*, 2003). A reação de defesa, a esse fenômeno de desmoronamento da coluna vertebral, é realizada pela formação do osteófito, vulgarmente conhecido como “bico de papagaio”, que tem a finalidade de aumentar a base de sustentação vertebral, visando a estabilidade do segmento lesado (Oishi *et al.*, 2003).

A localização mais suscetível da extrusão do disco é entre a quarta e quinta vértebras lombares e entre a quinta lombar e primeira sacral, geralmente ocorrendo entre os 30 e 40 anos de idade. Quando se instala a lesão no disco, um processo inflamatório é desencadeado, ocasionando a dor. As causas agravantes das rupturas discais relacionam-se aos micro e macro traumatismos (respectivamente, movimentos repetidos e quedas, por exemplo), deformidades da coluna, rigidez corporal nos sedentários, obesidade, hipotonia e flacidez muscular, além de fatores psicológicos como a depressão e o estresse (Wallach *et al.*, 2003). O primeiro a relatar a herniação do disco intervertebral foi Lusckka, em 1858, sendo que apenas 80 anos mais tarde surgiram as hipóteses para explicar o mecanismo dessa lesão (Lotz *et al.*, 1998).

A fim de determinar se a compressão estática *in vivo* altera a atividade biológica do disco, diminuindo o desempenho bioquímico, Lotz *et al.* (1998) demonstraram que a resistência compressiva estática inicia respostas lesivas, que depende da desorganização do anel fibroso, do aumento da apoptose e da queda de regulação na expressão dos genes agrecan e colágeno II. Embora ainda não estejam esclarecidos os mecanismos responsáveis,

pelos quais as alterações de tensão no tecido levam à apoptose, os resultados sugerem que a manutenção da tensão apropriada dentro do disco, pode ser base importante para aliviar a degeneração discal e iniciar seu reparo.

Contudo, não se conhece ainda, a precisa etiologia da discopatia. Sabe-se que diversos fatores, como envelhecimento, estresse, modificações bioquímicas e alterações genéticas estão envolvidos, todos gerando mudança na composição e característica do disco, que conduzem ao desequilíbrio funcional dessa estrutura (Bhatia & Wang, 2003).

Estudos realizados em autópsias têm mostrado que as rupturas do anel fibroso, a desidratação do núcleo pulposo e formação de fissuras na cartilagem superficial de cada corpo vertebral são os primeiros sinais macroscópios que caracterizam a degeneração discal (Natarajan *et al.*, 1994). Em um estudo conduzido por Gruber e Hanley (2003), em que foram avaliadas modificações celulares do disco durante o envelhecimento, confirmou-se que a cartilagem entre os corpos vertebrais sofria calcificação, ou seja, sua composição era substituída por osso, ao longo do tempo. Ao nível bioquímico, a diminuição do conteúdo de proteoglicanos reflete o desequilíbrio entre catabolismo e anabolismo das células do núcleo pulposo. De modo secundário, a diminuição de síntese aumenta o colapso, tendo como consequência, a desidratação do núcleo pulposo, alterando a hidrostática normal e as propriedades bioquímicas do disco (Wallach *et al.*, 2003).

A discogênese, até há pouco tempo era atribuída exclusivamente ao acúmulo de efeitos ambientais, primariamente agressões e traumas, hábitos de vida, tabagismo, aterosclerose, acrescido das mudanças que ocorrem na estrutura do disco, com o envelhecimento. Todavia, pesquisas mais recentes demonstram que esses efeitos influenciam moderadamente a degeneração discal, o que reforça a importância da participação dos fatores genéticos na patogênese da doença (Videman *et al.*, 1998;



Videman & Battié, 1999). Apesar disso, a progressão natural da degeneração determinada geneticamente pode ser modificada, em certo grau, pelo modo de vida e ambiente (Battié *et al.*, 2004).

III. A Genética na Degeneração Discal

Estudos recentes de agregação familiar e com gêmeos monozigóticos sugerem que a discogênese pode ser explicada sob o enfoque genético (Ala-Kokko, 2002). A herdabilidade associada ao componente genético no desenvolvimento da doença foi de 74% nos indivíduos afetados (Battié *et al.*, 2004). Dados anteriores já haviam confirmado a determinação genética da maioria dos casos de degeneração discal (Battié *et al.*, 1995 ; Sambrook *et al.*, 1999), obtida pela comparação dos exames de imagem, por ressonância magnética da coluna cervical e lombar, de gêmeos monozigóticos e dizigóticos. A herdabilidade encontrada em gêmeos monozigóticos foi de 74% e 73%, respectivamente, para os sinais degenerativos encontrados na coluna lombar e cervical. Em outro estudo semelhante, observou-se herdabilidade de 68% nos gêmeos monozigóticos e 58% nos dizigóticos (MacGregor *et al.*, 2004).

Hestbaek *et al.* (2004) estudaram a prevalência de dores lombares em gêmeos dinamarqueses, com idade variando entre 12 a 41 anos, com relação à influência genética, concluindo também sobre sua significativa participação na predisposição a tais dores. Com respeito aos estudos de agregação familiar, Matsui *et al.* (1998) evidenciaram que a história familiar de pacientes submetidos à cirurgia de hérnia de disco implicava significativamente no aparecimento da doença. De modo similar, outros estudos também identificaram associações entre a doença e hereditariedade. Postacchini *et al.* (1998) investigaram filhos, pais e familiares de 284 pacientes com dores lombares discogênicas, concluindo que 41%



deles apresentavam dois ou mais membros da família afetados com problemas análogos, resultados esses corroborados pelos de Richardson *et al.* (1997) e Simmons *et al.* (1996).

A herniação discal é o processo mais comum de degeneração que conduz à intervenção cirúrgica. A maioria dos problemas no disco intervertebral ocorre em adultos, sendo relatados poucos casos infantis. Villarejo-Ortega *et al.* (2003) constataram que três entre nove pacientes operados apresentavam história familiar positiva de doenças discogênicas. Quando pacientes adolescentes com hérnia de disco foram comparados com um grupo controle, verificou-se que 32% deles tinham histórico da doença na família, em contraposição aos 7% dos indivíduos saudáveis (Varlotta *et al.*, 1991). Matsui *et al.* (1998) e Leboeuf (2004) verificaram também, forte influência genética da doença em seus pacientes jovens.

III.1. Polimorfismo do gene receptor da vitamina D na degeneração discal

Vários polimorfismos genéticos têm sido relacionados à predisposição no desenvolvimento precoce de diversos processos degenerativos em homens e mulheres. Destaca-se, dessa forma, a importância do componente genético como fator de risco nas discopatias. Define-se polimorfismo genético como um traço mendeliano que existe numa população em no mínimo dois fenótipos, nenhum dos quais ocorrendo em frequência menor que 1% (Saiki *et al.*, 1988). Dentre os polimorfismos envolvidos nos processos podem ser citados os que envolvem os genes para agrecan, colágeno tipo IX, matriz metaloproteinase-3 e receptor da vitamina D (Jones *et al.*, 1998; Videman *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 2002; Petteri *et al.*, 2001; Videman *et al.*, 2001; Soloviera *et al.*, 2002; Hietala *et al.*, 2003; Kales *et al.*, 2004).



Destacam-se dois tipos de vitamina D reconhecidos como vitamina D₂ (ergocalciferol), encontrada em alimentos e suplementos vitamínicos e vitamina D₃ (colecalciferol), produzida na pele quando os raios ultravioletas são absorvidos pela molécula precursora 7-diidrocolesterol (Ogunkolade *et al.*, 2002). No fígado, a vitamina D₃ é hidrolizada pela enzima 25-hidroxilase, gerando a 25-hidroxicolecalciferol, que no rim é hidrolizada pela 1 α -hidroxilase surgindo assim, a forma ativa da vitamina D, a 1 α ,25-diidroxicolecalciferol ou 1 α ,25-diidroxivitamina D, que apresenta um tempo de vida de apenas poucas horas no organismo. O receptor da vitamina D (VDR) se liga às várias formas de colecalciferol, porém sua afinidade pela 1 α ,25-diidroxicolecalciferol é, aproximadamente, mil vezes maior em comparação com a 25-hidroxicolecalciferol (Holick, 1999).

A 1 α ,25 diidroxivitamina D [1 α ,25-(OH)₂D₃] é necessária para o crescimento e diferenciação celulares em vários tecidos, além de participar do processo de mineralização do osso, absorção de cálcio do intestino, controle do cálcio, homeostase de fósforo e regulação do hormônio paratireóideo (Crofts *et al.*, 1998). Adicionalmente, não só há evidências do seu papel na diferenciação, proliferação e maturação das células cartilaginosas, como também de sua influência na síntese de proteoglicanos, através dos condrócitos articulares (Kawaguchi *et al.*, 2002). No sistema imune, promove a diferenciação de monócitos e inibe a proliferação de linfócitos e secreção de citocinas, com possível efeito antiproliferativo em diferentes tipos de cânceres (Uitterlinden *et al.*, 2004).

Corvol *et al.* (1981) verificaram a interação entre as células cartilaginosas e o metabolismo *in vitro* da vitamina D, constatando que os condrócitos isolados em cultura eram capazes de transformar 25-hidroxicolecalciferol em 24, 25-diidroxicolecalciferol.



Apesar da atividade, tanto do $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$, quanto do $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ no metabolismo celular dos condrócitos, somente a forma $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula a síntese de proteoglicanos nos condrócitos maduros, enquanto a forma $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ atua no aumento da atividade da DNA polimerase durante a fase logarítmica da divisão celular dos condrócitos. Desse modo, pode-se afirmar que o $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula a rápida proliferação de condrócitos, ficando a estimulação de sua diferenciação sob o domínio da $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Takigawa *et al.*, 1988).

A capacidade da cartilagem em metabolizar $1\alpha,25$ -dihidroxicolecalciferol, por meio da cultura de células cartilaginosas articulares foi igualmente confirmada por Garabedian *et al.* (1978). O fato de encontrar os metabólicos da vitamina D_3 nas culturas de células cartilaginosas sugere seu importante papel na fisiologia desse tecido cartilaginoso (Boyan *et al.*, 2002).

A presença de sítios específicos de receptores nucleares da vitamina D foi constatada nas células condrocíticas (Haussler *et al.*, 1980; Corvol *et al.*, 1981; Bhalla *et al.*, 1987; Klaus *et al.*, 1991). Tanto a forma $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$, quanto a $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ tem seus efeitos mediados por esses receptores (Greising *et al.*, 1997). Sendo assim, a expressão dos receptores de vitamina D e o efeito da vitamina D na proliferação de condrócitos constituem função de destaque na homeostase do tecido cartilaginoso (Klaus *et al.*, 1991).

O receptor da vitamina D (VDR) é um membro da superfamília dos receptores nucleares de hormônios que regulam a transcrição. Dentre alguns membros, destacam-se os receptores de esteróides e de ácido retinóico (RXR) (Whitfield *et al.*, 2001). Tais receptores contêm um domínio de ligação a esteróides, outro de interação com membros da superfamília de receptores e um terceiro domínio de ligação ao DNA, que contém dois



motivos *zing fingers* localizados na porção N-terminal da proteína (Kerkhof, 1995; Ray *et al.*, 1999).

A vitamina D₃ [1 α ,25-(OH)₂D₃] é lipossolúvel, e ao entrar na célula interage prontamente com seu receptor (VDR). Após a ativação do VDR pela ligação com a vitamina D₃, esse receptor pode, isoladamente ou na forma de heterodímeros com vários outros receptores da superfamília, em particular com RXR, ligar-se à sequência regulatória específica, presente nos promotores de genes responsivos à vitamina D (Miyamoto *et al.*, 1997; Jensen, *et al.*, 1998; Whitfield *et al.*, 2001). Essa sequência específica de DNA, à qual o heterodímero VDR/RXR se liga, é conhecida como elemento responsivo à vitamina D (VDREs). O VDREs é constituído de dois hexanucleotídeos separados por três pares de bases (Holick, 1999). Após a formação do heterodímero, ocorre o recrutamento do fator transcricional IIB (TFIIB) e cofatores transcricionais; com a interação do heterodímero ao sítio específico de DNA inicia-se a transcrição (Figura 4) (Jurutka *et al.*, 2001).

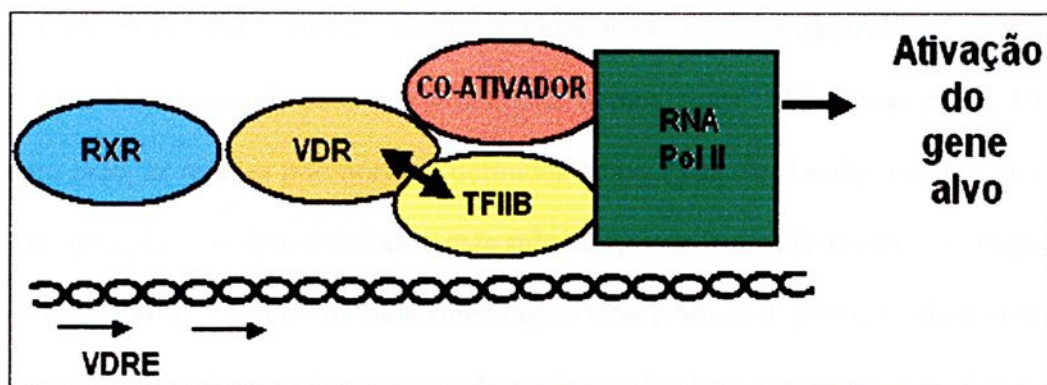


Figura 4. Atuação da vitamina D na ativação da transcrição de um gene alvo, por meio do complexo molecular múltiplo.

O VDR, por meio da ação da $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, gera efeitos pleiotrópicos que são atribuídos à ampla distribuição desse receptor em quase todos os tecidos, bem como sua capacidade de modular a expressão de diferentes genes em tipos celulares específicos (Miyamoto *et al.*, 1997). Esse caráter pleiotrópico da vitamina D tem estimulado a investigação dos polimorfismos existentes no gene do receptor da vitamina D, a fim de associá-los ao risco de surgimento de certas doenças (Uitterlinden *et al.*, 2004). Nesse aspecto, o VDR tem sido amplamente investigado, como um dos genes envolvidos na degeneração do disco intervertebral. Ele está localizado no cromossomo 12 humano, região centromérica e início do braço longo (12cen-q12), contendo 14 exons e, possuindo, aproximadamente, 75 kilobases de DNA genômico. Os exons IA até IF, os exons II e III codificam para as regiões de domínio de ligação ao DNA e os exons IV a IX para a região de união ao ligante (Zmuda *et al.*, 2000).

O cDNA do VDR foi clonado em 1988 e dez anos depois, Miyamoto *et al.* (1997) descreveram a maior parte de sua estrutura genômica. O sequenciamento do gene revelou uma série de polimorfismos, com diferentes implicações fisiológicas. Por exemplo, o sítio descrito como *BsmI*, no *intron* localizado entre os *exons* 8 e 9 está envolvido com a redução da densidade mineral óssea nos indivíduos homozigotos “bb” (Gross *et al.*, 1998). Por outro lado, as regiões polimórficas definidas como *ApaI*, *TaqI* estão localizadas na região 3' do gene. O loco *ApaI* é definido pela substituição de T para G no *intron* 8, enquanto que o *TaqI* no *exon* 9 é definido pela substituição silenciosa de T para C (Gelder *et al.*, 2000). Ambos estão relacionados com a discogênese lombar, osteoartrose e diminuição da densidade mineral óssea (Videman *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 2002).

Um outro polimorfismo do gene VDR, o *FokI*, resulta da alteração no sítio iniciador



da transcrição localizado no exon 2 . Esse sítio é altamente conservado em camundongos, ratos e humanos, sugerindo que o polimorfismo no exon 2 do *VDR* pode afetar a função da proteína VDR (Arai *et al.*, 1997). O *VDR* tem dois sítios iniciadores da transcrição (sítio ATG), sendo que no polimorfismo *Fok* 1 ocorre uma substituição de timina por citosina no primeiro sítio ATG. Desse modo, o sítio iniciador do gene com o polimorfismo ACG passa a ser o segundo códon ATG, gerando uma proteína com três aminoácidos a menos que a normal (Harris *et al.*, 1997). O alelo F é designado para a ausência do primeiro sítio iniciador ATG, portanto, a tradução começará no segundo sítio, gerando a proteína mais curta. No alelo designado f, isso não ocorre, originando assim uma proteína de tamanho normal. De acordo com alguns estudos, o alelo f pode ser menos ativo no sistema de células transfectadas (Chen, *et al.*, 2002). Além do mais, a isoforma codificada pelo alelo f induz significativamente menor transativação no promotor do gene, comparada à do alelo F (Zmuda *et al.*, 2000). Em suma, a transição de T para C no polimorfismo *FokI* no gene humano do receptor da vitamina D resulta na síntese de uma proteína menor em três aminoácidos (alelo F), que apresenta atividade biológica aumentada. Em vista disso, estudos recentes demonstram que o alelo f está associado com a degeneração discal (Videman *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 2002).

IV. Fatores Ambientais na Degeneração do Disco Intervertebral

IV.1. Hábito de fumar

Há muito se sabe do efeito devastador que o hábito de fumar exerce sobre os inúmeros órgãos do corpo humano, ocasionando doenças cardiovasculares, pulmonares, cérebro-vasculares, vasculares periféricas, gastrintestinais, estando associado também à etiologia de diferentes tipos de tumores. A partir disso, tem crescido o interesse, entre os

especialistas de coluna, com relação à participação do cigarro na osteoporose, fratura de vértebras, dores lombares e degeneração do disco intervertebral (Slosar *et al.*, 2002; McGeary *et al.*, 2004).

O hábito de fumar induz estresse bioquímico em diversos tecidos. Tal estresse faz parte dos componentes ambientais que contribuem para a nutrição e circulação sanguínea alterada no disco, provocando a doença discogênica. Além dele, há o estresse dinâmico que envolve as atividades pesadas, os erros de postura e as lesões acidentais e, ainda, o estresse fisiológico envolvido com o processo de envelhecimento (Oda *et al.*, 2004).

Dentre os componentes químicos de maior toxicidade do tabaco, encontram-se a nicotina, o benzopireno e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A fase gasosa contém monóxido de carbono, acetaldeído, acetona, metanol, óxidos nítricos, nitrosaminas, amônia, benzeno e formaldeído (Oktenoglu *et al.*, 2002). Os hidrocarbonetos aromáticos conduzem às lesões endoteliais, enquanto o monóxido de carbono diminui a capacidade das hemácias no transporte de oxigênio. Não obstante, ocorre aumento de catecolaminas, resultando em vasoconstrição, limitando ainda mais o suprimento de oxigênio aos tecidos e gerando danos às vértebras e ossos (Slosar *et al.*, 2002).

