



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM GENÉTICA

O alelo Trp3 do SNP rs61734651 do gene COL9A3 aumenta o risco relativo para a Hérnia de Disco Lombar em indivíduos de uma amostra populacional de Goiânia (Brasil).

Goiânia – GO

©2018

LILIAN DE SOUZA TEODORO

O alelo Trp3 do SNP rs61734651 do gene COL9A3 aumenta o risco relativo para a Hérnia de Disco Lombar em indivíduos de uma amostra populacional de Goiânia (Brasil).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Genética – MGene da Pontifícia Universidade
Católica, como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestra em Genética

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lysa Bernardes Minasi

Goiânia – GO
©2018

T314a Teodoro, Lilian de Souza

O alelo Trp3 do SNP rs61734651 do gene COL9A3 aumenta o risco relativo para a Hérnia de Disco Lombar em indivíduos de uma amostra populacional de Goiânia (Brasil). [manuscrito] / Lilian de Souza Teodoro.--2018.

42 f.; il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, Goiânia, 2018.

Inclui referências f.38-42

1. Polimorfismo (Genética) - Genética. 2. Dor lombar - Análise - Goiânia (GO). I.Cruz, Aparecido Divino da. II.Minasi, Lysa Bernardes. III.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. IV. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 575(043)

Dedico este trabalho a

Meu pai, João Batista Teodoro (*in memoriam*)

e irmão, João Henrique de Sousa Teodoro (*in memoriam*)

Ambos sempre estarão presentes na minha vida, Amo Vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo folego de vida, por me guardar, me amparar nos momentos de alegrias e tristezas, por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui. Sou grata pela sua misericórdia sobre mim, e poder trilhar meus passos ao teu lado, sou grata por me manter em pé mesmo eu achando que iria cair. Graças te dou Senhor, por ter colocado amigos ao meu lado que me ajudasse a caminhar e chegar até aqui.

Ao meu esposo Eder Roger de Souza, pelos conselhos, paciência e companheirismo, por me amparar em toda trajetória acadêmica que me ajudou a chegar até aqui. Obrigada por ser tão especial na minha vida e acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava. Você é e sempre será um anjo que Deus colocou ao meu lado para me auxiliar em todos os momentos da minha vida. Te amo!

À minha mãe Wilma Sônia de Sousa Teodoro, por acreditar nos meus sonhos, me dando conselhos e segurando a minha mão mesmo que estejamos tão distantes. A senhora é muito especial na minha vida.

À minha irmã Hellen Cristina de Sousa Teodoro, pelo apoio, amizade, conselhos e principalmente, por ter nos dado os maiores presentes de nossas vidas, minhas sobrinhas lindas, queridas e amadas, Ninive Cristina de Sousa Teodoro e Jennifer Teodoro Gama. Obrigada por serem a luz de nossas vidas.

As minhas amigas Emília Oliveira Alves Costa, Fernanda Ribeiro Godoy, Fernanda Craveiro Franco, Wanessa Fernandes Carvalho, obrigada minas pelos sorrisos, conselhos, amizade e companheirismo, são anos de amizade que levarei em meu peito, por toda a minha vida.

Às minhas queridas amigas Lorryayne Guimarães Oliveira, Nayara Alves Costa e Samara Socorro Silva Pereira, por ter tornado o mestrado tão mais prazeroso, obrigada pela amizade, companheirismo, sorrisos de alegria e as vezes de nervoso. Pelos lanches vespertinos, pelas conversas e brincadeiras. Acreditem, vocês fizeram a diferença, levarei para a vida.

A todos do Núcleo de Pesquisas Replicon, pelo amparo por terem sido meus amigos em momentos tão importantes da minha vida. Todos foram muito importantes na minha formação social e acadêmica. São anos dentro do núcleo construindo laços de amizade que vão seguir ao meu lado por toda minha vida. Em especial quero agradecer ao Alex Silva da Cruz, Cláudio Carlos da Silva, Damiana Mirian da Cruz Cunha, Eduardo Rocha Pedrosa, Thaís Cidália Vieira

Gigonzac, Marc Alexandre Duarte Gigonzac e Orlandina Barbosa dos Santos. Infelizmente é impossível eu colocar o nome de todas as pessoas do núcleo, mas quero muito que todos os alunos, professores e funcionários sintam-se agradecidos, pois cada um com seu jeitinho fez parte da minha história e trajetória, levarei a amizade de cada um em meu peito, por toda minha vida.

