

# FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NA DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL

## GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS INVOLVED ON INTERVERTEBRAL DISC DEGENERATION

FRANCINE TERESA BRIONI NUNES<sup>1</sup>; NÍVEA DULCE TEDESCHI CONFORTI-FROES<sup>2</sup>; WILSON FÁBIO NEGRELLI<sup>3</sup>; DOROTÉIA ROSSI SILVA SOUZA<sup>4</sup>

### RESUMO

A etiologia da degeneração do disco intervertebral (DDI) ainda não está totalmente esclarecida. O gene do receptor da vitamina D (VDR) tem sido apontado como um dos possíveis envolvidos no surgimento das discopatias. Por outro lado, este estudo relaciona pela primeira vez, a participação dos genes das glutation transferases M1 e T1 (GSTT1 e GSTM1), responsáveis pela inativação dos componentes do cigarro, na DDI. Foi extraído DNA de leucócitos de 66 pacientes e 88 controles, pareados por gênero e idade. O polimorfismo VDR-FokI foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguido de restrição com a enzima FokI. Os polimorfismos das GSTT1/M1 foram determinados por meio da PCR multiplex. 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). A idade de surgimento da doença mostrou-se precoce nos indivíduos com genótipo *\_f* (média de 26 anos). Foi encontrada associação do polimorfismo FokI com a degeneração precoce e gravidade da DDI, sendo que o hábito de fumar também interferiu nesse processo, independente da presença ou não do genótipo favorável para GSTT1/M1.

**Descritores:** Fatores de risco; Polimorfismo genético; Disco intervertebral.

### SUMMARY

The etiology of intervertebral disc degeneration (IDD) has not been fully clarified yet. Vitamin D receptor's gene (VDR) has been suggested as one of the potential entities involved in disc pathologies onset. On the other hand, this study correlates, for the first time, glutathione transferases M1 and T1 genes (GSTT1 and GSTM1) participation, which are responsible for cigarette components' inactivation, in IDD. DNA was extracted from leukocytes of 66 patients and 88 controls, paired by gender and age. The VDR-FokI polymorphism was amplified by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction with FokI enzyme. GSTT1/M1 polymorphisms were determined by means of PCR multiplex. Family history and disease severity were highlighted in patients carrying the f allele of the VDR-FokI gene (P=0.000 and 0.0012, respectively). The age at disease onset has shown to be early in individuals with *\_f* genotype (average 26 years old). A correlation was found between FokI polymorphism and early degeneration and IDD severity, with smoking habit also interfering in this process, regardless of the presence or absence of a favorable genotype for GSTT1/M1.

**Keywords:** Risk factors; Polymorphism, genetic; Intervertebral disc.

**Citação:** Nunes FTB, Conforti-Froes NDT, Negrelli WF, Souza DRS. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na degeneração do disco intervertebral. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2007; 15(1):09-13. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

**Citation:** Nunes FTB, Conforti-Froes NDT, Negrelli WF, Souza DRS. Genetic and environmental factors involved on intervertebral disc degeneration. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2007; 15(1): 09-13. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

### INTRODUÇÃO

O disco intervertebral perde seu poder higroscópico com o envelhecimento, gerando um processo de desidratação progressiva, caracterizando a discopatia. A partir da degeneração do disco intervertebral, a coluna passa a apresentar instabilidade progressiva da região afetada, conduzindo a uma série de outros eventos nos demais elementos da unidade funcional segmentar. Isso pode ocorrer em qualquer região da coluna, contudo observa-se mais comumente entre a quarta e quinta vértebras lombares e entre a quinta lombar e a primeira sacral, em torno dos trinta e quarenta anos de idade<sup>(1)</sup>.

A precisa etiologia da DDI não está totalmente esclarecida. Até há pouco tempo era atribuída exclusivamente ao acúmulo de efeitos ambientais, primariamente micro ou macro, traumas, hábitos de vida, tabagismo, aterosclerose, crescimento das mudanças que ocorrem na estrutura do disco, com o envelhecimento. Todavia, pesquisas mais recentes demonstram a moderada influência desses fatores na degeneração discal, o que reforça a importância da participação genética na doença<sup>(2,3)</sup>. Apesar disso, a progressão natural da degeneração, determinada geneticamente, pode ser modificada, em certo grau, pelo modo de vida e ambiente<sup>(4)</sup>.