O disco intervertebral é um tecido avascular, em que os nutrientes necessários para seu metabolismo são provenientes da difusão dos vasos sanguíneos presentes ao seu redor. Esse sistema de entrega de nutrientes se dá por duas rotas. Em uma delas, a rota anular, a difusão ocorre pelos vasos sanguíneos localizados próximos ao anel fibroso. A segunda rota consiste de botões vasculares compostos de capilares e células mesenquimais dispostos abaixo das placas vertebrais (Iwahashi *et al.*, 2002). A nicotina, que se caracteriza por ser um fluido alcalóide altamente solúvel e de baixo peso molecular, pode então entrar facilmente no disco, através de difusão e, assim exercer seus efeitos citotóxicos.



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).

Iwahashi *et al.* (2002) verificaram em ratos tratados com nicotina necrose do núcleo pulposo, desequilíbrio no padrão de sobreposição das lâminas do anel fibroso, redução no número de botões vasculares, hipertrofia das células endoteliais vasculares e diminuição do lume vascular. Em outro estudo, com culturas de células isoladas do núcleo pulposo, constatou-se que, além da nicotina diminuir a vascularização do disco, também promoveu o decréscimo da produção de glicosaminoglicanos e expressão do gene do colágeno tipo II. Tais resultados permitiram mostrar que essa substância contribui diretamente para o processo degenerativo, por meio de sua ação nas células do núcleo pulposo (Kim *et al.*, 2003).

Mohammed *et al.* (2004) avaliaram o efeito do tabaco na proliferação celular e produção da matriz extracelular do núcleo pulposo de células bovinas. O conteúdo normal de colágeno no núcleo do disco consiste de altas concentrações de colágeno tipo II e quantidade mínima de colágeno tipo I. No processo degenerativo, observou-se que nas células tratadas, houve a substituição do colágeno tipo II, pelo I. Outros aspectos relacionados à degeneração foram relatados, como diminuição do número de células do núcleo pulposo, além da redução no conteúdo de glicosaminoglicanos.

A reação das citocinas é outro fator importante que implica nos processos degenerativos. Segundo Oda *et al.* (2004), ratos forçados a inalar compostos gerados por 20 cigarros diários, num total de oito semanas, apresentaram aumento da produção de citocinas, que culminou com aparecimento do processo inflamatório nos discos e inibição



da síntese de proteoglicanos e colágenos. Microscopicamente, foi observada ruptura do anel fibroso, além da tendência do aumento e arredondamento dos condrócitos do disco, comparados às células normais, o que sugere a influência do anel fibroso na forma dos condrócitos.

Afora o conhecimento do mecanismo de ação, as evidências epidemiológicas vêm adicionar provas de que fumantes crônicos sofrem de degeneração precoce do disco intervertebral, possuindo vértebras menos resistentes, além de apresentarem avanço da desmineralização óssea, que pode acelerar o desenvolvimento de osteoporose (Oktenoglu *et al.*, 2002). Em suma, o hábito de fumar parece estar envolvido com degeneração do disco intervertebral, como importante fator de risco para a doença em humanos.

IV.1.1 Biometabolismo dos componentes do cigarro

Até o momento foram identificados mais de 3.800 compostos químicos na fumaça do cigarro, sendo que desses, pelo menos 40 são carcinogênicos, destacando-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), as aminas aromáticas e as N-nitrosaminas (Schooten *et al.*, 1998).

Os HAPs fazem parte de uma classe importante de poluentes ambientais, que possuem ação mutagênica e ou carcinogênica (Bartsch, 2000). Os HAPs são provenientes de materiais particulados, gerados pela queima de plantações, da fumaça do cigarro, da combustão do carvão, dos motores de veículos e da produção de coque (Van Houdt, 1990).

Os HAPs bem como aminas aromáticas, N-nitrosaminas, drogas farmacológicas, agentes quimioterápicos e radicais livres gerados pelo estresse oxidativo são ativados ou inativados durante as fases do biometabolismo, sendo que em cada uma delas participam enzimas específicas (Miller *et al.*, 2003 e Abbas *et al.*, 2004). As enzimas oxidativas da



fase I são compostas, principalmente, pela super família do citocromo P-450 (CYPs), responsáveis pela ativação de compostos químicos diversos, tornando-os eletrofilicos (Miller *et al.*, 2003).

As enzimas de fase II, por sua vez, interagem com os produtos ativados na fase I, pela conjugação do grupo funcional desses produtos com um substrato endógeno solúvel em água (glutatião, sulfato, glicose, acetato), por meio da ação das glutatião-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs). Dessa maneira, os metabólitos são transformados em compostos hidrofílicos, passíveis de excreção (Nebert *et al.*, 1996).

Diferenças individuais na capacidade de resposta aos compostos genotóxicos e carcinogênicos estão ligadas à presença de polimorfismos das enzimas metabolizadoras de xenobióticos, sendo que essa variabilidade interdividual desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças (Nebert *et al.*, 1996; Perera & Weinstein, 2000; Schoket *et al.*, 2001; Stucker *et al.*, 2002).

Dentre as enzimas de fase II, as GSTs desempenham um papel predominante nos processos de destoxificação, tanto pela conjugação com as glutatião, como pela ligação não covalente com vários agentes xenobióticos. As glutatião S-transferases (GSTs) podem ser encontradas na maioria dos organismos vivos, incluindo as formas inferiores tais como bactérias, fungos e plantas. No homem encontram-se sete classes geneticamente distintas de GSTs, das quais duas estão ligadas à membrana plasmática e cinco se encontram no citosol da célula, como as alfa (α), mi (μ), pi (π), theta (θ) e kappa (κ) (Taningher *et al.*, 1999; Geisler & Olshan, 2002). Dentre essas, as mais estudadas são as GSTM1(μ) e GSTT1(θ).



O gene *GSTT1* está localizado no cromossomo 22 humano e é polimórfico. Pode ocorrer sua deleção homozigota, resultando no genótipo nulo (*GSTT1* 0/0), cuja frequência depende da origem étnica. Strange & Fryer (1999) relataram que 60% dos asiáticos, 40% dos africanos e 20% dos caucasianos não expressam essa enzima.

O gene que codifica para a isoforma *GSTM1* está localizado no cromossomo 1 humano e se expressa em vários tecidos, principalmente no fígado (Jayasurya *et al.*, 2002). Ele é polimórfico na população, apresentando quatro variantes alélicas, *GSTM1* *A, *B, *C, e *0. As duas primeiras não apresentam diferenças com relação ao tipo de substrato, enquanto o alelo *C é extremamente raro e a variante *0, que é o alelo nulo, acarreta a falta da atividade enzimática, quando em homozigose (Pavanello & Clonfero, 2000). Dessa maneira, a presença de pelo menos, um alelo funcional é suficiente para que a enzima atue desempenhando seu papel.

A variação nucleotídica na região codificadora de um gene leva à substituição de aminoácidos na proteína, que poderá alterar a atividade enzimática. Por outro lado, a deleção de toda a região codificadora pode gerar a enzima inativa (Mac Leod *et al.*, 1997). A substituição de uma única base (C para G) no códon 173 do gene *GSTM1* irá resultar nos dois alelos variantes *GSTM1* *A e *GSTM1* *B. (Geisler & Olsham, 2002).

O genótipo *GSTM1* nulo acomete cerca de 50% da população caucasóide (Taningher *et al.*, 1999) e apresenta uma variação de 30 a 70% para diferentes grupos étnicos (Seidegard & Pero, 1985, Bell *et al.*, 1992). Rossit *et al.* (2002) mostraram frequências de 47,3% e 18,5% para os genótipos homozigotos nulos dos genes *GSTM1/T1* nas populações do Sudeste e Norte do Brasil, respectivamente.

Hirvonen *et al.* (1994) mostraram que indivíduos fumantes que herdaram genótipo *GSTM1* nulo apresentaram na urina maior quantidade de substâncias mutagênicas,



comparados aos indivíduos fumantes com genótipo *GSTM1* positivo. Isso demonstra que a eficiência na desativação de xenobióticos e toxinas endógenas resultam na prevenção da integridade celular e inibição de eventos citotóxicos que levam a várias doenças (Wilkinsom & Clapper, 2002). Em indivíduos, em que ambos os genes encontram-se deletados, é esperada redução na capacidade de destoxificação desses metabólicos reativos, resultando, assim, em um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças relacionadas à exposição a xenobióticos (Conforti-Froes *et al.*, 1997).

As mutações no DNA mitocondrial, resultantes do acúmulo de adutos, aumentam o número de células deficientes no processo de fosforilação oxidativa, especialmente em tecidos pós-mitóticos que requerem energia como o cérebro, coração e músculo esquelético. Assim sendo, as GSTs atuam de forma relevante no processo de envelhecimento, bem como na etiologia de uma variedade de doenças degenerativas (De Flora, 1996).

A doença discogênica não tem sua etiologia totalmente esclarecida. Como se não bastasse, os pacientes dela acometidos sofrem muitas vezes, com dores crônicas. Há ainda que se considerar o ônus que a doença causa aos cofres públicos, em decorrência do alto índice de absenteísmo no trabalho e a aprovação de aposentadoria para indivíduos em idade produtiva. Para que seja empreendido um melhor tratamento, é necessário estudar os seus determinantes mais dominantes, que parecem ser os genéticos, em busca de alterações genéticas ou polimorfismos que tenham maior efeito na doença. Isso permitirá, além da adoção de medidas preventivas, a possibilidade do delineamento de medicação individualizada e, portanto, mais eficaz e específica.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Foram objetivos do presente trabalho:

1. identificar os polimorfismos no gene para receptor da vitamina D (*VDR*) e gene codificador das glutatíon S-transferases M1 e T1 (*GSTM1* e *GSTT1*) em pacientes com degeneração do disco intervertebral e grupo controle;
2. associar os polimorfismos descritos acima com os achados obtidos pela ressonância magnética e clínicos, história familiar e idade do surgimento da doença, bem como com fatores antropométricos (sobrepeso), ocupacionais (postura) e ambientais (hábito de fumar);
3. relacionar fatores antropométricos, ocupacionais, ambientais e história familiar da doença discogênica entre pacientes e controles.



MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

I. Casuística

Foram estudados 66 pacientes (38 homens e 28 mulheres), não relacionados e triados de uma clínica especializada em coluna na cidade de São Paulo, SP. Todos os pacientes eram caucasóides, com idade variando entre 16 e 62 anos (média de idade de 38 anos), apresentando diagnóstico clínico, por ressonância magnética (RM), positivo de discopatias, com ou sem hérnias discais associadas na coluna vertebral. Foram excluídos os indivíduos com alterações discais comprovadamente resultantes de traumas anteriores, história de trabalho em carregamentos de peso, esforço em excesso, utilização de máquinas vibratórias ou relacionado com atividades de impacto. Os pacientes foram pareados com 88 indivíduos caucasóides, de 16 a 57 anos de idade (média de 41 anos), sendo 35 homens e 53 mulheres, clinicamente sem relatos de queixas de dor lombar e ciática. Estes últimos foram triados da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e da 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. (Apêndice 1).

II. Método

Os participantes foram submetidos à coleta de sangue periférico e responderam a um questionário detalhado sobre atividades esportivas e ocupacionais, tipo de alimentação, hábitos de vida, além de fornecerem medidas antropométricas para cálculo de índice de massa corpórea (IMC) [peso (Kg)/ altura² (m)] (Apêndice 2).



II.1 Avaliação dos Pacientes

A avaliação dos pacientes foi realizada pelo Dr. Wilson Fábio Negrelli, médico especializado em doenças da coluna, da Clínica de Ortopedia e Traumatologia localizada em São Paulo. A análise consistiu de anamnese, história familiar para doenças da coluna, exame físico e por meio de imagem de RM da coluna. Da RM foram extraídas informações, denominadas sinais das lesões no disco intervertebral, como presença de abaulamento, protrusão e herniação, intensidade do sinal, altura, rompimento do anel fibroso e núcleo pulposo, lesões artríticas e degradação dos ligamentos. Entende-se por abaulamento, protrusão e herniação, os graus de saliência do disco intervertebral fora do seu espaço em relação ao corpo vertebral; intensidade do sinal, a alteração na coloração do disco, variando de cinza claro até preto, estando o escurecimento ligado ao processo de desidratação ou degeneração; altura como o parâmetro do processo degenerativo, sendo a diminuição de altura relacionada ao avanço desse processo; rompimento do anel fibroso e núcleo pulposo como o extravasamento do conteúdo do núcleo, através das rupturas do anel (herniação); e lesões artríticas como a degeneração das articulações. As figuras 5 e 6 ilustram os sinais de degeneração avaliados nos pacientes.

O grau de intensidade da doença foi identificado de acordo com a classificação de Scheneider modificada (Kawaguchi *et al.*, 2002). Nesse caso o Grau 1 foi caracterizado como a presença de 1 a 3 dos sinais acima (nenhum paciente demonstrou menos do que 2 sinais); Grau 2, com 4 ou 5 sinais e Grau 3 apresentando 6 ou 7 sinais de degeneração no disco.

Do mesmo modo, foram atribuídos níveis para a gravidade da doença, sendo o Nível 1 e 2, respectivamente, para a presença da lesão em 1 ou mais segmentos da coluna.



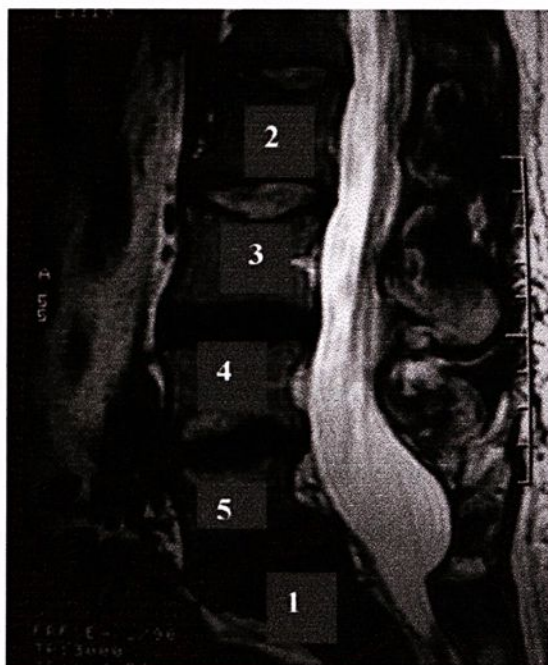


Figura 5. Imagem por ressonância magnética da coluna em corte sagital, mostrando discopatias nos níveis L3-L4, L4-L5 e L5-S1, traduzido pelo escurecimento dos discos nesses níveis (discos pretos), comparado à cor cinza clara em L1- L2 e L2-L3. Os discos cinzas claros possuem alta intensidade de sinal, em contraposição aos inferiores, com baixa intensidade de sinal. Observa-se ainda, diminuição da altura do disco entre L4-L5.

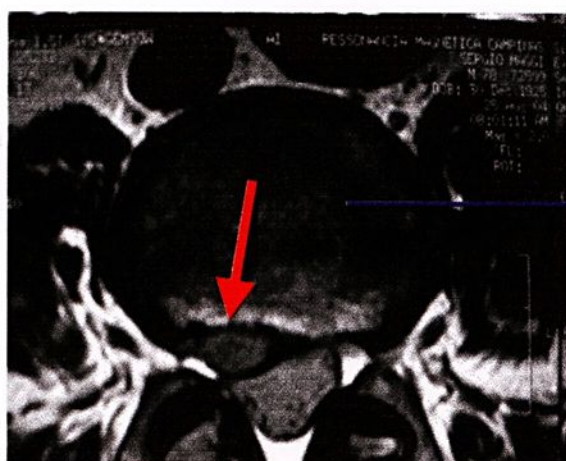


Figura 6. Imagem por ressonância magnética, ao nível do disco intervertebral em corte axial, mostrando herniação (seta vermelha).

II.2 Genotipagem

II.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). 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 dodeciltrimetilamonio) 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 inclui lavagem do DNA com 100µL de CTAB a 5% (brometo 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.



II.2.2 Polimorfismo do VDR-*Fok I*

A amplificação do seguimento polimórfico do gene VDR-*FokI* ocorreu pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A detecção do polimorfismo *FokI* 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 foram as seguintes: 94°C por 30 segundos para desnaturação do DNA, temperatura para anelamento de 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos durante 35 ciclos de extensão. Os produtos gerados foram digeridos pela enzima *FokI* 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). A visualização de bandas se deu sob luz ultra-violeta e as imagens registradas por câmera fotográfica Polaroid.

O genótipo homozigoto 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. Nestas condições classifica-se o genótipo homozigoto ff. Sendo assim, o genótipo heterozigoto Ff contém três bandas: uma de 265 pb, outra de 196pb e a última com 69 pb (Figura 7).



II.2.3 Polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1*

Os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* foram detectados pela amplificação gênica por meio da reação em cadeia da polimerase (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. A mistura de reação foi promovida com 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 a concentração de 200ng/50µL. O material foi processado em termociclador automático, 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) (Figura 8).



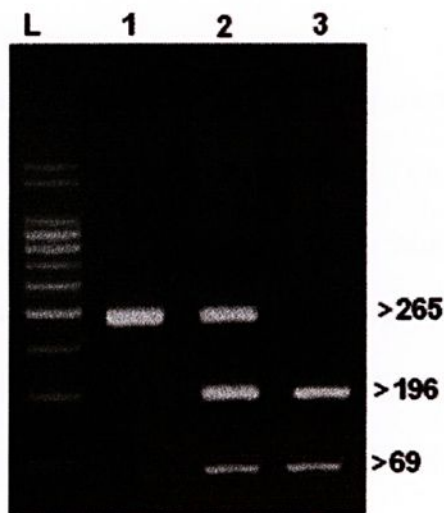


Figura 7: Perfil de bandas eletroforéticas em gel de agarose 2 % com amostras de DNA submetidas a análise de polimorfismo de fragmento de restrição do gene receptor da vitamina D por restrição enzimática com *FokI*. A coluna de número 1 corresponde ao genótipo FF; número 2 ao genótipo Ff, e número 3 ao genótipo ff. A letra L designa o marcador de tamanho molecular (100pb Ladder, Fermentas).

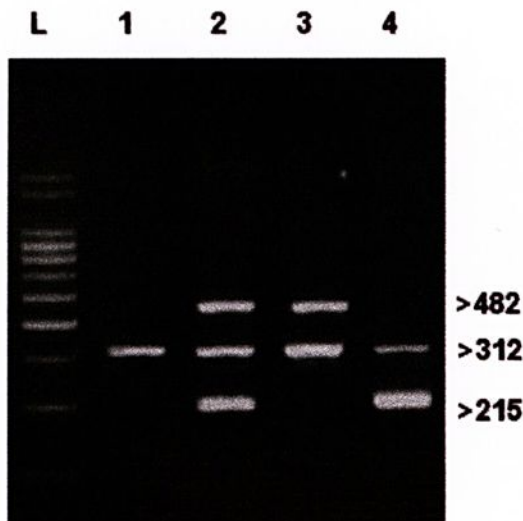


Figura 8: Perfil de bandas eletroforéticas em gel de agarose 2 % com amostras de DNA submetidas a análise dos polimorfismo genéticos *GSTT1* e *GSTM1*. A coluna de número 1 corresponde aos genótipos nulos de *GSTT1/M1* (0/0); número 2 aos genótipos presentes (+/+); número 3 ao genótipo *GSTT1* presente (+/0); e 4 ao genótipo *GSTM1* presente (0/+). A letra L designa o marcador de tamanho molecular (100pb Ladder, Fermentas).

II.3 Análise estatística

A análise de regressão logística foi utilizada para examinar a associação entre as características hábito de fumar, IMC, história familiar e os polimorfismos no gene VDR, e GSTT1/M1. Tais características individuais também foram comparadas pela análise de variância. A relação dos genótipos com os diferentes graus de degeneração discal (1, 2 ou 3) foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças entre as frequências dos polimorfismos estudados e os níveis de lesão da doença (1 ou 2 níveis) foram calculadas pelo teste exato de Fisher. O teste t foi utilizado para a associação entre a média de idade do surgimento da doença com os genótipos e outros fatores de risco. Para a comparação entre os níveis e graus da gravidade da doença, genótipos e hábitos de vida utilizaram-se os testes de Fisher ou Qui-quadrado. Os resultados finais foram compreendidos em um intervalo de confiança de 95% e o valor-P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.



RESULTADOS

RESULTADOS

I. Frequências Alélicas e Genóticas para *VDR*, *GSTT1* e *GSTM1*

A Tabela 1 apresenta a distribuição das frequências alélicas e genóticas para o gene *VDR* em pacientes com doença discogênica e seus respectivos controles. A frequência do alelo F foi significativamente maior nos controles (0,85), enquanto o alelo f nos pacientes (0,46; $P=0,0001$). O genótipo FF destacou-se nos controles (69,3%), com relação aos pacientes (13,6%; $P=0,0001$), enquanto o genótipo Ff mostrou-se significativamente mais frequente nos pacientes (81,8%; $P=0,0001$).

De acordo com a Tabela 2, que contém as frequências genóticas para *GSTT1* e *GSTM1*, observa-se que pacientes e controles não diferiram quanto à presença (+/+) e ausência (0/0) do gene *GSTT1* ($P=0,84$). O mesmo ocorreu para o genótipo *GSTM1* ($P=0,14$).



Tabela 1: Distribuição das frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo VDR-*FokI* em pacientes com degeneração discal e controles.

Alelo	Paciente		Controle		p*
	N	frequência	N	frequência	
F	72	0,54	149	0,85	0,0001
f	60	0,46	27	0,15	
Total		1,00		1,00	
Genótipo	N	%	N	%	
FF	09	13,6	61	69,3	0,0001
Ff	54	81,8	27	30,7	0,0001
ff	03	4,6	0	0	0,0767
Total	66	100	88	100	

*Teste exato de Fisher; N= número de indivíduos.

Tabela 2: Frequências genotípicas para os polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com degeneração discal e controles.

Genótipos	Paciente		Controle		P*
<i>GSTT1</i>	N	Frequência%	N	Frequência%	
+/+	52	78,80	71	80,70	0,84
0/0	14	21,20	17	19,30	
Total	66	100,00	88	100,00	
<i>GSTM1</i>					
+/+	35	53,00	58	65,90	0,14
0/0	31	47,00	30	34,10	
Total	66	100	88	100	

*Teste exato de Fisher; N= número de indivíduos ;+/+:gene presente; -/-: gene ausente

II. Antecedentes Pessoais

A dor lombar ou hérnia discal foi citada como história familiar, preferencialmente pelos pacientes quando comparada ao grupo controle (78,8% ; 34,1%, respectivamente, $P < 0,001$, Tabela 3). As demais características, como tabagismo e sobrepeso foram semelhantes entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos antecedentes pessoais de pacientes com degeneração discal e controles.

Antecedentes Pessoais	Paciente		Controle		P*
	N	Frequência %	N	Frequência%	
Hábito de fumar	20	30,3	15	17,0	0,055
Sobrepeso**	10	15,5	21	23,9	0,224
História Familiar	52	78,8	30	34,1	<0,001

*Teste = regressão logística; ** Sobrepeso: IMC=25 a 30kg/m².



III. Associação entre Antecedentes Pessoais e Polimorfismos *VDR*, *GSTT1* e *GSTM1*

A Tabela 4 mostra a relação entre polimorfismo *VDR-FokI* com tabagismo, sobrepeso e história familiar em pacientes e controles. A frequência de pelo menos um alelo *f* (*_f*) analisada em conjunto com história familiar positiva apresentou-se significativamente aumentada nos pacientes (90%) comparado aos controles (0%; $P<0,001$). Por outro lado, a frequência aumentada do genótipo *FF* prevaleceu nos pacientes tabagistas (80%) comparada aos controles (40%; $P<0,001$).

Tabela 4: Polimorfismos genéticos para *VDR-FokI* e antecedentes pessoais em pacientes com degeneração discal e controles.

Antecedentes	Paciente				Controle				P*
	F/F		_f		F/F		_f		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Hábito de fumar	16	80,0	4	20,0	6	40,0	9	60,0	<0,001
Sobrepeso**	1	10,0	9	90,0	18	85,7	3	14,3	0,688
História Familiar	3	10,0	27	90,0	30	100,0	0	0,0	<0,001

*Teste = regressão logística; ** Sobrepeso: IMC= 25 a 30 Kg/m².

Em relação à idade de surgimento da doença, verificou-se média de idade significativamente maior nos pacientes com genótipo *FF* (38 anos, $\pm 11,9$) comparado aos pacientes com genótipo *_f* (26 anos, $\pm 10,2$; $P= 0,013$). Quando esta característica foi associada à história familiar a média de idade de aparecimento da doença para os indivíduos com alelo *FF* foi de 33 anos ($\pm 10,7$), superior, portanto, à daqueles com alelo *-f* que



apresentaram média de 26 anos ($\pm 10,5$). De modo similar, a média de idade quando a doença iniciou-se em indivíduos sem histórico familiar, portadores do alelo FF (41 anos, $\pm 13,3$), foi superior aos indivíduos -/f (28 anos, $\pm 7,8$) (Tabela 5).

Tabela 5: Relação entre idade de surgimento da doença e história familiar em pacientes com degeneração discal.

Genótipo VDR	Surgimento da doença (idade-anos)					
	Geral	DP***	Presença de HF**	DP***	Ausência de HF**	DP***
FF	38	11,9	33	11,7	41	13,3
-/f	26	10,2	26	10,5	28	7,8
P*		0,013		0,025		

P*=Teste-t;** História Familiar(HF);*** Desvio Padrão (DP)

A Tabela 6 mostra a relação entre os genótipos positivos para *GSTT1/M1* (+/+) e a nulidade para pelo menos, um dos genes (-/0 e /ou 0/-) com o tabagismo, sobrepeso e história familiar. Como é possível observar, não foram encontradas diferenças significantes entre genótipos e antecedentes pessoais em pacientes e controles.



Tabela 6: Gene *GSTT1/MI* e antecedentes pessoais em pacientes com degeneração discal e controles.

Antecedentes	Paciente				Controle				P*
	+/+		0/0		+/+		0/0		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Hábito de fumar	7	35,0	13	65,0	9	60,0	6	40,0	0,162
Sobrepeso**	4	40,0	6	60,0	11	52,4	10	14,6	0,704
História Familiar	23	44,2	29	55,8	18	60,0	12	40,0	0,251

*Teste = regressão logística: **Sobrepeso: IMC= 25 a 30 Kg/m². +/+:presença dos genes (*GSTT1* e *GSTM1*); 0/0:ao menos um dos genes com nulidade (/_/0 e/ou 0/_/).

IV. Dados Clínicos e Genotipagem para *VDR-FokI* , *GSTT1* e *GSTM1*

A Tabela 7 apresenta a relação dos genótipos para *VDR-FokI* dos pacientes com grau de gravidade e nível de lesão analisados pela ressonância magnética. Os genótipos com pelo menos um alelo f (/_/f) mostraram associação com o grau crescente de gravidade para a degeneração discal (28,8%) quando comparado ao genótipo FF (0,0%; P=0,0012), o que não ocorreu para os níveis da lesão.

Não houve associação entre ausência de pelo menos um dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e aumento de gravidade ou níveis em que a lesão ocorreu na coluna vertebral (Tabela 8).

Tabela 7: Relação entre Polimorfismo VDR-*FokI*, gravidade da degeneração discal e nível de lesão analisados pela ressonância magnética.

Genótipo	Gravidade*						Nível de lesão**			
	1		2		3		1		2	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
F/F	4	7,7	26	50,0	0	0,0	4	7,7	2	3,9
_/f	4	7,7	3	5,8	15	28,8	15	28,8	31	59,6

P*=0,0012 (teste de Mann-Whitney); P**=0,175 (teste de Fisher)

Tabela 8: Relação entre Polimorfismos *GSTT1/MI*, gravidade da degeneração discal e nível de lesão analisados pela ressonância magnética.

Genótipo	Gravidade*						Nível de lesão**			
	1		2		3		1		2	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
+/+	0	0,0	15	28,9	5	9,6	7	13,5	13	25,0
0/0	8	15,4	14	26,9	10	19,2	12	23,0	20	38,5

P*=0,3248 (teste de Mann-Whitney);P**=0,855 (teste χ^2); +/+:presença dos genes (*GSTT1* e *GSTM1*); 0/0:ao menos um dos genes com nulidade (_/0 e/ou 0/_).

V. Associação entre os Polimorfismos VDR-FokI e GSTT1/M1

A Tabela 9 apresenta a relação dos genótipos para VDR-FokI com GSTT1 e GSTM1 presentes (+/+) e nulos (0/_ e/ou _/0). Os genótipos com pelo menos um alelo f (-/f) para VDR-FokI associaram-se com frequência significativamente maior com a ausência de pelo menos um gene GSTT1 ou GSTM1(52,1%) comparado aos controles(19,3%;P<0,001).

Tabela 9: Associação dos polimorfismos genéticos para VDR-FokI e GSTT1/M1 em pacientes com degeneração discal e controles

Genótipos <i>GSTT1/M1</i>	Paciente				Controle				P*
	F/F		_/f		F/F		_/f		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
+/+	4	6,0	23	34,9	37	42,0	10	11,4	<0,001
0/0	4	6,0	35	52,1	24	27,3	17	19,3	

*Teste = regressão logística. +/+:presença dos genes (GSTT1 e GSTM1); 0/0:ao menos um gene com nulidade (_/0 e/ou 0/_).



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo expressam a existência de fatores genéticos na predisposição à degeneração do disco intervertebral. Trata-se de pesquisa pioneira na população brasileira, focalizando a participação de polimorfismos genéticos na doença discogênica. A distribuição alélica e genotípica para o polimorfismo *FokI* do gene receptor da vitamina D discrimina pacientes e controles, visto que a frequência significativamente aumentada do alelo *f* em pacientes com degeneração discal (0,46) destacou-se em relação a dos controles (0,15). O genótipo *Ff* esteve presente na maioria dos indivíduos afetados pela doença (81,8%), enquanto no grupo controle houve predomínio do homozigoto dominante *FF* (69,3%).

A frequência dos genótipos para *VDR-FokI* nas populações oscila entre os diferentes grupos étnicos, com frequências de *FF* variando de 28% a 35%, *Ff* de 48% a 50% e *ff* de 14 a 17% em brancos ou caucasóides com idade entre 20 e 62 anos (Harris *et al.*, 1997; Videman *et al.*, 1998; Zofkova *et al.*, 2003). Por outro lado, em negros destaca-se o genótipo *FF* (66%), seguido de *Ff* (31%) e *ff* (4%) (Harris *et al.*, 1997). Os valores para o grupo controle no presente estudo são concordantes (69,3%; 30,7% e 0,0%, respectivamente), podendo neste caso, explicar-se a baixa frequência encontrada para o alelo *f* como devida à casuística reduzida, acrescida da grande e real miscigenação da população brasileira.

Videman *et al.* (1998) apontam uma relação direta entre o aumento do grau degenerativo discal com a presença de cada alelo *f*. Com base nisso, indivíduos portadores do genótipo *ff* mostraram-se mais afetados, seguidos em ordem decrescente pelos de genótipos *Ff* e *FF*. Esses autores avaliaram os sinais degenerativos, como hérniação,



abaulamento, protrusão, intensidade do sinal e redução da altura do disco, por ressonância magnética, em indivíduos amostrados aleatoriamente. Foi constatado que tais sinais eram 4,3% e 9,3% mais graves nos indivíduos com genótipos Ff e ff, respectivamente, comparados àqueles com genótipo FF. De maneira concordante, neste estudo, o alelo f mostrou-se em associação com grau maior de degeneração, quando comparado ao alelo F ($P=0,0012$).

A degeneração é um processo natural decorrente do envelhecimento e é traduzida pelas transformações implacáveis que afetam todas as estruturas da unidade espinhal. A degeneração discal está associada com mudanças bioquímicas, seguidas de alterações macroscópicas, incluindo rupturas e fissuras, que podem culminar com a herniação do disco, principal causa de radiculopatia (Benoist, 2003). A razão em que ocorrem essas mudanças deletérias varia entre os indivíduos, sendo devida às diferenças genéticas, bioquímicas e nutricionais (Roughley, 2004). No entanto, o surgimento desse processo em pacientes jovens sugere mais fortemente, a influência de componentes genéticos (Battié *et al.*, 2004). Tal associação decorre do fato de que, nesses indivíduos, o disco intervertebral se expõe a fatores de risco ambiental, por um período inferior comparado aos indivíduos mais velhos (Kawaguchi *et al.*, 2002).

Neste estudo, há confirmação dessa associação, visto que a idade de aparecimento dos primeiros sinais da doença foi inferior nos pacientes portadores de genótipo Ff ou ff (média de $26 \pm 10,2$ anos), considerando-se o polimorfismo VDR-FokI, enquanto a média nos pacientes com genótipo FF foi de $38 \pm 11,9$ anos. Interessante ressaltar que, além dos pacientes com alelo f serem acometidos de modo mais precoce pelos sinais degenerativos, a história de doença discogênica na família dos pacientes apresentou perfil semelhante.



Quando se relacionou essa característica com história familiar dos pacientes e ainda, associada à presença do alelo f, a média de idade do surgimento da doença foi menor ($26 \pm 10,5$ anos) nos pacientes com história familiar positiva, enquanto a média de idade dos indivíduos sem história familiar de degeneração discal foi de $33 \pm 11,7$ anos ($P = 0,025$).

Assim sendo, a presença da doença discogênica na família foi observada na maioria dos pacientes do grupo de estudo (78,8%), ao contrário dos controles, em que essa frequência apresentou-se diminuída (34,9%). Do total desses pacientes com história familiar positiva, 27% tinham o alelo f, enquanto que nenhum dos indivíduos do grupo controle apresentou tal alelo, mesmo com história da doença na família. Desse modo, nossos achados reforçam a grande importância da genética na predisposição à degeneração discal.

Vários estudos têm sugerido a presença de componentes genéticos na doença do disco intervertebral, especialmente, como fator do seu aparecimento em jovens e adolescentes (Varlotta *et al.*, 1991; Matsui *et al.*, 1998; Postacchini *et al.*, 1998; Villarejo-Ortega *et al.*, 2003; Lebouf *et al.*, 2004). Nesse contexto, gêmeos monozigóticos e dizigóticos mostraram alto grau de similaridade entre eles, quanto às alterações degenerativas (Scapinelli, 1993; Battié *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 1997; Sambrook *et al.*, 1999; Simmons *et al.*, 1999; Battié *et al.*, 2004; Hestbaek *et al.*, 2004; MacGregor *et al.*, 2004).

A contribuição do polimorfismo VDR *Fok I* para a doença pode ser explicada pela modificação estrutural da proteína VDR devido à alteração no sítio iniciador da transcrição do exon 2. O alelo F não tem o primeiro sítio iniciador ATG, portanto, a transcrição começa no segundo sítio, gerando uma proteína mais curta em três aminoácidos. Ao contrário, isso não ocorre com o alelo f, conseqüentemente, a proteína resultante é de

tamanho normal. Jurutka *et al.* (2000) mostraram que o alelo menor com 424 aminoácidos (alelo F) interage de forma mais eficiente com fator de transcrição TFIIB, levando-os a concluir que o alelo menor apresenta maior potência transcricional, fato confirmado também por Colin *et al.* (2000), Chen *et al.* (2002) e Uiterlindem *et al.* (2004). A razão na diferença de atividade dessas duas proteínas parece relacionada à alteração na sua capacidade de ligação à forma ativa da vitamina D para, posteriormente, associarem-se ao receptor do ácido retinóico (RXR) e ao elemento responsivo à vitamina D (VDRE) e, finalmente, ativar a transcrição (Arai *et al.*, 1997). Dessa maneira, a adição de três aminoácidos na proteína do receptor da vitamina D é passível de modificar todo o complexo de ação da vitamina D, resultando em falha no processo transcricional.

A vitamina D está envolvida na diferenciação, proliferação e maturação das células cartilaginosas e influencia na síntese de proteoglicanos através dos condrócitos articulares (Kawaguchi, *et al.*, 2002). Além disso, há constatação de que a vitamina D3 está envolvida na proliferação e crescimento celular, pela estimulação do fator de crescimento dependente de insulina I (IGF-I) e seu receptor (Krohn *et al.*, 1997). Reconhecidamente, a vitamina D3 ativa o promotor de genes alvos, através do complexo de múltiplas moléculas. Existe a hipótese de que a vitamina D3 ativa o promotor do gene IGF-I, localizado próximo ao gene para o receptor da vitamina D. O IGF-I é expresso no tecido do disco intervertebral e estimula a síntese de proteoglicanos nas células do núcleo pulposo (Kawaguchi *et al.*, 2002). Sendo assim, as alterações na expressão dos receptores de vitamina D prejudicarão a homeostase do disco intervertebral.

Apesar do fator genético estar sendo apontado como de grande influência no processo de degeneração discal, outros fatores parecem influir nas modificações do metabolismo normal do disco (Videman e Battié, 1999; Battié *et al.*, 2004). Dentre eles, podem ser



citados os fatores ambientais, representados pelas atividades físicas e ocupacionais, além dos hábitos de vida (tipo de dieta e fumo), entre outros.