### I. Polimorfismo do gene receptor da vitamina D na degeneração discal

A forma ativa da vitamina D, a 1 $\alpha$ ,25 dihidroxivitamina D [1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] ou vitamina D<sub>3</sub>, é necessária para o crescimento e diferenciação celulares em vários tecidos, além de participar do processo de mineralização do osso, absorção de cálcio no intestino, controle do cálcio, homeostase de fósforo e regulação do hormônio paratireoide. Adicionalmente, participa na diferenciação, proliferação e maturação das células cartilaginosas, como também influencia a síntese de proteoglicanos, através dos condrócitos articulares<sup>(5)</sup>.

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), que contém 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 "zinc fingers", localizados na porção N-terminal da proteína<sup>(6)</sup>. A vitamina D<sub>3</sub> [1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] é lipossolúvel e ao entrar na célula interage prontamente com seu receptor (VDR). Após a ativação do VDR pela ligação com a vitamina D<sub>3</sub>, esse receptor pode, isoladamente

Trabalho realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular - Universidade Estadual Paulista-UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto. Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Endereço para correspondência: Nívea Dulce Tedeschi Conforti-Froes. Rua Maria Figueiredo, 343/ 51- Paraíso - CEP 04002-000 São Paulo- Capital - E-mail: [nfroes@ibilce.unesp.br](mailto:nfroes@ibilce.unesp.br)

1. Mestre em Genética pela Universidade Estadual Paulista, UNESP.

2. Mestre e Doutor em Genética pela Universidade Estadual Paulista, UNESP; Pós - Doutor pela Universidade do Texas, Departamento de Medicina Preventiva, Galveston, EUA.

3. Médico Ortopedista e Traumatologista.

4. Mestre pela Universidade de São Paulo (USP) e Doutor em Genética pela Universidade Estadual Paulista, UNESP.

Trabalho recebido em 12/04/06 aprovado em 28/09/06

ou na forma de heterodímeros com vários outros receptores da superfamília, em particular com RXR, ligar-se à seqüência específica de regulação, presente nos promotores de genes responsivos à vitamina D. Em seguida à formação do heterodímero, ocorre o recrutamento do fator transcrricional IIB (TFIIB) e cofatores, iniciando-se assim, a transcrição<sup>(7)</sup>.

O polimorfismo FokI do gene VDR resulta da alteração no sítio iniciador da transcrição localizado no exon 2. Esse sítio, altamente conservado em camundongos, ratos e humanos, sugere que o polimorfismo no exon 2 do VDR pode afetar a função da proteína VDR<sup>(8)</sup>.

## II. Fatores Ambientais na Degeneração do Disco Intervertebral

O hábito de fumar induz estresse bioquímico em diversos tecidos. Tal estresse faz parte dos componentes ambientais que contribuem para a alteração da nutrição e circulação sanguínea no disco, provocando a doença discogênica. Há ainda, dois outros tipos de estresse, o dinâmico e fisiológico. O dinâmico envolve as atividades pesadas, o sobrepeso, os erros de postura e as lesões acidentais, enquanto o fisiológico relaciona-se ao processo de envelhecimento<sup>(9)</sup>.

Dentre os componentes químicos de maior toxicidade do tabaco, encontram-se a nicotina, o benzopireno e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Esses últimos conduzem às lesões endoteliais, enquanto o monóxido de carbono, formado na combustão, diminui a capacidade das hemácias no transporte de oxigênio. Há ainda, o aumento de catecolaminas, resultando em vasoconstrição, limitando mais o suprimento de oxigênio aos tecidos e gerando danos às vértebras e ossos. Há evidências epidemiológicas 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<sup>(10)</sup>.

Os compostos químicos presentes no cigarro são biometabolizados, sendo oxidados na fase I, principalmente, pelas enzimas da super família do citocromo P-450 (CYPs) e inativados na fase II, pela conjugação do grupo funcional dos produtos formados com um substrato endógeno solúvel em água (glutatião, sulfato, glicose, acetato), por meio da ação das glutatião-S-transferases (GSTs), UDP-glucuroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs). Dessa maneira, os metabólitos são transformados em compostos hidrofílicos, mais facilmente excretados<sup>(11)</sup>.