Em muitos países, os problemas de coluna têm sido definidos como lesões ocupacionais e sob essa óptica passaram a ser de alto custo para as seguradoras. A crença que suporta esse modelo é a de que a doença discogênica, principal suspeita dos sintomas de dor na coluna, resultaria em primeira ordem de fatores mecânicos que danificam suas estruturas. No entanto, Videman e Battié (1999) depois de pormenorizada análise sobre o fator ocupacional na degeneração do disco intervertebral, concluíram que ele explica somente uma pequena proporção da doença. Nossos achados parecem estar de acordo com esse raciocínio, uma vez que não foi encontrada associação entre as atividades ocupacionais dos pacientes com os sinais positivos de degeneração.

Um outro fator ambiental, o sobrepeso, tem sido associado em muitos estudos epidemiológicos com problemas de coluna (Bostman *et al.*, 1994; Kangas *et al.*, 2003; Bejjani *et al.*, 2004). A obesidade é comum entre os pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas, entre elas, a remoção do disco herniado. Entretanto, Leboeuf (2000), realizando pesquisa de revisão sobre o assunto verificou 21 dentre 65 estudos mostraram associação positiva entre o sobrepeso/obesidade e problemas de coluna. Do mesmo modo, nossos achados também não confirmam tal associação, uma vez que não foram encontradas diferenças significantes da comparação entre pacientes e controles, quando considerada essa característica. Esse mesmo resultado permaneceu ainda, quando se comparou a presença do alelo f com o sobrepeso em pacientes e controles ($P=0,688$).

O hábito de fumar é outro fator de risco que se soma à lista de elementos suspeitos de terem efeitos deletérios sobre o disco intervertebral. Várias investigações têm documentado a crescente incidência de dores lombares e ciáticas, bem como a degeneração discal em



fumantes crônicos, comparada com indivíduos não fumantes (Battié *et al.*, 1991; Livshits *et al.*, 2001; Iwahashi *et al.*, 2002; Slosar *et al.*, 2002; Mohammed *et al.*, 2004). Experimentos efetuados em células isoladas do núcleo pulposo constatarem que os componentes do cigarro, além de diminuírem a vascularização do disco, promovem tanto o decréscimo da produção de glicosaminoglicanos, como a expressão do gene do colágeno tipo II. Tais resultados permitiram mostrar que essas substâncias contribuem diretamente para o processo degenerativo, por meio de sua ação nas células do núcleo pulposo (Kim *et al.*, 2003). Outros aspectos relacionados à degeneração foram relatados, como a diminuição do número de células do núcleo pulposo (Oda *et al.*, 2004). Como consequência da modificação no conteúdo de glicosaminoglicanos, o núcleo pulposo desidrata, alterando a hidrostática normal do disco e conseqüentemente, suas propriedades amortecedoras (Wallach *et al.*, 2003).

Nossos resultados mostraram que frequências significativamente aumentadas de FF e reduzida de -/f foram observadas preferencialmente, nos pacientes fumantes, comparadas aos controles. Neste caso, percebe-se que esses pacientes, mesmo com o genótipo mais ativo na captura da vitamina D, tornaram-se mais vulneráveis quando expostos ao fumo.

Com a finalidade de melhor avaliar a participação do hábito de fumar na degeneração discal, foram analisados os polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo dos componentes do cigarro, tanto nos pacientes, como nos controles. Dentre os componentes químicos de maior toxicidade da fumaça, encontram-se o benzopireno e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Oktenoglu *et al.*, 2003).

Na Fase I das reações do biometabolismo, há a ativação desses compostos tornando-os mais reativos. Sob essa ótica, é possível concluir que inúmeras lesões ocorrem no material genético, uma vez que compostos ativados tornam-se altamente eletrofilicos e



capazes, portanto, de se ligarem ao DNA. No entanto, é possível a inativação desses compostos e dela participam os genes *GSTT1* e *GSTM1*, envolvidos na Fase II do metabolismo de agentes xenobióticos. A presença de polimorfismos afetando esses genes pode alterar o processo de eliminação dos componentes tóxicos presentes no cigarro, prolongando, desse modo, os efeitos danosos dos metabólitos da fumaça no metabolismo do disco intervertebral.

Neste estudo, a avaliação da influência dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* na degeneração discal demonstrou que 21,2% dos pacientes e 19,3% dos controles não eram portadores de T1 (*GSTT1* 0/0), enquanto para M1, a nulidade (*GSTM1* 0/0) entre os pacientes foi de 47% e nos controles de 34,1%, sem diferença entre os grupos estudados ($P=0,84$ e $0,14$ respectivamente). As frequências de nulidade dos genes *GSTM1* (34,1%) e *GSTT1* (19,3%) nos controles estão de acordo com Rossit *et al.* (2002), que encontraram frequências de 47,3% e 18,5% para os genótipos homozigotos nulos dos genes *GSTM1/T1* nas populações do Sudeste e Norte do Brasil.

Não foram observadas diferenças significantes entre esses genótipos com o hábito de fumar, sobrepeso e história familiar de degeneração discal, tampouco houve associação positiva para a nulidade de *GSTT1/M1* com os maiores graus e níveis de degeneração.

Entretanto, comparando-se os polimorfismos *VDR-FokI* com os polimorfismos *GSTT1/M1*, constatou-se que a presença do alelo f e a ausência de, pelo menos um gene *GSTT1* ou *M1*, foi significantemente mais freqüente nos pacientes comparado aos controles ($P<0,001$). O alelo f isolado mostrou-se fator de risco para a doença, pois o *odds ratio* (OD) resultante da análise do polimorfismo *VDR-FokI* foi de 16,72 (IC 95%:6,9-40,5) enquanto o OD dos genes *GSTT1* e *GSTM1* foi de 1,26 (IC 95%:0,51-3,1). Desse modo, os resultados apresentados mostram que o alelo f pode ser considerado um fator de risco inerente ao

aparecimento precoce dos sinais de degeneração discal. Além disso, o hábito de fumar pareceu interferir no processo, independentemente do indivíduo apresentar genótipo favorável ou não para os genes de destoxificação dos componentes da fumaça (*GSTM1* ou *T1*). Por outro lado, genótipos nulos (*GSTT1/M1*) e fatores ambientais, como sobrepeso, não pareceram associados com o surgimento da doença.

A história familiar positiva pode fortalecer o diagnóstico clínico e indicar o potencial para o desenvolvimento da doença. Desse modo, os indivíduos identificados como de alto risco podem beneficiar-se das estratégias preventivas, como modificar o posicionamento corporal, por meio de exercícios de educação de postura, alongamentos, fortalecimentos e de propriocepção. Além disso, podem ter atenção e conscientização quanto à adoção de cuidados ergonômicos em suas atividades ocupacionais.

É inquestionável a possibilidade de prevenção dessas doenças, a partir do emprego de marcadores genéticos aliados ao acompanhamento clínico, como ferramentas precisas no melhor entendimento da etiologia da doença. Dessa maneira, a união de esforços flexibilizará as opções efetivas dos programas de tratamento, bem como o delineamento, em futuro próximo de medicamentos individualizados.

A nosso ver, este estudo, embora modesto, contribuiu para o melhor entendimento da participação dos fatores genéticos e ambientais na doença do disco intervertebral, responsável pelo sofrimento em uma significativa parte da população e ônus para o Estado e instituições de convênios e seguros de saúde.



CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. O alelo f para receptor da vitamina D (*VDR-FokI*) associa-se à degeneração do disco intervertebral, preferencialmente em pacientes com história familiar da doença, no entanto, isso não ocorre com os polimorfismos genéticos para as enzimas glutatíão-S-transferases (*GSTT1* e *GSTM1*);

2. O hábito de fumar mostra-se como fator de risco, principalmente para pacientes com genótipo FF do polimorfismo *VDR-FokI*, independentemente dos genótipos para os genes de destoxificação (*GSTM1* ou *T1*) que em conjunto com as características individuais, incluindo sobrepeso, hábito de fumar, história familiar e gravidade da doença não mostram associação. Por outro lado, a gravidade da doença e sua manifestação precoce relacionam-se com os genótipos *_/_f*;

3- A história familiar da degeneração discal destaca-se como fator de risco entre os pacientes, sugerindo predisposição genética para a doença, o mesmo não ocorrendo com relação a fatores antropométricos, ambientais e ocupacionais.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. et al. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.*, v. 10, p. 3389-93, 2004.
- ADAMS, M.A. Biomechanics of back pain. *Acupunct Med.*, v. 22, p.178-88, 2004.
- ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R. A; ANWAR, W. A. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.*, v.107, p. 229-233, 1996.
- ALA-KOKKO, L. Genetic risk factors for lumbar disc disease. *Ann Med.*, v.34, p. 42-47, 2002.
- ANNUNEN, S. et al. An allele of *COL9A2* associated with intervertebral disc disease. *Science.*, v.285, p. 409-412, 1999.
- ARAI, H. et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in translation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in japanese women. *Jornal of Bone and Mineral Research.*, v. 12, p. 915, 1997.
- BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat Res.*, v. 462, p 255-79, 2000.
- BATTIÉ, M.; VIDEMAN, P.; ERIC, P. Lumbar Disc Degeneration: Epidemiology and Genetic Influences. *Spine.*, v. 29, p. 2679-2690, 2004.
- BATTIÉ, M.C. et al. 1995 Volvo Award in Clinical Sciences: Determinants of lumbar disc degeneration. *Spine.*, v. 20, p. 2601-2612, 1995.
- BATTIÉ, M.C.; VIDEMAN, T.; GILL, K. Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration: An MRI study in identical twins. *Spine.*, v. 16, p. 1015-1021, 1991.
- BELL, D.A. et al. Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase. *Environ Health Perspect.*, v. 98, p. 113-17, 1992.
- BEJIA, I. et al. Factors predicting outcomes of mechanical sciatica: a review of 1092 cases. *Joint Bone Spine.*, v. 71, p. 567-71, 2004.
- BENOIST, M. Natural history of the aging spine. *Eur Spine J.*, v. 12, p.86-89, 2003.
- BHALLA, A.K.; WOJNO, W.C.; GOLDRING, M.B. Human articular chondrocytes acquire 1,25(OH)₂ vitamin D 3 receptors in culture. *Biochim Biophys Acta.*, v.931, p. 26-32, 1987.

BHATIA, N.; WANG, J. Current information regarding the biochemical and genetic events that occur during disc degeneration. *Curr Opin Orthop*, v. 14, p. 153-158, 2003.

BOOS, N. et al. 2002 Volvo Award in Basic Science: Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs. *Lippincott Williams & Wilkins*, v. 27, p. 2631-2644, 2002.

BOYAN, B.D. et al. Differential regulation growth plate chondrocytes by 1,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃ involves cell-maturation-specific membrane-receptor activated phospholipid metabolism. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v. 13, p.143-154, 2002.

BOSTMAN, O.M. Prevalence of obesity among patients admitted for elective orthopaedic surgery. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v.18, p. 709-13, 1994.

CATS-BARIL, W.L. The cost of low back pain. Low Back Symposium, April 15-16, St. Louis, MO, 1996.

CHEN, H.Y. et al. Relation of vitamina D receptor *FokI* start codon polymorphism to bone mineral density and occurrence of osteoporosis in postmenopausal women in Taiwan. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, v. 81, p. 93-98, 2002.

CONFORTI- FROES, N. et al. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutation Research*, v. 379, p.53-59, 1997.

CORVOL, M.T. et al. Cartilage and vitamin D in vitro. *Ann Endocrinol*, v.42, p. 482-487, 1981.

COX, J. Biomecânica da coluna lombar. IN COX, J. Dor Lombar. Editora Manole. 6ª edição. São Paulo, p.17-129, 2002.

CROFTS, L. A. et al. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc. Natl. Acad. Science*, v. 95, p. 10529-10534, 1998.

DE FLORA, S. et al. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res*, v. 366, p.197-238, 1996.

EISENSTEIN, S.; ROBERTS, S. Aspects of current management. The physiology of the disc and its clinical significance. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, v.85-B, p. 633-666, 2003.

GARABEDIAN, M. et al. Vitamin D and cartilage. In vitro metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by cartilage. *Endocrinology*, v. 102, p. 1262-8, 1978.

GEISLER, A.S.; OLSHAN, A. F. Human Genome Epidemiology Network. *C D C*, v.3(8), p. 1-10, 2002.



GELDER, C. et al. Vitamin D Receptor gene polymorphisms and susceptibility to *Mycobacterium malmoeense* pulmonary disease. *J. Infect. Dis.*, v. 181, p. 2099-2102, 2000.

GREISING, D.M. et al. A-ring analogues of 1,25(OH)₂D₃ with low affinity for the vitamin D receptor modulate chondrocytes via membrane effect that are dependent on cell maturation. *J. Cell Physiology*, v. 171(3), p. 357-367, 1997.

GROSS, C. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms: analysis of ligand binding and hormone responsiveness in cultured skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.242, p. 467-473, 1998.

GRUBER, H.E.; HANLEY, E.N.Jr. Recent advances in disc cell biology. *Lippincott Williams & Wilkins*, v.28(2), p.186-193, 2003.

GUSTINCICH, S. et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, v. 11(3), p. 298-300, 1991.

HAUSSLER, M.R. et al. Physiological importance of vitamin D metabolism. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, v.17, p.134-142, 1980.

HARRIS, S. et al. 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.

HESTBAEK, L. et al. Heredity of low back pain in a young population: a classical study. *Twin Res.*, v. 7, p. 16-26, 2004.

HIETALA, N. et al. Sequence variations in the collagen IX and XI genes are associated with degenerative lumbar spinal stenosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.62, p. 1208-1214, 2003.

HIRVONEN, A. et al. Modulation of mutagenicity by genetically determined carcinogen metabolism in smokers. *Carcinogenesis*, v.15, p.813-15, 1994.

HOLICK, M.F. Vitamin D: Photobiology metabolism, mechanism of action and clinical applications. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Ed. Favus. *Lippincott Williams & Wilkins*, v.67, p.92-98, 1999.

HORTON, W.E.Jr. et al. An association between an aggrecan polymorphic allele and bilateral hand osteoarthritis in elderly white men: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 6, p. 245-251, 1998.

HUNTER, C.; MATYAS, J.R.; DUNCAN, N.A. The three-dimensional architecture of the notochordal nucleus pulposus: novel observations on cell structures in the canine intervertebral disc. *Blackwell Science*, v. 202, p. 279-291, 2003.

IWAHASHI, M. et al. Mechanism of Intervertebral Disc Degeneration Caused by Nicotine in Rabbits to Explicate Intervertebral Disc Disorders Caused by Smoking. *Spine*, v.27, p. 1396-1401, 2002.

JAYASURYA, A. et al. Glutathione S-Transferase (pi) Expression in Nasopharyngeal Cancer. *Archives of Otolaryngology*, v. 128(12), p. 1396-1399, 2002.

JENSEN, T. et al. The vitamin D3 receptor and retinoid X receptors in psoriatic skin: the receptor levels correlate with the receptor bonding to DNA. *British Journal of Dermatology*, v. 138, p. 225-228, 1998.

JONES, L. et al. Molecular mechanism of androgen action. *Vitamin Hormone*, v. 49, p. 383-433, 1998.

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.

JURUTKA, P.W. et al. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev. Endocrinology Disorders*, v. 2, p. 203-316, 2001.

KALES, S.N. et al. The role of collagen IX tryptophan polymorphisms in symptomatic intervertebral disc disease in Southern Europe patients. *Spine*, v.29(11), p.1266-70, 2004.

KANGAS, K.L. et al. Smoking and overweight as predictors of hospitalization for back disorders. *Spine*, v. 28(16), p. 1860-8, 2003

KAWAGUCHI, Y. et al. The association of lumbar disc disease with vitamin-D receptor gene polymorphism. *J Bone Joint Surg Am*, v. 84-A, p. 2022- 2028, 2002.

KERKHOF, P.C.M.V. Biological activity of vitamin D analogues in the skin, with special reference to antipsoriatic mechanisms. *British Journal of Dermatology*, v. 132, p. 675-682, 1995.

KIM, K.S. et al. Inhibition of proteoglycan and type II collagen synthesis of disc nucleus cells by nicotine. *J. Neurosurg Spine*, v. 99(3), p. 291-7, 2003.

KLAUS, G. et al. 1,25-(OH)2D 3 receptor regulation and by 1,25-(OH)2D 3 effects in primary cultures of growth cartilage cells of the rat. *Calcif Tissue Int*, v. 49(5), p. 340-348, 1991.

KREIS, T.; VALE, R. Guidebook to the extracellular matrix, anchor and adhesion proteins, Oxford, 2ª edição, p.332-377, 2000.



KROHN, K. et al. 1,25(OH)₂D₃ and Dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcified Tissue International*, v. 10, p. 2160-9, 2003.

LAWRENCE, R. C.; HELMICK, C. G.; ARNETT, F. C. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*, v. 41, p. 778-799, 1998.

LEBOEUF, Y.C. Body weight and low back pain. A systematic literature review of 56 journal articles reporting on 65 epidemiologic studies. *Spine*, v. 25(2), p. 226-37, 2000.

LEBOEUF, Y.C. Back pain-individual and genetic factors. *J Electromyogr Kinesiol*, v. 14(1), p. 129-33, 2004.

LIVSHITS, G. et al. Familial history, age and smoking are important risk factors for disc degeneration disease in Arabic pedigrees. *Eur J Epidemiol*, v. 17, p. 643-651, 2001.

LOTZ, C. J.; ADAM, H. H. Prolonged Compression of intervertebral discs activates MMP-2. *Spine*, v. 23, p. 2493-2506, 1998.

MC GEARY, D. D. et al. Smoking status and psychosocioeconomic outcomes of functional restoration in patients with chronic spinal disability. *The Spine Journal*, v. 4, p. 170-175, 2004.

MACGREGOR, A.J. et al. Structural, psychological, and genetic influences on low back neck pain: a study of adult female twins. *Arthritis Rheum*, v. 51(2), p. 160-7, 2004.

MACLEOD, S. et al. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 influence the in vivo function of CYP1A2. *Mutation Research*, v. 376, p. 135-142, 1997.

MATSUI, H. et al. Familial predisposition and clustering for juvenile lumbar disc herniation. *Spine*, v. 17, p. 1323-1328, 1992.

MATSUI, H. et al. Familial predisposition for lumbar degenerative disc disease: a case-control study. *Spine*, v. 23, p. 1029-1034, 1998.

MELROSE, J.; SUSAN, S.; GHOSH, P. Assessment of the cellular heterogeneity of the ovine intervertebral disc: comparison with synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Eur Spine Journal*, v. 12, p. 57-65, 2003.