Diferenças individuais na capacidade de resposta aos compostos genotóxicos e carcinogênicos estão ligadas à presença de polimorfismos nas enzimas que metabolizam compostos químicos, sendo que essa variabilidade interindividual desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças.

Dentre as enzimas de fase II, as GSTs desempenham um papel predominante nos processos de detoxificação. O gene *GSTT1*, localizado no cromossomo 22 humano, é polimórfico. Pode ocorrer sua deleção homocigota, resultando no genótipo nulo (*GSTT1 0/0*), cuja frequência depende da origem étnica. O gene que codifica para a isoforma *GSTM1* está localizado no cromossomo 1, é polimórfico, apresentando quatro variantes alélicas, *GSTM1 \*A*, *\*B*, *\*C*, e *\*O*. As duas primeiras não possuem diferenças com relação ao tipo de substrato, enquanto o alelo *\*C* é extremamente raro e a variante *\*O*, que é o alelo nulo, acarreta a falta da atividade enzimática, quando em homocigose<sup>(12)</sup>. Dessa maneira, a presença de pelo menos, um alelo funcional é suficiente para que a enzima atue desempenhando seu papel.

Em suma, o hábito de fumar parece estar envolvido com degeneração do disco intervertebral, como importante fator de risco para a doença em humanos.

## OBJETIVOS

Foram objetivos do presente trabalho:

1. Identificar os polimorfismos no gene para receptor da vitamina D (VDR) e gene codificador das glutatião S-transferases M1 e T1 (*GSTM1* e *GSTT1*) em um grupo de pacientes com degeneração do disco intervertebral, bem como em um grupo controle;

2. Associar os polimorfismos descritos acima com os achados obtidos pela ressonância nuclear magnética, dados clínicos, história familiar e idade do surgimento da doença, bem como com fatores antropométricos (sobrepeso) e ambientais (hábito de fumar);

3. Relacionar fatores antropométricos, ocupacionais, ambientais e história familiar da doença discogênica entre pacientes e controles.

## 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 e por imagem de Ressonância Magnética (RM) de discopatias, com ou sem hérnias discais associadas. 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 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, 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, avaliados clinicamente e diagnosticados como não portadores de discopatias. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo, após o que assinaram o Termo de Consentimento. O trabalho em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista (Unesp).

### 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)/ altura<sup>2</sup> (m)].

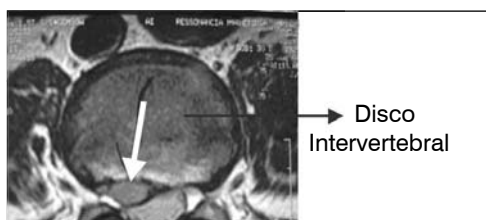
#### II. 1. Avaliação dos Pacientes

A avaliação dos pacientes foi realizada por um médico especializado em doenças da coluna, tendo sido o diagnóstico confirmado por outro examinador qualificado. 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, como a presença de discopatia e herniação em diferentes graus (abaulamento, protrusão, extrusão), intensidade do sinal, altura, rompimento do anel fibroso e núcleo pulposo, lesões artríticas e degeneração dos ligamentos. Entende-se por herniação, a saliência do disco intervertebral fora do seu espaço em relação ao corpo vertebral; grau de intensidade do sinal como 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 sua diminuição relacionada à evolução do quadro; rompimento do anel fibroso e núcleo pulposo como uma falha de continuidade dos seus tecidos; e lesões artríticas como a degeneração das articulações. As Figuras 1 e 2 ilustram os sinais de degeneração avaliados nos pacientes.

O grau de intensidade da doença foi identificado de acordo com a classificação de Schneider modificada<sup>(5)</sup>. Nesse caso o Grau 1 foi caracterizado como a presença



**Figura 1** - Imagem por ressonância nuclear magnética da coluna em corte sagital, mostrando discopatias nos níveis L3-L4, L4-L5 e L5-S1 (discos pretos).



**Figura 2** - Imagem por ressonância nuclear magnética, em corte axial, mostrando hérnia de disco (seta branca).

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 os níveis 1 e 2, respectivamente, para a presença da lesão em um ou mais segmentos da coluna.