MILLER, D. et al. Smoking and the Risk of Lung Cancer: Susceptibility with GSTP1 Polymorphisms. *Epidemiology*, v. 14(5), p. 545-551, 2003.

MIYAMOTO, K. et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrinology*, v. 11(8), p. 1165-1179, 1997.



MOHAMMED, A. et al. Effect of Nicotine on Spinal Disc Cells: A Cellular Mechanism for Disc Degeneration. *Spin*, v. 29(5), p. 568-575, 2004.

NATARAJAN, R.N.; KE, J.H.; ANDERSSON, G.B.J. A model to study the disc degeneration process. *Spine*, v. 19, p. 259-265, 1994.

National Council on Compensation Insurance. Workers' Compensation Claim Characteristics. National Council on Compensation Insurance, Boca Raton, FL, 1991.

National Safety Council. Injury facts. Washington, DC: National Safety Council., p.154, 2000.

NEBERT, D.W.; MC KINNON, R.A.; PUGA, A. Human Drug-Metabolizing Enzyme Polymorphisms: Effects on Risk of Toxicity and Cancer. *DNA and Cell Biology*, v. 15(4), p. 273-280, 1996.

ODA, H. et al. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model. *J.Orthop Sci*, v. 9, p. 135-141, 2004.

OGUNKOLADE, B.W. et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes*, v. 51, p. 2294-2300, 2002.

OISHI, Y. et al. Lack of association between lumbar disc degeneration and osteophyte formation in elderly Japanese women with back pain. *Bone*, v.32(4), p. 405-411, 2003.

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

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

PETTERI, P. et al. Identification of a Novel Common Genetic Risk Factor for Lumb. *Jama.*, v. 285, p. 1843-1849, 2001.

PERERA, F. P.; WEINSTEIN, I. B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, v.21, p. 517-24, 2000.

POSTACCHINI, F.; LAMI, R.; PUGLIESE, O. Familial predisposition to discogenic low back pain: an epidemiologic and immunogenetic study. *Spine*, v. 13, p. 1403-1406, 1988.

RAY, R. et al. Vitamin D nuclear receptor (VDR): ligand-binding features analyzed by chemical modification, site-directed mutageneses and homology-extension modeling. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, v. 69, p. 247-251, 1999.

RICHARDSON, J. K. et al. A familial predisposition toward lumbar disc injury. *Spine*, v. 22, p.1487- 1492, 1997.



ROSSIT, A. B. et al. Polymorphisms the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older southeastern brazilians. *Cancer Lett.*, v.180,p.173-182, 2002.

ROUGHLEY, P. J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine*, v. 29, p. 2691-2699, 2004.

SALTER, R. Distúrbios e Lesões do Sistema Musculoesquelético. Editora Médica e Científica. São Paulo/ Minas Gerais. 3ª edição. p. 259-305, 2001.

SAIKI, R K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, p.487-491, 1988.

SAMBROOK, P.N.; MACGREGOR, A.J.; SPECTOR,T.D. Genetic influences on cervical and lumbar disc denegeration: a magnetic resonance imaging study in twins. *ArthritisRheum*, v. 42(2), p. 366-72, 1999.

SCAPINELLI, R. Lumbar disc herniation in eight siblings with a positive family history for disc disease. *Acta Orthop Belg*, v. 59, p. 371-376, 1993.

SCHOKET, B. et al. Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutation Research.*, v. 482, p. 57-69, 2001.

SCHOOTEN, F.J. et al. Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue. *FASEB J.*, v. 12, p. 1409-17, 1998.

SEIDEGARD, J.; PERO, R.W. The hereditary transmission of high glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leucocytes. *Hum Genet*, v. 69, p. 66-8, 1985.

SETTON, L.A.; CHEN, J. Cell Mechanics and Mechanobiology in the Intervertebral Disc. *Spin*, v. .29(23), p. 2710-2723, 2004.

SEYMUR,G. Revista Paulista de Educação Física, v.14(1), p.16-28, 1991.

SIMMONS, E. D. Jr. et al. Familial predisposition for degenerative disc disease: a case-control study. *Spine*, v. 21, p. 1527-1529, 1996.

SLOSAR, P.J.; PERKINS, R.B.; SNOOK, D. Effects of cigaret smoking on the spine: a focused review. *Spine*, v. 3(5), p. 6-9, 2002.

SOLOVIERA, S. et al. COL9A3 gene polymorphism and obesity in intervertebral disc degeneration of the lumbar spine:evidence of gene environment interaction. *Lippincott Williams & Wilkins*, v. 27(23), p. 2691-2696, 2002.



STRANGE, R.C.; FRYER, A.A. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ.* v. 148, p. 231-49, 1999.

STUCKER, I. et al. Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, v. 20, p. 1-7, 2002.

TAKIGAWA, M. et al. Differential effects of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol on the proliferation and the differentiated phenotype of rabbit costal chondrocytes in culture. *Endocrinology*, v. 122(3), p. 831-839, 1988.

TANINGHER, M. et al. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res*, v. 436, p. 227-61, 1999.

UITTERLINDEN, A.G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, v. 338(2), p. 143-156, 2004.

VAN HOUDT, J.J. Mutagenic activity of airborne particulate matter in indoor and outdoor environments. *Atmos Environ*, v. 24, p. 207-20, 1990.

VARLOTTA, G.P. et al. Familial predisposition for herniation of a lumbar disc in patients who are less than twenty-one years old. *J Bone Joint Surg Am*, v. 73(1), p. 124-8, 1991.

VIDEMAN, T. et al. 1998 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. *Spine*, v. 23, p. 2477-2485, 1998.

VIDEMAN, T.; BATTIÉ, M. The influence of occupation on lumbar degeneration. *Spine*, v. 24, p. 1164-1168, 1999.

VIDEMAN, T. et al. The relative roles of intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene in lumbar spine degeneration and bone density. *Lippincott Williams & Wilkins*, v.26(3), p. A1-A6, 2001.

VILLAREJO-ORTEGA, F.J. et al. Lumbar disc disease in adolescents. *Rev. Neurol*, v.36(6), p.514-7,2003.

WALLACH, C.; GILBERTSON, L.; KANG, J. Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration. *Spine*, v. 28, p. 593-598, 2003.

WHITFIELD, G.K. et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 177, p. 145-159, 2001.

WILKINSON, J.; CLAPPER, M.L. Detoxication Enzymes and Chemoprevention. Phase II *Enzyme inducers*, v. 34, p. 193-197, 2002.



ZMUDA, J.; CAULEY, J.; FERRELL, R. Vitamin D receptor variants and osteoporosis. *Epidemiologic Review*, v. 22, p. 203-217, 2000.

ZOFKOVA, K. Serum parathyroid hormone levels are associated with FokI polymorphism of the vitamin D receptor gene in untreated postmenopausal women. *Endocrinology*, v. 82 (12), p. 93-96, 2003.



RESUMO

RESUMO

A etiologia da degeneração do disco intervertebral ainda é desconhecida, porém, sabe-se que a associação de fatores genéticos e ambientais tem papel importante no seu desenvolvimento. O gene do receptor da vitamina D (VDR) é um dos candidatos alvos, envolvido no surgimento da doença. Como parte da ação ambiental na discogênese, o hábito de fumar aparece como fator de risco, uma vez que interfere na irrigação do disco intervertebral. Desse modo, este estudo investigou se a ocorrência dos polimorfismos nos genes VDR, *GSTT1* e *GSTM1* estão relacionados à gravidade da doença, precocidade de seu aparecimento e história familiar em indivíduos clinicamente diagnosticados com herniação ou outras discopatias. Para tanto, extraiu-se DNA de leucócitos de 66 pacientes e 88 controles, pareados por sexo e idade. O polimorfismo VDR-*FokI* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguido da restrição com a enzima *FokI* e visualizados em gel de agarose a 2%. Os polimorfismos dos genes *GSTT1/M1* foram determinados pela amplificação, por meio da PCR multiplex e eletroforese em gel de agarose a 2%. O genótipo FF, do gene VDR-*FokI* destacou-se nos controles (69,3%), em comparação aos pacientes (13,6%; $P=0,0001$), enquanto o genótipo Ff mostrou-se significativamente mais freqüente nos pacientes (81,8%; $P=0,0001$). A freqüência da história familiar nos pacientes (78,8%) foi superior em relação aos indivíduos saudáveis (34,09%; $P=0,000$). Além disso, a história familiar e a gravidade da doença se destacaram nos pacientes portadores do alelo f do gene VDR-*FokI* ($P=0,000$ e $0,0012$, respectivamente). Contudo, a associação dos genótipos VDR em indivíduos com sobrepeso não foi confirmada. A idade de surgimento da doença mostrou-se precoce nos indivíduos com genótipo $_f$ (média de 26 anos), em comparação àqueles com genótipo FF (média de 38 anos). As freqüências dos genótipos *GSTT1/M1* nulos (0/0) e positivos (+/+) não diferiram significativamente entre os grupos de estudo ($P=0,84$ e $P=0,14$). O mesmo verificou-se, quando da relação desses genótipos com o hábito de fumar, sobrepeso, gravidade e história familiar da doença. Os dados obtidos mostram haver associação do polimorfismo *FokI* com a degeneração precoce do tecido conectivo do disco intervertebral, já que há um aumento do grau de degeneração do disco para a presença de cada alelo f. Do mesmo modo, demonstram que o fumo participa da discogênese, independente do indivíduo apresentar genótipo favorável ou não para a inativação dos componentes do cigarro. Por outro lado, sugerem o não envolvimento dos genótipos nulos (*GSTT1/M1*) e de fatores ambientais, como sobrepeso, no aparecimento da doença.

Palavras-chaves: fatores de risco, polimorfismos genéticos e degeneração do disco intervertebral.

ABSTRACT

ABSTRACT

The etiology of intervertebral disc degeneration remains to be determined, however it is known that genetic and environmental factors play an important role in the disease. The vitamin D receptor (VDR) gene, is a possibly target candidate to explain the genetic involvement in the onset of the disease. As part of environment- discogenesis action, the smoking habit seems to be a risk factor, once it interferes in disc irrigation. According to that, this study investigated whether the presence of polymorphisms in VDR and *GSTT1* and *GSTM1* genes are related with severity and onset of the disease, and also with familial history in individuals clinically diagnosed with disc herniation or other discopathies. It was extracted DNA from 66 young patients and 88 controls, matched by gender and age. The VDR-*FokI* polymorphism was amplified using Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR, and products were digested with *FokI* and then electrophoresed in 2% agarose gel. *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms were determined by multiplex PCR and electrophoresed in 2% agarose gel. For the VDR-*FokI* gene, the FF genotype was 69,3% in controls compared with the patients (13,6; $P=0,0001$), while the frequency of Ff genotype was significantly higher in patients (81,8%; $P=0,0001$). The familial history was more present in patients (78,8%) than in health subjects (34,09%; $P=0,000$). In addition, familial history and severity of disease were accentuated in patients with f allele ($P=0,000$ e $0,0012$). However, it was not found association of VDR genotypes in subjects with overweight. The mean of disease onset was earlier in *_f* genotype (26 years) compared with FF genotype (38 years). The distribution of genotypes *GSTT1/M1* null (0/0) and positive (+/+) were similar in the two groups ($P=0,84$ e $P=0,14$). The same was found when the genotypes were related with overweight, severity and familial history of disease. Our findings denoted an association between the *FokI* polymorphisms and early onset and, severity of the disease, once it was observed a degree increase of disc degeneration at the presence of each f allele. At the same time, we demonstrated the smoking involvement in the discogenesis process, independently of the favorable or unfavorable genotypes for the inactivation of cigarette chemical components. On the other hand, our data suggest that the association of *T1/M1* null genotypes and environmental factors, such as overweight are not involved with the disease process.

Key words: risk factors, genetic polymorphisms, intervertebral disc degeneration.



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 2004.

NOME

Assinatura



APÊNDICE 2



**QUESTIONÁRIO A SER RESPONDIDO PELOS PARTICIPANTES DA PESQUISA
SOBRE DEGENERAÇÃO DISCAL.**

DATA:

Nº DO PACIENTE NO ESTUDO:

NOME:

IDADE:

SEXO:

ENDEREÇO:

CIDADE:

ESTADO:

TELEFONE RESIDENCIAL:

TELEFONE COMERCIAL:

INFORMAÇÕES BÁSICAS

- 1- GRUPO ÉTNICO:
(INDICAR DE QUE PARTE DO MUNDO):
- 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?

INFORMAÇÕES ANTROPOMÉTRICAS

1. COMPLETE A TABELA ABAIXO PARA SEU PESO DURANTE OS DIFERENTES PERÍODOS INDICADOS. PENSE NA MELHOR E MAIS EXATA MÉDIA DE PESO DURANTE CADA PERÍODO SOLICITADO.

	ANO PASSAD O	14-19 ANOS	EM TORNO 20 ANOS	EM TORNO 30 ANOS	EM TORNO 40 ANOS	EM TORNO 50 ANOS	EM TORNO 60 ANOS	70 ANOS
PESO EM KG								

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

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

3. QUAL SUA ALTURA EXATA EM METROS? E PESO ATUAL?

MEDIDAS TOMADAS POR:

HISTÓRICO OCUPACIONAL

1- QUE TIPO DE TRABALHO VOCÊ TEM ATUALMENTE?

2- QUAL TIPO DE FERRAMENTA, EQUIPAMENTO OU COMPOSTO QUÍMICO VOCÊ MANUSEIA?

3- POR QUANTOS ANOS VOCÊ DESENVOLVE ESTA ATIVIDADE?

4- QUAL OUTRO TRABALHO TEVE ? QUANTO TEMPO?

5- VOCÊ TEVE ALGUM TRABALHO EM QUE SE EXPÔS A PRODUTOS QUÍMICOS OU PESTICIDAS?

SE SIM DÊ DETALHES:

6- VOCÊ VIVE PRÓXIMO DE ÁREA INDUSTRIALIZADA? (DENTRO DE 8,0 KM DE FÁBRICA OU USINA)



7- SE SIM, POR QUANTOS ANOS VOCÊ VIVE NESTE LUGAR?

8 QUAL POSIÇÃO VOCÊ TRABALHA?

- a) SENTADO (QUANTAS HORAS)
- b) EM PÉ (QUANTAS HORAS)

9. SEU TRABALHO ENVOLVE:

- a) USO DE INSTRUMENTOS DE VIBRAÇÃO
- b) TORÇÃO DA COLUNA
- c) CARREGAMENTO DE PESO (SE SIM, CARREGA PESO SENTADO OU EM PÉ)

10. SE FOR MULHER, QUAL SUA ATIVIDADE EM CASA?

- a) LAVAR E PASSAR ROUPA
- b) QUANTOS FILHOS

OUTROS AFAZERES

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?

DIARIAMENTE ()

OCASIONALMENTE()

3- VOCÊ ESTÁ FUMANDO ATUALMENTE?

SIM

NÃO

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?

SIM NÃO

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

9- VOCÊ JÁ ESTEVE EXPOSTO À FUMAÇA DE OUTROS FUMANTES DIARIAMENTE OU REGULARMENTE?

10. VOCÊ JÁ USOU ALGUM DESSES PRODUTOS DE TABACO?

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

HISTÓRICO DE ÁLCOOL

1- VOCÊ JÁ BEBEU, PELO MENOS 4 DRINQUES POR SEMANA DURANTE SEIS MESES OU MAIS?

SIM NÃO

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 A PARADA	QUANTIDADE/ SEMANA CERVEJA	QUANTIDADE/ SEMANA VINHO	QUANTIDADE/ SEMANA OUTROS
A			
A			
A			
A			

5. QUÃO FREQUENTEMENTE VOCÊ BEBE OS SEGUINTES 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?

- a) NÃO FUMA
- b) NUNCA/ RARAMENTE BEBE ENQUANTO FUMA
- c) ALGUMAS VEZES BEBE ENQUANTO FUMA
- d) REGULARMENTE BEBE ENQUANTO FUMA

7. VOCÊ SENTE CALOR NA FACE APÓS BEBER ÁLCOOL?

- a) SEMPRE
- b) ALGUMAS VEZES
- c) NUNCA
- d) NÃO SABE

HISTÓRICO MÉDICO

1- QUANDO FOI SEU PRIMEIRO EPISÓDIO DE DOR NAS COSTAS (IDADE)?

2- QUANTAS CRISES JÁ TEVE?

3- QUAL É O LUGAR DE DOR NA COLUNA?

4- DE INÍCIO A DOR FOI:

- a) INSIDIOSA (MAL JEITO, TORÇÃO, CARREGAMENTO DE PESO)
- b) ESPONTÂNEA

5- QUAL FOI A DURAÇÃO DA DOR?

- a) DIAS
- b) SEMANAS

6- A DOR SE IRRADIAVA? SE SIM, PARA ONDE?

7- VOCÊ SENTIA FORMIGAMENTO? SE SIM, ONDE?

8- VOCÊ SINTIA ADORMECIMENTO? SE SIM, ONDE?

9- HAVIA PERDA DE FORÇA? SE SIM, A PERDA ERA POR:

- a) DOR
- b) REAL (DIMINUIÇÃO DA FORÇA MUSCULAR)

10- HÁ QUADRO DE PROBLEMAS NA COLUNA EM SUA FAMÍLIA DIAGNOSTICADO POR UM MÉDICO? QUAL (HÉRNIA, PROTRUSÃO...)? SE SIM, DAR O PARENTESCO.



11-QUAIS SÃO OS FATORES DE PIORA (P) OU MELHORA (M) DA DOR?

- a) SENTADO
- b) DEITADO
- c) EM PÉ
- d) ANDANDO
- e) ESFORÇO
- f) MOVIMENTOS DE FLEXÃO
- g) MOVIMENTOS DE EXTENSÃO
- h) INCLINAÇÃO DIREITA E ESQUERDA
- i) TORÇÃO DIREITA E ESQUERDA

12-QUAL TRATAMENTO VOCÊ EFETUOU?

- a) FISIOTERAPIA
- b) MEDICAMENTOS (QUAIS)
- c) CALOR
- d) ACUPUNTURA
- e) CIRURGIA

13- VOCÊ JÁ TEVE ALGUM TRAUMA ANTERIOR?

- a) QUEDA
- b) TORÇÃO
- c) FRATURA



ATIVIDADE FÍSICA

1. QUANTAS HORAS POR SEMANA OU MESES POR ANO, EM MÉDIA, VOCÊ PRATICOU E PRATICA EXERCÍCIOS DURANTE O PERÍODO REQUERIDO? E QUAL ATIVIDADE?

IDADE POR GRUPO	ATIVIDADE	MÉDIA DE HORAS POR SEMANA	MÉDIA DE MESES POR ANO
ATUALMENTE			
ANO PASSADO			
18-24 ANOS			
25-34 ANOS			
35-44 ANOS			
45 OU MAIS			

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 ÍTEM, EM PARTICULAR.