## II. 2. Genotipagem

De cada indivíduo foram puncionados 5mL de sangue periférico. O DNA foi obtido pela técnica de extração descrita por Gustinich et al.<sup>(13)</sup>.

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.<sup>(14)</sup>. Os primers: 5'-AGCTGGCCC TGGCACTGACTCTGCTCT-3' e 5'-ATG-GAAACACCTTGCTTCTCCCTC-3' foram diluídos em 1,5 mM de cloreto de magnésio, 60 mM de Tris HCl, pH 9,0, 15 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 10% de dimetil sulfoxido (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). 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. Nessas 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.

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.<sup>(15)</sup>. No procedimento da PCR utilizaram-se 30 pmol de cada um dos primers para os genes *GSTM1* (5'-GAACTCCCTGAAAGCTAAAGC; 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG), *GSTT1* (5'-TTCCTTACTGG-TCCTCACATCTC; 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA) e *CYP1A1* (5'-GAAGTCCACTTCAGCTGTCT; 5'-AGCTGCATTTGGAAGTGCTC), esse 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 NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 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-desnaturação do DNA e, em seguida, por 40 ciclos com parâmetros de desnaturação 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). 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*, ou seja, 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).

## II. 3. Análise estatística

A análise de regressão logística foi utilizada para examinar a associação entre as características de hábito de fumar, IMC, história familiar e os polimorfismos nos genes *VDR*, *GSTT1* e *M1*, também 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

### I. Frequências Alélicas e Genotípicas para *VDR*, *GSTT1* e *GSTM1*

A Tabela 1 apresenta a distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o gene *VDR* em pacientes com doença discogênica e seus respectivos controles. A frequência do alelo f foi significativamente maior 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 freqüente nos pacientes (81,8%; P=0,0001). Não foram encontradas diferenças nas frequências genotípicas para *GSTT1* e *GSTM1* entre pacientes e controles à presença (+/+) e ausência (0/0) do gene (P=0,84 e P=0,14, respectivamente).

### II. Antecedentes Pessoais

A dor lombar ou hérnia discal foi citada como história familiar, preferencialmente pelos pacientes em relação ao grupo controle (78,8%; 34,1%, respectivamente, P< 0,001), conforme Tabela 2, que apresenta também as demais características, como tabagismo e sobrepeso, semelhantes entre os grupos.

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

A Tabela 3 mostra a relação entre polimorfismo *VDR-FokI* com tabagismo, sobrepeso e história familiar em pacientes e controles. A

Alelo	Paciente		Controle		P*
	N	freqüência	N	freqüência	
F	72	0,54	149	0,85	
f	60	0,46	27	0,15	0,0001
Total		1,00		1,00	
Genótipo	N	%	N	%	P*
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 1** - Distribuição das freqüências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *VDR-FokI* em pacientes com degeneração discal e controles.

Antecedentes Pessoais	Paciente		Controle		P*
	N	Freqüência %	N	Freqüência%	
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/m<sup>2</sup>.

**Tabela 2** - Distribuição dos antecedentes pessoais de pacientes com degeneração discal e controles.

freqüência, analisada em conjunto de, pelo menos um alelo f (*\_f*) com história familiar positiva, apresentou-se significativamente aumentada nos pacientes (90%), comparada aos controles (0%;  $P < 0,001$ ). Por outro lado, a freqüência aumentada do genótipo FF prevaleceu nos pacientes tabagistas (80%) comparada aos controles (40%;  $P < 0,001$ ). 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 essa 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 de início da doença em indivíduos sem histórico familiar, portadores do alelo FF foi de 41 anos,  $\pm 13,3$ , superior aos indivíduos *\_f* (28 anos,  $\pm 7,8$ ) (Tabela 4). Não foram encontradas diferenças significantes entre genótipos e antecedentes pessoais em pacientes e controles.

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

A Tabela 5 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 comparados ao genótipo FF (0,0%;  $P = 0,0012$ ). O mesmo 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.

#### DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo expressam a existência de fatores genéticos na suscetibilidade à degeneração do disco intervertebral. A distribuição alélica e genotípica para o polimorfismo FokI do gene receptor da vitamina D discrimina pacientes e controles, visto que a freqüência significativamente aumentada do alelo f em pacientes

com degeneração discal (0,46) destacou-se em relação aos controles (0,15). O genótipo Ff esteve presente na maioria dos indivíduos afetados pela doença (81,8%), enquanto no grupo controle houve predomínio do homocigoto dominante FF (69,3%).

A freqüência dos genótipos para VDR-FokI nas populações oscila entre os diferentes grupos étnicos, com freqüências 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<sup>(3,14,16)</sup>. Por outro lado, em negros destaca-se o genótipo FF (66%), seguido de Ff (31%) e ff (4%)<sup>(14)</sup>. Os valores para o grupo controle no presente estudo foram de 69,3%; 30,7% e 0,0%, respectivamente, podendo explicar-se a baixa freqüência encontrada para o alelo f como devida à casuística reduzida, acrescida da grande e real miscigenação da população brasileira.

Videman et al.<sup>(3)</sup> apontam uma relação direta entre o aumento do grau de DDI 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. De maneira concordante, neste estudo, o alelo f mostrou-se em associação com grau maior de degeneração, quando comparado ao alelo F ( $P = 0,0012$ ).

O surgimento do processo degenerativo em pacientes jovens sugere mais fortemente, a influência de componentes genéticos<sup>(4)</sup>. Tal associação decorre do fato de que, nesses indivíduos, o disco intervertebral se expôs a fatores de risco ambiental, por um período inferior comparado aos indivíduos mais velhos<sup>(5)</sup>. Nossos dados confirmam tal 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. Interessantemente, além dos pacientes, com alelo f, serem acometidos de modo mais precoce, a história de doença discogênica na família dos pacientes apresentou perfil semelhante. Quando essa característica foi relacionada com a 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 freqüência 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 suscetibilidade à degeneração discal.

A contribuição do polimorfismo VDR FokI 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.<sup>(7)</sup> mostraram que o alelo menor com 424 aminoácidos (alelo F) interage de forma mais eficiente com fator de transcrição TFIIIB, levando-os a concluir que esse alelo apresenta maior potência transcrípcional, fato confirmado também por Chen et al.<sup>(17)</sup> e Uiterlindem et al.<sup>(6)</sup>. 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<sup>(6)</sup>. 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 transcrípcional.

Além do envolvimento vitamina D na diferenciação, proliferação, maturação das células cartilaginosas e influência na síntese de proteoglicanos<sup>(5)</sup>, há constatação da participação da vitamina D3 na proliferação e crescimento celular, pela estimulação do fator de crescimento dependente de insulina I (IGF-I) e seu receptor<sup>(18)</sup>. Reconhecidamente, a vitamina D3 ativa o promotor de genes alvos, através do complexo

Antecedentes Pessoais	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/m<sup>2</sup>.

**Tabela 3 - Polimorfismos genéticos para VDR-FokI e antecedentes pessoais em pacientes com degeneração discal e controles.**

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)

**Tabela 4 - Relação entre idade de surgimento da doença e história familiar em pacientes com degeneração discal.**

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 5 - Relação entre Polimorfismo VDR-FokI, gravidade da degeneração discal e nível de lesão.**

de múltiplas moléculas. Existe a hipótese de que a vitamina D3 ative 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<sup>(6)</sup>. Sendo assim, as alterações na expressão dos receptores de vitamina D prejudicam 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<sup>(4)</sup>. 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, embora Videman e Battié<sup>(19)</sup> terem concluído que o ambiente 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<sup>(20)</sup>. A obesidade é comum entre os pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas, entre elas, a remoção do disco herniado. Entretanto, Leboeuf<sup>(21)</sup>, realizando pesquisa de revisão sobre o assunto verificou que somente 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, mesmo 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<sup>(22)</sup>. Experimentos efetuados em células isoladas do núcleo pulposo constataram que os componentes do cigarro, além de diminuir a vascularização do disco, promovem tanto o decréscimo da produção de glicosaminoglicanos, como a expressão do gene do colágeno tipo II. Outros aspectos relacionados à degeneração foram relatados, como a diminuição do número de células do núcleo pulposo<sup>(9)</sup>. Como consequência da modificação no conteúdo de glicosaminoglicanos, o núcleo pulposo desidrata, alterando a hidrostática normal do disco e conseqüentemente, suas propriedades amortecedoras.