APÊNDICE 3

Artigo a ser submetido à publicação na revista *Spine*

GENETIC AND ENVIRONMENTAL RISK FACTORS ON THE INTERVERTEBRAL DISC DEGENERATION IN A BRAZILIAN POPULATION

Francine T. B. Nunes¹, Nívea D. T. Conforti Froes^{1*}, Giulliana Tayar¹, Wilson Fábio Negrelli², Dorotéia R. S. Souza³.

1. Molecular Epidemiology Laboratory, University of Sao Paulo State (UNESP), campus of Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil.

2. M.D., Orthopedic and Traumatology Specialist by USP (University of Sao Paulo).

3. Biochemistry and Molecular Biology Laboratory. Medical School. Sao Jose do Rio Preto (FAMERP). Sao Paulo.

Financial Support: CNPq

* **Corresponding author:** nfroes@ibilce.unesp.br

Short running title: Genetic polymorphisms in disc disease

Key words: risk factors, genetic polymorphisms, intervertebral disc degeneration.



Abstract

Study Design. A case-control study was performed.

Objectives. To test the hypothesis that genetic polymorphisms and some environmental factors are involved in disc degeneration.

Summary of Background Data. The etiology of intervertebral disc degeneration remains to be determined, however it is known that genetic and environmental factors play an important role in the disease. The vitamin D receptor (*VDR*) gene seems to be a target candidate to explain the genetic involvement in the onset of the disease. However the xenobiotic metabolizing genes, *GSTT1* and *GSTM1* has been for the first time investigated in disease. As far we are concerned, this is the first study conducted in the Brazilian population, focused on the discogenic disease.

Methods. DNA was extracted from 66 young patients and 88 healthy subjects , for genotyping using Polimerase Chain Reaction (PCR). PCR products were digested with *FokI* and then electrophoresed in 2% agarose gel. *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms were determined by multiplex PCR and electrophoresed in 2% agarose gel.

Results. For the *VDR-FokI* gene, the FF genotype frequency was 69,3% in controls compared with the patients (13,6; $P=0,0001$), while for the Ff genotype, the frequency was significantly higher in patients (81,8%; $P=0,0001$). The familial history was more present in patients (78,8%) than in healthy subjects (34,09%; $P=0,000$). Additionally, the familial history, and severity of disease were accentuated in patients with f allele ($P=0,000$ and $0,0012$, respectively). Nevertheless, it was not found association between the *VDR* genotypes and overweight comparison. The mean of disease onset was earlier in $_f$ genotype (26 years) compared with FF genotype (38 years). The distribution of genotypes *GSTT1/M1* null (0/0) and positive (+/+) were similar in the two groups ($P=0,84$ e $P=0,14$). The same was found when these genotypes were related with overweight, severity and familial history of disease.

Conclusion. Our findings confirmed an association of genetic and smoking in the discogenic process, denoted by the interference of *FokI* polymorphisms in the early onset and, the severity of the disease. Likewise, we demonstrated that smokers presented the disease, even though in the presence of favorable genotypes. On the other hand, our data suggested that the association of *T1/M1* null genotypes and environmental factors, are not involved with the disease process.

1. Introduction

Degeneration of the intervertebral disc and its associated clinical manifestations are a significant source of patient pain and morbidity and utilizing an increasing percent of health care resources (1).

The intervertebral disc is a biologically complex structure, consisting of an extracellular matrix of proteoglycans and collagens. The outer layer, the annulus fibrosus (AF), consists mainly of collagen I, and lesser amounts of types II and III. The interior structure of the disc, the nucleus pulposus (NP), is about 50% proteoglycan, and 20% collagen II. The most common proteoglycan is aggrecan, but smaller amounts of others are also present. Both contain small amounts of collagen IX. These proteoglycans create a hydrophilic environment, leading to fluid retention and swelling of the NP (2). Water is contained in the matrix of the disc and contributes approximately 65% to 80% of its total weight by virtue of the high density of negatively charged sulphate and carboxyl groups (anions) on the glycosaminoglycan chains of aggrecan (3).

The precise etiology and pathophysiology of degenerative disc disease (DDD) remain a matter of controversy; nonetheless is believed to result from multiple and complex interactions of biological and biomechanical factors. The physiology of the disc cells involves a highly specialized coordination of cell structure and function, and cells are influenced by interactions with other cells and with the surrounding extracellular matrix, which is produced and constantly remodeled by the cells. The healthy integrity of the extracellular matrix is the basis for the biochemical shock absorber and tensile function of the disc (4).

At the biochemical level, the diminished proteoglycan content reflects an imbalance in the normal anabolic and catabolic functions of the NP cells, secondary to decreased



synthesis, increased breakdown, or a combination of both processes. As a consequence, the NP dehydrates, altering the normal hydrostatic and biochemical properties of the disc (1).

A number of anthropometric and environmental risk factor such as driving, torsion stress, height and especially tobacco smoking have been implicated in the pathogenesis of DDD. Three types of stress in an individual's environment are believed to contribute to disc degeneration: dynamic stress (hard work, posture, and externally caused injury), biochemical stress (nutrition, blood flow obstacle) and physiological stress. Smoking is believed to cause biochemical stress in many tissues (5).

The components of tobacco lead to disc malnutrition through various mechanisms, including vasoconstriction, atherosclerosis and decreased oxygen carrying capacity (6). Several studies showed an increase of disc degeneration in chronic smoking. The use of habitual tobacco is believed to cause necrosis of the NP, disturbance of the pattern of laminar overlapping in AF, decrease of proteoglycan synthesis and expression of type II collagen and alteration of normal form of condrocytes (5,7,8)

Nevertheless, results of exposure-discordant between classic twin studies suggest that environmental factors have a relatively modest participation in disc degeneration. Therefore, the heredity seems to perform a dominant role in disc degeneration, explaining 74% of the variance in adult populations studied to date. Since 1998, genetic influences have been confirmed by the identification of several gene forms associated with disc degeneration (9).

Among the candidate genes related with disc degeneration etipathogenesis, the vitamin D receptor gene (VDR) seems to be involved. The hormonal form of vitamin D 1,25 dihydroxyvitamin D₃, is required for a normal mineralization of bone, absorption of calcium from the gut, control of calcium and phosphate homeostasis, and regulation of

parathyroid hormone secretion. It has been reported that vitamin D is expressed in the chondrocytes and is directly involved in the differentiation, proliferation and maturation of cartilage cells. In addition, the vitamin D can influence proteoglycan synthesis by articular chondrocytes (10). The vitamin D receptors are intracellular polypeptides that specifically bind 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ and interact with target-cell nuclei to produce a variety of biologic effects. The human VDR gene is located on chromosome 12 (12q12q-14), and contains several intragenic polymorphisms that have been associated with degenerative disc disease, including polymorphism *Fok I* in exon 2 containing the initial codon of transcription. According to that, we chose to investigate the role of the VDR- *Fok I* as one of the plausible candidate genes involved in the intervertebral disc degeneration.

Due to the likely role of smoking in the disease, we also focused to investigate the influence of glutathione S-transferases genes (*GSTT1* and *GSTM1*). As already known, these genes are responsible for the detoxification of tobacco smoke constituents. There is evidence to suggest that people with common *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms may have an increased susceptibility to cancer and other diseases when exposed to tobacco (11). In eukaryotes, glutathione S-transferases (GSTs) participate in the detoxification process by catalysing the conjugation of electrophilic compounds to glutathione resulting them in less reactive and more easily excreted metabolites (12,13). A number of species of glutathione S-transferase superfamilies have now been described: Alpha, Mu, Pi, Theta, Sigma, Kappa, Phi and Zeta. (14). The *GSTM1* gene, located at 1p13.3 chromosome, codes for the enzyme glutathione S-transferase mu, while the *GSTT1* gene codes for the enzyme glutathione S-transferase theta. *GSTM1* is polymorphically expressed, and three alleles have been identified (*GSTM1-0*, *GSTM1*A*, and *GSTM*B*). The gene *GSTT1* is located in 22q11.23 and two functionally different genotypes at the *GSTT1* locus have been described. The first,



GSTT1-0, is a homozygous deletion. The second, *GSTT1-1*, comprises genotypes with one or two functional alleles present. Individuals with homozygous deletions of *GSTM* or *GSTT* have reduced or no glutathione S-transferase activity and therefore may be unable to eliminate toxic compounds as efficiently (15).

The disc degeneration influences a variety of structures and processes that play a role in pain production. Concerning to the genetic factor is intense in DDD, we investigated the presence of *VDR- Fok I* polymorphisms in patients with DDD and healthy subjects, in order to understand its participation related with the age onset, familial history and severity of the disease, as well as, associated with patient habits, such smoking and overweight . Furthermore, the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms are also investigated regarding the environmental habits involved in the disease process.

2. Material and Methods

2.1. Subjects

The case group consisted of 66 unrelated Brazilians southeast patients (38 men and 28 women) with clinical and imaginologic positive discogenic diagnosis. The main exclusion criteria were a known history of heavy physical loading at work and leisure, previous trauma and vehicular or motorcycle driving. The age of the patients ranged from 16 to 62 (mean of 38 years old) and they were recruited from a private clinic focused on spine treatment in Sao Paulo. They were matched with healthy individuals that consisted of 88 subjects (35 men and 53 women) with mean age of 41 years ranging from 16 to 57 years old with no clinical symptoms of low back pain or sciatic. Informed consent was obtained from all of the participants before they joined the study. They received information about the study procedures before participation, and study protocol were reviewed and approved by the Ethical Committee at UNESP.



2.2. Interview and measurements

All the participants responded a questionnaire, intended to collect data on lifetime environmental exposures, smoking habit, occupational history, individual data (weight, height and gender) and lifetime sport activities, such as estimate frequency, average session duration, and the number of month or years of participation. The patient evaluation consisted of clinical history, physical analysis, and complementary exams, such as magnetic resonance images (MRI).

Out of MRI images, it could be possible to extract information concerning disc herniation, protusion, bulging, disc height, arthritic lesions, and degradation of the ligaments, fibrous annulus and nucleus pulpous. These signals are used to graduate the disease, following Schneiderman *et al.* (ref in 10). The patients who presented 1 to 3 signals were classified as degree 1 of severity, while those presenting 4 to 5 signals and 6 to 7 signals were classified, respectively as degree 2 and 3. According to the level affected (cervical, thoracic and lumbar), the disc degeneration was classified as one level or multilevel.

2.3. Genotyping procedures

2.3.1 VDR polymorphism

Peripheral blood lymphocytes were collected in EDTA-containing tubes and genomic DNA was extracted from the samples, according to Gustincich *et al.* (17). The primers, sense 5'- AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' and antisense 5'- ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3', and polymerase chain reaction (PCR) conditions for amplifying exon 2 of VDR gene were carried out according to the methodology described by Harris *et al.* (18). The PCR conditions were 94°C for 30



seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds for 35 cycles and then submit to electrophoresis through a 2% agarose gel. Genotypes were classified as FF homozygotes, lack of *FokI* restriction site, resulting in a 265pb fragment; Ff heterozygotes, with 265 pb, 196 pb and 69 pb fragments, or ff homozygotes, with the presence of the restriction site which resulted into 196 pb and 69 pb fragments.

2.3.2 GSTT1 and GSTM1 polymorphisms

The polymorphism of the genes *GSTT1* and *GSTM1* were detected by a multiplex PCR gene amplification, described by Abdel-Rahman *et al.* (19). At the PCR procedure, 30pmol from each of the primers to the *GSTT1* (5'-TTCCTTACTGGTCCTCAATCTC-3'; 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA) *GSTM1* (5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'; 5'-GTTGGGCTAAATARACGGTGG-3') and *CYP1A1* (5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3'; 5'-CAGCTGCATTGGAAGTGCTC-3') genes, diluted in 2.5µL of a 10X buffer with 7.25µL ultra pure autoclaved water, 5µL dNTP, 1µL MgCl₂, and 0.25 µL TaqDNA polymerase. PCR conditions were 94° C for 4 minutes, 94° C for two minute for 40 cycles and 59° C for 1 minute. The final extent was complete of 72°C for 10 minutes. PCR products were submitted to an electrophoresis in 2% agarose gel and products obtained were observed as fragments of 480pb for the *GSTT1* gene, 215pb for the *GSTM1* gene, and 312pb for the *CYP1A1* gene. Just one allele determines the positive genotype (+/+), while the homozygous deletion represents the null allele (0/0).



2.4. Data Analysis

Regression analysis was used to examine the association between subjects' characteristics like occupation loading, smoking, weight and familial history with genotypes VDR and *GSTT1/MI*. Also, these characteristics were compared by analysis of variance. The distribution of the genotypes according to the severity of disc degeneration grades (1, 2 or 3) were tested, using the Mann-Whitney test. Differences between the frequencies of the polymorphisms and levels of lesions (1 or multilevel) were calculated by the exact Fisher's test. T-student test was performed to associate mean age of the disease onset with genotypes and risk factors. Chi-square and Fisher's test were used to compare gender, level and grade of the disease severity, genotypes and habits. Final results are listed with 95% confidence intervals and P value less than 0.05 was considered statically significant.

3. Results and Discussion

In this study the f allele frequencies of VDR-*FokI* polymorphism were underrepresented in healthy subjects and the same was observed in the patients, when the F allele was considered ($P=0,0001$). The distribution of Ff genotype was significantly higher in subjects presenting disc degeneration (81,8%; $P<0,0001$) while the FF genotype frequency (69,3%) was prevalent in the controls (Table 1).

Concerning the familial history for low back pain and discogenic disease, we found it in a significantly higher frequency in patients (78,8%) as compared to the controls (34,09%; $P<0,0001$). Furthermore, the presence of positive familial history and higher degrees of disease severity (grade 2 or higher of degeneration) were more accentuated in patients bearing the f allele ($P<0,0001$ and $P=0,0012$).



Literature data showed a pattern of increased degeneration with each f allele (20). According to that individuals bearing the ff genotype are expected to be more severely affected, followed by the Ff genotype. Our findings are in agreement with those reported. At the same time, the early onset of disc degeneration supports the genetic influence in the disease. In fact, our data showed that the mean age for the first sign of the disease was earlier in $_f$ genotype (26 years) compared with FF genotype (38 years).

The contribution of the *VDR FokI* polymorphism for the discogenic process may be explained in a structurally way, once a modification occurs in the VDR protein at the translation initiation site in exon 2. Consequently, it results in an F allele lacking the first site ATG, since the translation initiates at the second ATG site lacking the three NH₂ terminal amino acids, resulting one protein shorter. Otherwise, it does not occur with the f allele, which synthesizes the full length VDR protein or a protein of normal size (21). The different activity of the two proteins may be due to a difference in the ability to bind the active form of vitamin D (1, 25 dihydroxyvitamin D₃) (22;23). The VDR is activated by 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ and the binding with retinoid X receptor (RXR) will facilitated the high-affinity interaction between the complex with vitamin D responsive elements (VDREs) upstream of target genes. Afterwards, it will realize the attraction of basal transcription factor II B (TFIIB) and coactivators transcription to transcriptional activation (24;25).

Krohn et al. (26) found that vitamin D is involved in the proliferation and cell growth by the stimulation of IGF-I (growth factor insulin-like I) and receptor IGF-I. The vitamin D may active the promotor of IGF gene expressed in intervertebral disc tissue, and stimulates proteoglycan synthesis in the nucleus pulposus cells (ref in 10). Briefly, the presence of the



VDR-*FokI* polymorphism culminates in a normal protein size synthesis (f), which has decreased biological activity and, thus contributes to the degenerative disc disease.

Despite the genetic factors importance in the disc degeneration another factors seem to be involved. Among them, smoking and overweight can be appointed (9). Several studies identified the association between overweight and back problems (27;28;29). However, Leboeuf (30) in a review study found out that 21 of 65 studies showed positive association between overweight or obesity and low back pain. The same was found in the present study. When it was compared the presence of VDR-*FokI* genotypes in subjects with overweight, it was not found an association ($P=0,224$).

The relation of smoking habits with disc degeneration has been confirmed (6;8;31;32). The smoke compounds are able to decrease disc nutrition, the synthesis of proteoglycan, and collagen type II, resulting in alteration of the normal hydrostatic disc.(5;7).

Our study showed that the distribution of smoker patients was more prevalent among the subjects with FF genotype (80%) as compared with $_f$ genotype (20%; $P<0,0001$). In this case, the smokers even bearing the more active genotype in vitamin D binding (FF) will become more vulnerable. To better understand the association of smoking habit in the disc degeneration we searched for the GSTs polymorphisms, aiming to link the detoxification capacity of these genes concerning the tobacco compounds.

People with null *GSTM1* or *GSTM1* genotypes showed a reduced ability in a variability of environmental carcinogens detoxification as N-nitro-compounds and polycyclic aromatic hidrocarbons, compounds encountered in tobacco smoke (33;34), whose predispose the organisms to develop diseases environment- linked.



Our study did not find the participation of *GSTT1/MI* genes in liability of the disease. The frequencies found for *GSTT1* and *GSTMI* polymorphisms are shown in Table 2. There was no significant difference in genotype frequencies between the patients and controls ($P=0,84$; $P=0,14$). The same occurred when null and present *GSTT1/MI* genotypes were associated with smoking, overweight, severity and familial history of degenerative disc disease.

Our findings denoted an association between the *FokI* polymorphisms and early onset and, severity of the disease, once it was observed a increased degree of disc degeneration at the presence of each f allele. At the same time, we demonstrated the smoking involvement in the discogenesis process, independently of the favorable or unfavorable genotypes for the inactivation of cigarette chemical components. On the other hand, our data suggest that the association of *T1/MI* null genotypes and environmental factors, such as overweight are not involved with the disease process.

In conclusion, our data support the association of vitamin D receptor gene *FokI* polymorphism with the degenerative process of intervertebral disc.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).



REFERENCES

1. WALLACH, C.; GILBERTSON, L.; KANG, J. Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration. *Spine*, 28:593-598, 2003.
2. BHATIA, N.; WANG, J. Current information regarding the biochemical and genetic events that occur during disc degeneration. *Curr Opin Orthop*, 14: 153-158, 2003.
3. EISENSTEIN, S.; ROBERTS, S. Aspects of current management. The physiology of the disc and its clinical significance. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 85-B: 633-666, 2003.
4. GRUBER, H.E.; HANLEY, E.N.Jr. Recent advances in disc cell biology. *Lippincott Williams & Wilkins*, 28(2):186-193, 2003.
5. 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*, 9:135-141,2004.
6. SLOSAR, P.J.; PERKINS, R.B.; SNOOK, D. Effects of cigarret smoking on the spine: a focused review. *Spine*, 3(5):6-9, 2002.
7. KIM, K.S.; YOON, S.T.; PARK, J.S.; LI J.; PARK, MS, ; HUTTON, W.C. Inhibition of proteoglycan and type II collagen synthesis of disc nucleus cells by nicotine. *J. Neurosurg Spine*, 99(3):291-7, 2003.
8. MOHAMMED, A.; ANIL, K.; BOBBY, A.; ABHINAV, S.; MIKE, W.; ALLEN, G.. Effect of Nicotine on Spinal Disc Cells: A Cellular Mechanism for Disc Degeneration. *Spin*, 29(5):568-575,2004.
9. BATTIÉ, M.; VIDEMAN, P.; ERIC, P. Lumbar Disc Degeneration: Epidemiology and Genetic Influences. *Spine*, 29(23):2679-2690,2004.
10. KAWAGUCHI, Y.; KANAMORI, M.; ISHIHARA, H.; OHMORI, K.; MATSUI, H.; KIMURA, T. The association of lumbar disc disease with vitamin-D receptor gene polymorphism. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A: 2022- 2028, 2002.
11. FROES, N.; ABDEL-RAHMAN, S. FELDMAN, D. Vitamin D receptor gene polymorphisms: analysis of ligand binding and Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in Southeastern Brazilians. *Cancer Letters*, 180: 173- 182, 2002.
12. SOBTI RC, SHARMA S, JOSHI A, JINDAL SK, JANMEJA A. Genetic polymorphism of the CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer susceptibility in a north indian population. *Mol Cell Biochem*. 2004;266(1-2):1-9.



13. MILLER, D.; NEUBERG, D.; DE VIVO, I.; WAIN, J.C. ; LYNCH, T.J. ; SU, L.; CHRISTIANI, D.C. Smoking and the Risk of Lung Cancer: Susceptibility with GSTP1 Polymorphisms. *Epidemiology*, 14(5):545-551, 2003.
14. STUCKER, I.; HIRVONEN, A.; DE WAZIERS, I.; CABELGUENE, A.; MITRUNEN, K.; CÉNEE, S.; KOUM-BESSON, E.; HEMON, D.; BEAUNE, P.; LORIOT, M. Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 1-7, 2002.
15. GEISLER, A.S.; OLSHAN, A. F. Human Genome Epidemiology Network. *C D C*, 3(8): 1-10, 2002.
16. GILLILAND FD, LI YF, SAXON A, DIAZ-SANCHEZ D. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet*. 2004; 363(9403):119-25.
17. GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI G.; DEL SAL, G.; SCHNEIDER, C.; CARNINCI, P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, 11(3):298-300, 302, 1991.
18. 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*, 12:1043-1048, 1997.
19. ABDEL-RAHMAN, S.Z., EL-ZEIN, RA, ANWAR, WA, AU. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.*, 107: 229-233, 1996.
20. VIDEMAN, T.; LEPPAVUORI, J.; KAPRIO, J.; BATTIE, M.; KOSKENVUO, M. 1998 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. *Spine*, 23:2477-2485, 1998.
21. ZMUDA, J.; CAULEY, J.; FERRELL, R. Vitamin D receptor variants and osteoporosis. *Epidemiologic Review*, 22:203-217, 2000.
22. 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 codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in japanese women. *Jornal of Bone and Mineral Research*, 12(6):915, 1997.
23. WHITFIELD, G.K.; REMUS, L.S.; JURUTKA, P.W.; ZITZER, H.; OZA, A.K.; DANG, H.T.L.; HAUSSLER, C.A.; GALLIGAN, M.A.; THATCHER, M.L.; DOMINGUEZ, C.E.; HAUSSLER, M.R. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177:145-159, 2001.

24. HAUSSLER, M.R.; CHANDLER, J.S.; PIKE, J.W.; BRUMBAUGH, P.F.; SPEER, D.P.; PITT, M. Physiological importance of vitamin D metabolism. *Prog. Biochem. Pharmacol*, 17:134-142, 1998.
25. 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*, 23:186, 2000.
26. KROHN, K.; HAFFNER, D.; HUGEL, U.; HIMMELE, R.; KLAUS, G.; MEHLS, O.; SCHAEFER, F. 1,25(OH)₂D₃ and Dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcified Tissue International*, 10:160-9, 2003.
27. BOSTMAN, O.M. Prevalence of obesity among patients admitted for elective orthopaedic surgery. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 18(10):709-13, 1994.
28. KANGAS, K.L.; LEINO-ARJAS, P.; RIIHIMAKI, H.; LUUKKONEN, R.; KIRJONEN, J. Smoking and overweight as predictors of hospitalization for back disorders. *Spine*, 28(16):1860-8, 2003
29. BEJIA, I.; YOUNES, M.; ZROUR, S.; TOUZI, M.; BERGAOUI, N. Factors predicting outcomes of mechanical sciatica: a review of 1092 cases. *Joint Bone Spine*, 71(6):567-71, 2004.
30. LEBOEUF, Y.C. Body weight and low back pain. A systematic literature review of 56 journal articles reporting on 65 epidemiologic studies. *Spine*, 25(2):226-37, 2000.
31. BATTIÉ, M.C.; VIDEMAN, T.; GILL K. Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration: An MRI study in identical twins. *Spine*, 16:1015-1021, 1991.
32. IWAHASHI, M.; HIROMI, M.; YASUAKI, T.; KEN, W.; YOSHINAO, U. Mechanism of Intervertebral Disc Degeneration Caused by Nicotine in Rabbits to Explicate Intervertebral Disc Disorders Caused by Smoking. *Spine*, 27(13):1396-1401, 2002.
33. AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotics metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mut. Research* 2000; 464:65-76.
34. PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat Res.*, v.465, p.285-308, 2000.



Table 1: Allelic and genotypic distribution concerning VDR-*FokI* polymorphism in patients with disc degeneration and controls.

Allele	Patient		Control		P*
	N	Frequency%	N	Frequency%	
F	72	0,54	149	0,85	0,0001
f	60	0,46	27	0,15	
Total	132	1,00	176	1,00	
Genotypes	N	%	N	%	
FF	09	13,6	61	69,3	0,0001
Ff	54	81,8	27	30,7	0,0001
Ff	03	4,6	0	0	0,0767
Total	66	100	88	100	

*Fisher test; N= number of subjects.

Table 2: Genotypic distribution concerning GSTT1 and GSTM1 polymorphism in patients with disc degeneration and controls.

Genotypes	Patient		Control		P*
GSTT1	N	Frequency%	N	Frequency%	
+/+	52	78,80	71	80,70	0,84
0/0	14	21,20	17	19,30	
Total	66	100,00	88	100,00	
GSTM1					
+/+	35	53,00	58	65,90	0,14
0/0	31	47,00	30	34,10	
Total	66	100	88	100	

*Fisher test; N= number of subjects ;+/:present gene; -/-: absent gene .

APÊNDICE 4

Artigo a ser submetido à publicação na revista *Acta Ortopédica*



T. 1406/05



INFLUÊNCIA GENÉTICA DA DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL

NÍVEA D. T. CONFORTI FROES & FRANCINE NUNES

RESUMO

As doenças que afetam o sistema músculo-esquelético acometem centenas de milhões de pessoas no mundo e estão entre as causas mais comuns de invalidez e sofrimento crônico. A doença articular degenerativa constitui uma exacerbação do processo de envelhecimento, estando envolvidos nesse processo, os fatores genéticos, ambientais ou lesões traumáticas, deformidades e doenças preexistentes da coluna. Muito se tem discutido sobre os múltiplos fatores envolvidos na degeneração discal, mas sua etiologia permanece indeterminada. Contudo, atualmente a participação da genética parece muito mais forte do que se suspeitava anteriormente. Neste artigo, é abordada a participação de alguns genes no processo discogênico, bem como o que isso representa para o melhor entendimento da etiopatogênese da doença, bem como na melhora de seu tratamento.

ABSTRACT

Musculoskeletal disorders such as lumbar disc disease are among the most common conditions for which patients seek medical care worldwide. It is a major cause of work disability and an extremely costly health care problem. Degeneration of the intervertebral disc and its associated clinical manifestations are a significant source of patient pain and morbidity and utilizing an increasing percent of health care resources. This process results in changes to the composition and the characteristics of the disc. Nevertheless, the etiology of the disease remains to be determined. Nowadays, the genetic role is very much considered compared with it was suspected before. This article aims to approach the genetic involvement in disc degeneration and, what it represents focusing in better understanding the disease etiopathogenesis and, improvement in its treatment, as well.



Introdução

O conhecimento atual das doenças degenerativas sugere uma etiopatogênese multifatorial, onde a genética desempenha um papel primário, orquestrando os eventos patológicos, além de determinar marcantes diferenças no fenótipo da doença de paciente para paciente. Os genes podem atuar como fatores de suscetibilidade, aumentando os riscos de desenvolvimento da doença, ou podem atuar como fatores reguladores, modulando a magnitude e severidade do processo patogênico, bem como a resposta ao tratamento com drogas⁹.

Conhecendo um pouco sobre a dor

A dor, segundo o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada ou descrita em termos de lesões teciduais”. Entretanto, muitas vezes ela se manifesta mesmo na ausência de agressões nos tecidos, como ocorre em casos de neuropatia periférica ou central e em certas afecções psicopatológicas.

A Associação Norte-americana de Dor refere-a como o “quinto sinal vital” e como tal deve ser considerada seriamente. Se a dor fosse estimada com o mesmo zelo que outros sinais vitais o são, ter-se-ia uma melhor chance de tratá-la apropriadamente.

Com relação à população brasileira, estima-se que a dor crônica acometa entre 30 a 40% dos indivíduos, representando 75 a 80% das consultas ao sistema de saúde, o que justifica ser a principal causa de absenteísmo, licenças médicas, aposentadoria por doença, indenizações trabalhistas e baixa produtividade. Nos Estados Unidos da América aproximadamente 89 bilhões de dólares são gastos anualmente pelo sistema de saúde para o tratamento, compensações trabalhistas e litígios envolvendo doentes com dor crônica. Somados aos custos indiretos, aquele país consome cerca de 150 bilhões de dólares por ano com a dor. Apesar de não haver dados precisos sobre a situação brasileira, supõe-se que o problema tenha, entre nós, no mínimo, a mesma magnitude.



A dor em doenças musculoesqueléticas

As doenças que afetam o sistema músculo-esquelético acometem centenas de milhões de pessoas no mundo e estão entre as causas mais comuns de invalidez e sofrimento crônico. Elas compreendem as lesões nos ossos, articulações, músculos, ligamentos, tendões e nervos periféricos. Dentre essas doenças, podem ser citadas a osteoporose, as algias vertebrais, cujo tipo mais comum é a lombalgia, as artrites, as lesões de repetição (LER/DORT), as deformidades vertebrais, as fraturas e as luxações.

Essas condições patológicas figuram como as principais responsáveis pela liderança no número de consultas médicas e serviços de pronto atendimento, quando comparadas às outras enfermidades. Segundo dados da Academia Americana de Ortopedia, um em sete americanos apresenta enfraquecimento muscular e esquelético, com um custo anual total de duzentos e quinze bilhões de dólares.

Apesar da gravidade dos fatos, é real a falta de atenção, por parte da comunidade médica, mídia e autoridades governamentais com relação à essas doenças. Embora, todos os setores da sociedade estejam passíveis de apresentar uma dessas patologias, há a percepção errônea de que elas sejam menos sérias do que outras doenças, em consequência de serem menos fatais.

Independente do fator mortalidade, mas considerando-se a morbidade, as lombalgias merecem atenção especial. Elas figuram entre as lesões musculoesqueléticas de maior prevalência, sendo uma das causas mais frequentes de absenteísmo no trabalho, gerando consequentemente perda de produtividade nos países industrializados. Quatro em cinco adultos apresentarão um episódio de dor nas costas em suas vidas e em muitos casos, esses episódios são severos e não respondem à melhora, a menos que seja administrado tratamento específico. É importante ressaltar que 5% do total desses casos conduzem à invalidez permanente, com enorme prejuízo em diferentes níveis, haja vista a necessidade de pagamento de salários e benefícios, bem como a substituição e treinamento de mão de obra especializada. Dos que conseguem voltar ao trabalho, 50% o fazem após seis meses de afastamento e 25% após um ano. Uma parcela significativa de trabalhadores jovens (20 a 50 anos de idade) é obrigada a mudar de função, em decorrência da dor que impede a capacidade funcional específica.



A patologia básica responsável por vários problemas de dor nas costas permanece sem conclusão. Os supostos fatores causais incluem várias estruturas espinais e processos patofisiológicos, tais como ruptura do anel fibroso, irritação da raiz nervosa por compressão ou efeitos bioquímicos de exposição ao núcleo pulposo, mudanças neuropáticas e inflamação nos neurônios que enervam os tecidos. Contudo, o disco intervertebral permanece como sendo de grande interesse, uma vez que sua degeneração pode influenciar uma variedade de estruturas e processos que, acredita-se serem participativos na origem da dor. Do mesmo modo, o disco serve como foco de numerosos tratamentos de intervenção, sejam eles conservadores ou cirúrgicos para os sintomas relacionados à coluna ²¹.

Doença do Disco Lombar

A espinha dorsal é uma coluna articulada de vértebras, onde cada par de vértebras é capaz de se mover, graças ao disco intervertebral e às duas facetas articulares posteriores. Qualquer anormalidade que ocorra nessas articulações terá conseqüências nocivas.

Cada articulação intervertebral discal é uma sínfese formando uma unidade de acoplamento entre duas vértebras (corpos vertebrais), onde se observam três partes, ou seja, o núcleo pulposo, anel fibroso e a cartilagem hialina das placas terminais das superfícies opostas de cada corpo vertebral. O disco intervertebral contém uma abundante matriz extracelular de proteoglicanos e colágeno. A camada externa, o anel fibroso, consiste principalmente, de colágeno I, enquanto a estrutura interna do disco, denominada núcleo pulposo, é constituída de cerca de 50% de proteoglicanos, principalmente o agrecan e 20% de colágeno II. Ambos contêm pequenas quantidades de colágeno IX ².

Nos indivíduos jovens, os feixes entrelaçados no anel fibroso lhe proporcionam a elasticidade, que se opõe ao turgor do núcleo pulposo. Em pessoas entre 30 e 40 anos, os núcleos têm um conteúdo de água de 80%, que acredita-se diminuir com a idade. Em 1935, De Pukey observou que uma pessoa está 1% mais baixa em sua altura, no fim do dia, em comparação de quando se levanta. Do mesmo modo, foi também por ele observado que, uma pessoa na primeira década de vida está 2% mais baixa ao ir deitar-se e na oitava década de vida, 0,5% mais baixa na mesma condição. A hidrodinâmica do disco resulta da estrutura do gel do núcleo pulposo, dada pela presença de proteoglicanos, permitindo que o mesmo absorva nove vezes o seu volume de água. Nenhuma ligação química influencia



esse conteúdo de água, dessa forma a sustentação de peso causa a diminuição de 1% da altura média em um dia ³.

De modo geral, com os movimentos de extensão, flexão e curvatura lateral, os corpos vertebrais deslizam sobre o núcleo pulposo túrgido, que se comporta como um ponto de apoio esférico. O núcleo pulposo não possui nervos, tampouco vasos sanguíneos, sendo sua nutrição efetuada por meio da difusão do líquido intersticial ao longo de minúsculos canais situados nas placas cartilaginosas terminais dos corpos vertebrais. Por ser elástico, o núcleo é resistente às lesões ¹⁸. O núcleo pulposo, que ocupa cerca da metade da área da superfície do disco, suporta a carga vertical, enquanto o anel fibroso o faz para a carga tangencial.

A doença articular degenerativa inclui duas condições inter-relacionadas, a primeira atingindo as articulações intervertebrais discais (doença degenerativa discal) e a segunda, as articulações facetárias posteriores (doença articular degenerativa ou osteoartrite), sendo ambas uma exacerbação do processo de envelhecimento, estando envolvidos nesse processo, os fatores genéticos, ambientais ou lesões traumáticas, deformidades e doenças preexistentes da coluna. A degeneração do disco e subseqüentes alterações nas vértebras e ligamentos adjacentes são denominadas espondilose ³.

Os pacientes que procuram auxílio médico para alívio da dor são de todas as idades, classes sociais e raças, assim sendo essa doença é um problema universal, que não leva à morte, mas muitas vezes incapacita para o trabalho o indivíduo ainda produtivo, forçando-o a uma aposentadoria precoce.

A doença do disco lombar é uma patologia musculoesquelética comum, que afeta cerca de 5% de todos os indivíduos e caracteriza-se pela herniação do disco, com conseqüente irritação da raiz, tanto por processos mecânicos, quanto pela via de mediadores inflamatórios. Como resultado, surge a dor que se irradia e é conhecida como ciática ¹.

A degeneração do disco tem sido atribuída ao acúmulo de efeitos ambientais, primariamente agressões e traumas, hábitos de vida, tabagismo, aterosclerose, acrescidas das mudanças que ocorrem com o envelhecimento. Achados recentes, no entanto demonstram que esses efeitos influenciam modestamente a degeneração discal, o que reforça a importância da participação dos fatores genéticos nessa patologia ²¹.

O primeiro a relatar a herniação do disco intervertebral foi Luskka, em 1858, sendo que apenas 80 anos mais tarde surgiram as hipóteses para explicar o mecanismo dessa



lesão, atribuído à expulsão do núcleo pulposo, como resultado da compressão espinal excessiva. Uma das hipóteses para explicar o processo químico do prolapso do disco refere-o como um distúrbio da síntese de proteína, favorecendo o aumento ou desequilíbrio na despolimerização, com alterações no metabolismo de proteoglicanos, aumentando desse modo, o conteúdo do fluido e consequentemente a tensão intra-discal ³.

Estudos anatômicos demonstram a presença de extremidades nervosas nociceptivas no anel fibroso do disco intervertebral. Desse modo, lesões anelares podem causar dor irradiada de origem puramente discogênica para a coluna lombar, nádega, região sacro-ilíaca e extremidade interior, mesmo na ausência de compressão neural ¹⁷.

O Papel da Genética na Degeneração Discal

Considera-se, nos dias atuais que a genética atua de modo incisivo na prática da medicina, promovendo a predição e prevenção de doenças e, por conseguinte, impulsionando a saúde pública. A epidemiologia é outra área da ciência encarada como o núcleo científico da saúde pública. Nas duas últimas décadas, os métodos e recursos epidemiológicos têm sido intensamente integrados com os da genética, o que originou a disciplina epidemiologia genética, que visa encontrar o significado dos genes na ocorrência de doenças em populações e famílias. Por outro lado, aliando as novas tecnologias moleculares aos conhecimentos de epidemiologia e genética, emergiu a epidemiologia molecular, que busca o estudo da doença, por meio do emprego de marcadores biológicos ⁸.