Nossos resultados mostraram que freqüências significativamente aumentadas de FF e reduzida de -f foram observadas preferencial-

mente, nos pacientes fumantes, comparadas aos controles. Nesse 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.

Neste estudo, a avaliação da influência dos polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo dos componentes do cigarro, ou seja, *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 freqüências de nulidade dos genes *GSTM1* (34,1%) e *GSTT1* (19,3%) nos controles estão de acordo com Rossit et al.<sup>(23)</sup>.

Nossos resultados mostram que o alelo f pode ser considerado um fator de risco no aparecimento precoce dos sinais de DDI. Além disso, o hábito de fumar pareceu interferir no processo, independentemente do indivíduo apresentar genótipo favorável ou não para os genes de detoxificação dos componentes da fumaça.

## CONCLUSÕES

1. O alelo f para receptor da vitamina D (*VDR-Fok1*) 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 glutationo-S-transferases (*GSTT1* e *GSTM1*).
2. O hábito de fumar mostra-se como fator de risco, inclusive para pacientes com genótipo FF do polimorfismo *VDR-Fok1*, independentemente dos genótipos para os genes de detoxificação (*GSTM1* ou *T1*) que em conjunto com as características individuais, incluindo sobrepeso, 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 suscetibilidade genética para a doença, o mesmo não ocorrendo com relação a fatores antropométricos, ambientais e ocupacionais.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e da FUNDUNESP (Fundação de Amparo à pesquisa da UNESP).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lotz CJ, Adam HH. Prolonged Compression of intervertebral discs activates MMP-2. *Spine*. 1998; 23:2493-506.
2. Bhatia N, Wang J. Current information regarding the biochemical and genetic events that occur during disc degeneration. *Curr Opin Orthop*. 2003; 14: 153-8.
3. Videman T, Leppavuori J, Kaprio J, Battie M, Koskenvuo M. Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Intra-genetic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. *Spine*. 1998; 23:2477-85.
4. Battié M, Videman P, Eric P. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetic influences. *Spine*. 2004; 29:2679-90.
5. 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*. 2002; 84: 2022-8.
6. Uitterlinden AG, Fang Y, Meurs JBJ, Pols HAP, Leeuwen JPTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004; 338:143-56.
7. Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001; 2:203-316.
8. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in translation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res*. 1997; 12:915.
9. Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, Wakabayash K, Uematsu Y, Iwashita M. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model. *J Orthop Sci*. 2004; 9:135-41.
10. Slosar PJ, Perkins RB, Snook D. Effects of cigarette smoking on the spine: a focused review. *Spine*. 2002; 31(5):6-9.
11. Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol*. 1996; 15: 273-80.
12. Pavanello S, Clonfero E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat Res*. 2000; 465:285-308.
13. Gustincich S, Manfioletti IG, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. 1991; 11:298-300,302.
14. 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. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1043-8.
15. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar, WA. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett*. 1996; 107:229-33.
16. Zofkova K. Serum parathyroid hormone levels are associated with FokI polymorphism of the vitamin D receptor gene in untreated postmenopausal women. *Endocrinology*. 2003; 82: 93-6.
17. Chen HY, Chen WC, Hsu CD, Tsai FJ, Tsai CH. Relation of vitamin D receptor FokI start codon polymorphism to bone mineral density and occurrence of osteoporosis in postmenopausal women in Taiwan. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002; 81: 93-8.
18. Krohn K, Haffner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G et al. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and Dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int*. 2003; 10: 160-9.
19. Videman T, Battié M. The influence of occupation on lumbar degeneration. *Spine*. 1999; 24:1164-8.
20. Bejia I, Younes M, Zrour S, Touzi M, Bergaoui N. Factors predicting outcomes of mechanical sciatica: a review of 1092 cases. *Joint Bone Spine*. 2004; 71:567-71.
21. Leboeuf YC. Body weight and low back pain. A systematic literature review of 56 journal articles reporting on 65 epidemiologic studies. *Spine*. 2000; 25:226-37.
22. 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. *Spine*. 2004; 29:568-75.
23. Rossit AB, Cabral IR, Hackel CB, Da Silva RC, Conforti-Froes NDT, Abdel-Rahman. Polymorphisms the DNA repair gene *XRCC1* and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer Letters*. 2002; 180: 173-82.