Muito se tem discutido sobre os múltiplos fatores envolvidos na degeneração do disco intervertebral, cuja etiologia permanece por ser determinada. Contudo, é eminente a participação da genética, cujo papel na degeneração do disco é muito mais forte do que se suspeitava anteriormente ³. O componente genético tem sido identificado nos estudos de gêmeos e agregação de famílias ¹⁰, bem como na detecção de polimorfismos genéticos relacionados no seu aparecimento ⁶.

Essa enfermidade é considerada uma das doenças musculoesqueléticas mais comuns e está entre aquelas condições em que os pacientes buscam por cuidados médicos. Além disso, é computada como uma patologia cara, debilitadora e uma das mais complexas condições para proceder ao tratamento correto ¹³. Embora, os estudos clínicos tenham proporcionado esclarecimentos na prevalência e condução de tratamento, atribui-se aos



recentes avanços nos mecanismos moleculares, o melhor entendimento de como mutações genéticas podem contribuir ao desenvolvimento dessa patologia ¹⁰.

Estudo conduzido em pacientes adultos portadores de degeneração do disco intervertebral demonstrou que esses indivíduos apresentavam probabilidade duas vezes maior de história familiar da doença, estando as mulheres mais frequentemente afetadas, em comparação aos homens ¹⁹. Tais resultados são corroborados por outros ¹⁶, que relatam a significativa presença dessa patologia naqueles, cujos parentes próximos sofreram intervenção cirúrgica para hérnia de disco. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos expostos à atividade de risco, como carregadores de peso, motociclistas ou tarefas com equipamentos de vibração ou que exigem prolongada postura sentada. Estudos epidemiológicos realizados anteriormente ^{14; 15} igualmente confirmam uma prevalência maior de doença discogênica em membros imediatos de famílias com diagnóstico de tal patologia, quando comparados aos controles.

A agregação familiar sugere que o disco intervertebral desses indivíduos possuam aspectos singulares. A expressão desses fatores hereditários conduz à alterações na estrutura ou meio bioquímico do disco, tornando-o mais suscetível à lesão e subsequente herniação. Esse processo é passível de atuar em sinergia com outros fatores ambientais, como hábitos de vida e ocupação, além do envelhecimento.

Do mesmo modo, o fator genético contribui para a degeneração discal em adolescentes ¹², sendo que a história familiar de herniação efetiva-se como fator de risco para a patologia em questão, em indivíduos menores de 21 anos. Similarmente, a realização da cirurgia em membros da família tem implicação significativa na evolução da doença em adolescentes ¹¹.

Genes Agrecan e Receptor da Vitamina D na Degeneração Discal

Gene Agrecan

O gene agrecan é o maior gene estrutural da cartilagem, expresso em altos níveis somente nesse tecido, embora baixos níveis de expressão do agrecan tenham sido relatados na notocorda. O agrecan é composto de dois tipos de elementos estruturais, um núcleo central estendido e três domínios flanqueadores globulares. Dois desses domínios estão na porção amino terminal e compartilham homologia com a proteína de ligação; um domínio,



pelo menos o G1, liga-se fortemente ao hialuronan e proteína ligante, localizando efetivamente, a molécula na cartilagem matriz. O terceiro domínio globular, G3, divide aspectos estruturais intrigantes com a família de moléculas da célula de adesão e pode prover, igualmente, interações com outra célula ou componentes da matriz. O tamanho da molécula é dado por cerca de 100 cadeias de sulfato de condroitina ligados a resíduos específicos de serina na porção central do núcleo da proteína, a região de ligação do sulfato de condroitina, ou domínio CS¹.

O agrecan está localizado no braço longo do cromossomo 15, região 25-26.2 (15q 25-26.2) e codifica para uma proteína do núcleo proteoglicano, com uma extensão do domínio central que carrega a glicosaminoglicana, flanqueada pelos domínios globulares em cada extremidade. A região central consiste de longas extensões de repetições de aminoácidos, que servem como sítios de ligação para as glicosaminoglicanas, tais como a condroitina e sulfato de queratan; os domínios globulares terminais interagem com outros componentes da cartilagem. A região de ligação da glicosaminoglicana é codificada em muitas espécies por um único exon grande, dentro do qual encontram-se muitos tipos de seqüências repetidas. Muitas espécies mostram dentro desse exon, um bloco similar de repetições conservadas para a ligação do sulfato de condroitina, entretanto no homem, esse grupo de repetições é particularmente conservado.

O exame do DNA genômico de uma população de indivíduos não relacionados, mostrou que o bloco de seqüências repetidas existe em uma forma alélica múltipla, que difere pelo número de variável de repetições em tandem (*VNTR*), nesse sítio codificador, em cada alelo. Esse polimorfismo parece restrito à espécie humana e resulta na produção de diferentes comprimentos de proteínas com núcleo agrecan, carregando números diversos de sítios de ligação potencial para o sulfato de condroitina ⁴.

Como visto anteriormente, o disco intervertebral consiste, principalmente de proteoglicanos e colágenos, sendo o primeiro, responsável pela função de “suportar a carga” do disco. Desse modo, presume-se que os genes que codificam para os proteoglicanos atuem de modo significativo na degeneração discal. A partir do conhecimento da existência dos *VNTR*, sabe-se que esse polimorfismo resulta em proteínas com diferentes comprimentos do núcleo agrecan, o que pode levar à mudanças nas propriedades funcionais da cartilagem.



Assim sendo, o gene *agrecan* foi escolhido como candidato marcador de associação entre o polimorfismo do gene e a doença do disco ⁷. Para tanto, foram recrutadas 64 mulheres jovens, com e sem problemas nas costas e mais 15 casos de pacientes submetidos à cirurgia da coluna lombar. Foram excluídos os participantes envolvidos com trabalho físico pesado, bem como os fumantes. O grau de degeneração foi determinado de acordo com a classificação de Schneiderman, ou seja, grau 1 (normal), grau 2 (intermediário, intensidade de sinal heterogêneo diminuído), grau 3 (marcado, perda difusa de sinal), grau 4 (ausente, sinal anulado). A herniação do disco foi avaliada pelo critério de MacNab como sendo normal ou dos tipos protrusão, extrusão e seqüestro do disco herniado. O estudo revelou que os indivíduos portadores de degeneração discal grave e em múltiplos níveis possuíam o gene *agrecan* com curta extensão nos números de repetição em tandem (*VNTR*). Esses achados sugerem que tais indivíduos apresentam um risco significativo de degeneração discal, mesmo em idade jovem. O mecanismo pelo qual o gene *agrecan* encurtado está relacionado ao aparecimento precoce dessa patologia parece razoável, uma vez que o núcleo da proteína *agrecan* está modificado com cadeias glicosaminoglicanos, incluindo o sulfato de queratan e de condroitina. A alta pressão osmótica do *agrecan* é atribuída, principalmente, à natureza poli- eletrolítica dessas cadeias de glicosaminoglicano. Desse modo, o encurtamento dessas cadeias confere uma menor capacidade do disco em conter a água, resultando na antecipação do processo degenerativo.

Gene Receptor da Vitamina D

A vitamina D regula a homeostase de cálcio e a mineralização óssea e sua ação é mediada pelo receptor da vitamina D (*VDR*) que pertence à família de receptores de hormônios esteróides, ativados aos fatores de transcrição. O gene que codifica para o *VDR* está localizado no cromossomo 12, região centromérica e início do braço longo desse cromossomo (12cen-q12), contém 14 exons e possui aproximadamente 75 kilobases de DNA genômico. Os exons IA até IF codificam para a região 5' não traduzida, os exons II e III codificam para as regiões de domínio de ligação ao DNA e os exons IV a IX para a região de união ao ligante ²².

A forma hormonal da vitamina D (1, 25 dihidroxi vitamina D₃) é necessária para o processo de mineralização do osso, absorção de cálcio do intestino, controle do cálcio,



homeostase de fósforo e regulação do hormônio paratiróideo. Os receptores da vitamina D são polipeptídeos intracelulares que se ligam, especificamente, com a 1,25 dihidroxi vitamina D3 e interagem com núcleos de células alvos para produzirem uma variedade de efeitos biológicos.

O gene *VDR* contém muitos polimorfismos intra- gênicos associados com a densidade óssea e a formação do osteófito. No polimorfismo *Fok I*, ocorre a transição de timina por citosina (ATG para ACG) no primeiro dos dois sítios potenciais de iniciação no exon II. Indivíduos com o alelo C (designados por F) iniciam a transcrição no segundo sítio ATG e não possuem os três aminoácidos NH₂-terminal em toda a extensão da proteína VDR, ou seja, a proteína é mais curta em três aminoácidos. A ausência do sítio polimórfico *FokI* indica que a tradução da proteína foi iniciada no primeiro sítio ATG e, portanto, os indivíduos portadores desse genótipo (ff) sintetizam a proteína em toda sua extensão de 427 aminoácidos. Essa diferença estrutural pode afetar a função de VDR e consequentemente influenciar a remodelação e a densidade mineral óssea. Há evidências sugerindo que o alelo f mais longo pode ser menos ativo, atuando com eficiência reduzida⁵.

Além do metabolismo mineral, esse gene promove a ação de outros genes expressos nos tecidos conectivos. Por exemplo, a síntese de osteocalcina, a proteína não colagenosa mais abundante no osso, é induzida pela forma hormonal da vitamina D, através do *VDR* e um elemento responsivo específico da vitamina D no gene promotor da osteocalcina. Devido a essa atividade na função reguladora nos passos metabólicos da vitamina D, os mecanismos pelos quais a presença de variações polimórficas afetam o osso, a cartilagem e a degeneração do disco podem resultar em variações na expressão tanto de componentes estruturais comuns do tecido conectivo ou de proteínas específicas do tecido²¹.

Estudos recentes demonstram que alelos específicos do *VDR* estão associados com a degeneração discal, o que suporta a existência de determinantes genéticos nessa patologia^{21; 6}.

Partindo do conhecimento de que o osso e a cartilagem são compostos, em parte, dos mesmos tecidos conectivos dos discos intervertebrais, foi estudada a associação dos polimorfismos do *VDR* com a degeneração discal, determinada pela medição quantitativa da intensidade do sinal e determinação qualitativa da intensidade do sinal, protrusão e altura do disco, em imagens de ressonância magnética²¹. Os participantes desse estudo foram



selecionados, a partir de uma população de gêmeos finlandeses, nação que possui todos os pares de gêmeos nascidos antes de 1958 e vivos em 1975.

Os resultados mostraram que os dois polimorfismos intra-gênicos, detectados pelo *Fok I* e *Taq I*, separados por aproximadamente 35 kilobases no gene *VDR*, estão associados com os achados de degeneração no disco intervertebral. A avaliação quantitativa da intensidade do sinal em vértebras torácicas e lombares para o polimorfismo *Taq I* demonstraram o mais alto grau de degeneração nos discos intervertebrais T6-S1 de indivíduos com genótipo homozigoto recessivo (tt), grau intermediário para os portadores do genótipo heterozigoto (Tt) e a menor degeneração naqueles com genótipo homozigoto dominante (TT). Do mesmo modo, um padrão similar foi encontrado para o polimorfismo *Fok I*. Não foram encontradas associações entre os genótipos *Taq I* e os aspectos qualitativos avaliados. Contudo, o mesmo não ocorreu com os genótipos *Fok I*, visto que os indivíduos FF apresentaram menor degeneração qualitativa na intensidade de sinal, protrusão e altura do disco, enquanto esses aspectos foram piores para os indivíduos Ff e ff.

Desse modo, o estudo provê evidências que substanciam a existência de determinantes genéticos na degeneração de disco intervertebral lombar. De modo não surpreendente, a associação foi mais forte, quando medidas de degeneração, mais sensíveis e de maior reprodutibilidade, foram usadas na definição do fenótipo. Esses achados enfatizam o significado da precisa determinação de fenótipos clínicos na investigação dessa complexa patologia.

A associação entre o polimorfismo *Taq I* e a degeneração do disco lombar foi igualmente avaliada ⁶, sendo que os achados reforçam o risco aumentado de degeneração grave e em múltiplos níveis, bem como a presença de herniação, em indivíduos jovens, portadores do genótipo mutante.

Assim sendo, a história familiar positiva pode fortalecer o diagnóstico clínico e prover, adicionalmente, meios eficazes de identificar indivíduos de alto risco, que podem beneficiar-se das estratégias preventivas, como o aconselhamento vocacional, modificações de atitudes no trabalho e de vida e promover a adoção de exercícios preventivos para o fortalecimento e educação postural.

É inquestionável a possibilidade de prevenção dessas doenças, como também o é a importância da pesquisa multidisciplinar, que emprega o uso de marcadores genéticos



aliados ao acompanhamento clínico, como ferramentas precisas no melhor entendimento da etiologia da doença.

Dessa maneira, a união de esforços flexibilizará as opções de programas efetivos de prevenção e diagnóstico, a detecção de fatores de risco e o delineamento do tratamento específicos e individualizados, expandindo assim o alcance de cura. Aliar o conhecimento da condição genética de indivíduos afetados com os achados clínicos auxiliará sobremaneira na prevenção dessas condições, bem como no estabelecimento de protocolos de tratamentos com medicação específica e individualizada.

Segundo declarações publicadas no editorial da revista *The Back Letter*²⁰, se há o desejo de melhor entender a etiopatogênese da degeneração do disco intervertebral, é necessário estudar os determinantes mais dominantes, que parecem ser os genéticos. Esses aspectos parecem ser possibilidades brilhantes, pois se for encontrado um gene defeituoso ou um polimorfismo que tenha maior efeito na doença, isso torna possível tratá-la. É absolutamente crítico entender a gênese da doença, antes de tratá-la de modo específico. Afinal, existe uma excelente razão para perseguir as causas genéticas, uma vez que 50 anos de pesquisa em dor na coluna não conduziram a aberturas de caminhos maiores no conhecimento científico de grandes consequências.



1. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes- Mestre e Doutor em Genética pela Universidade Estadual Paulista, UNESP; Pós- Doutor pela Universidade do Texas, Departamento de Medicina Preventiva, Galveston, EUA.

Laboratório de Epidemiologia Molecular- Universidade Estadual Paulista-UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto.

E-mail: nfroes@ibilce.unesp.br

2. Francine Teresa Brioni Nunes- mestranda em Genética pela Universidade Estadual Paulista, UNESP.

Laboratório de Epidemiologia Molecular- Universidade Estadual Paulista-UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto.

E-mail: framnunes@ig.com.br



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALA-KOKKO, L. Genetic risk factors for lumbar disc disease. *Ann Med*, 34: 42-47, 2002.
- 2- ANNUNEN, S.; PAASSILTA, P.; LOHINIVA, J.; ALA-KOKKO, L. Na allele of *COL9A2* associated with intervertebral disc disease. *Science*, 285: 409-412, 1999.
- 3- COX, J. Biomecânica da coluna lombar. IN COX, J. Dor Lombar. Editora Manole. 6ª edição. São Paulo, 2002, p.17-129.
- 4- DOEDGE, K.; COULTER, S.; MEEK, L.; MASLEN, K.; WOOD, J. A human-specific polymorphism in the coding region of the aggrecan gene. Variable number of tandem repeats produce a range of core protein sizes in the general population. *Journal of Biological Chemistry*, 272:13974-13979, 1997.
- 5- 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*, 12:1043-1048, 1997.
- 6- KAWAGUCHI, Y.; KANAMORI, M.; ISHIHARA, H.; OHMORI, K.; MATSUI, H.; KIMURA, T. The association of lumbar disc disease with vitamin-D receptor gene polymorphism. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A: 2022- 2028, 2002.
- 7- KAWAGUCHI, Y.; OSADA, R.; KANAMORI, M.; ISHIHARA, H.; OHMORI, K.; MATSUI, H.; KIMURA, T. Association between na aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. *Spine*, 24: 2456-2466, 1999.
- 8- KHOURY, M. Human genome epidemiology: translating advances in human genetics into population-based data for medicine and public health. *Genetics in Medicine*, 1: 71-73, 1999.
- 9- MAIMONE D., DOMINICI R.,GRIMALDI LME. Pharmacogenomics of neurodegenerative diseases. *Eur J Pharmacol.*, v.413, p.11-29, 2001.
- 10- MARINI, J. C. Genetic risk factors for lumbar disc disease. *JAMA*, 285: 1-7, 2001.
- 11- MATSUI, H.; KANAMORI, M.; ISHIHARA, H.; YUDOH, K.; NARUSE, Y.; TSUJI, H. Familial predisposition for lumbar degenerative disc disease: a case-control study. *Spine*, 23:1029-1034, 1998.



- 12- MATSUI, H.; TERAHATA, N.; TSUJI, H.; HIRANO, N.; NARUSE, Y. Familial predisposition and clustering for juvenile lumbar disc herniation. *Spine*, 17: 1323-1328, 1992.
- 13- MODIC, M. T. Degenerative disc disease and back pain. *Magn Reson Imaging Clin N Am*, 7:481-491, 1999.
- 14- PORTER, R. W.; OAKSHOTT, G. H. L. Familial aspects of disc protrusion. *J Orthop Rheumatol*, 1: 173-178, 1988.
- 15- POSTACCHINI, F.; LAMI, R.; PUGLIESE, O. Familial predisposition to discogenic low back pain: an epidemiologic and immunogenetic study. *Spine*, 13: 1403-1406, 1988.
- 16- RICHARDSON, J. K.; CHUNG, T.; SCHULTZ, J.S., HURVITZ, E. A familial predisposition toward lumbar disc injury. *Spine*, 22: 1487- 1492, 1997.
- 17- SAAL, J.A. Eletrophysiologic evaluation of lumbar pain: establishing the rationale for therapeutic management. *Spine: State of the Art Reviews*. 1: 21-28, 1986.
- 18- SALTER, R. Distúrbios e Lesões do Sistema Musculoesquelético. Editora Médica e Científica. São Paulo/ Minas Gerais. 3ª edição. 2001, p. 259-305.
- 19- SIMMONS, E. D.Jr; GUNTUPALLI, M.; KOWALSKI, J. M., BRAUN, F.; SEIDEL, T. Familial predisposition for degenerative disc disease: a case-control study. *Spine*, 21: 1527-1529, 1996.
- 20- THE BACK LETTER. Published by Lippincott Williams & Wilkins, vol 14: 97-104, 1999.
- 21- VIDEMAN, T.; LEPPAVUORI, J.; KAPRIO, J.; BATTIE, M.; KOSKENVUO, M. 1998 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. *Spine*, 23:2477-2485, 1998.
- 22- ZMUDA, J.; CAULEY, J.; FERRELL, R. Vitamin D receptor variants and osteoporosis. *Epidemiologic Review*, 22:203-217, 2000.