À professora Caroline de Oliveira Melo, por dedicar seu tempo e conhecimento para a prova de seleção do mestrado. Obrigada por me auxiliar nessa conquista.

A todos os professores, pelos ensinamentos, paciência e dedicação ao ensino, obrigada por serem tão especiais e se dedicarem ao Mestrado em Genética com tanto amor.

Aos colegas de mestrado, Andreyra Gonçalves Costa Motta, Flavia de Castro Santana e Marcus Simão, pelo companheirismo e amizade, foram dois anos de curso, as vezes longos as vezes tão curto. Obrigada por fazerem parte de uma turma tão especial, cada um na sua essência.

À Nara Lígia Leão Casa, por confiar em mim parte do seu trabalho, aos alunos Aldaires Vieira de Melo, Gustavo Rios Nascimento, Isabela Lacerda, Aparecido Ferreira de Sousa, e ao professor Macks Wendhell Gonçalves, pela disponibilidade e dedicação para a construção deste trabalho.

Agradeço a todos os voluntários que participaram do estudo, sem vocês a conclusão do estudo não seria possível.

Aos membros da banca por aceitarem fazer parte de um momento tão importante na minha formação, dedicando seu tempo e conhecimento para que o trabalho possa ser concluído de forma notável.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro, tão importante para a minha formação.

À Lysa Bernardes Minasi, pela dedicação de seu tempo e conhecimento, obrigada por aceitar ser minha co-orientadora. Te admiro como pessoa e principalmente como profissional. Obrigada por fazer parte da construção e conclusão deste trabalho.

Em especial quero agradecer a uma pessoa que realmente fez isso ser possível, Aparecido Divino da Cruz (Peixoto), obrigada por pegar na minha mão me ajudar a caminhar, acreditar em mim mesmo nos momentos que eu não acreditava, por não me deixar desistir, por me mostrar que eu sou melhor do que eu acho que sou. Obrigada pelos conselhos, abraços, amizade.

Obrigada pelo café pago na copa, obrigada pelos sorrisos, pelos puxões de orelha. Obrigada por me amparar quando eu achava que ia cair, obrigada pelo carisma, pelo colo. Não existe no mundo palavras para eu descrever a admiração que eu sinto pelo senhor. Agradecimentos são poucos para mostrar o quanto sou grata pela sua amizade, pela sua orientação, pela sua compreensão, pelo seu amor, cuidado e disponibilidade. Na verdade, eu só quero me desculpar se por algum momento eu não honrei o seu cuidado comigo, peço desculpas por qualquer coisa que tenha feito a sua confiança em mim se esquivar por qualquer que seja o motivo. Deus e o senhor sabem o quanto eu sofri na vida, perdi muito, mas ganhei muito mais, e as coisas boas ficam, e hoje nessa fase da minha vida, eu não me perdi ganhei, ganhei um orientador para toda vida, um amigo, um pai, um conselheiro. Obrigada por acreditar em mim!

Sumário

TABELAS E FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. Anatomia da Coluna Vertebral	14
2.2. vértebras	15
2.2.1. vértebras cervicais	15
2.2.2. vértebras torácicas.....	16
2.2.3. vértebras lombares.....	16
2.3. Disco Intervertebral	16
2.3.1. Formação dos discos intervertebrais	16
2.3.2. Composição do disco intervertebral	17
2.3.2.1. núcleo pulposos.....	17
2.3.2.2. ânulo fibroso	18
2.3.2.3. placas terminais	18
2.3.3. Colágeno.....	19
2.4. Aspectos Epidemiológicos e fisiopatologia da Hérnia de Disco.....	19
2.5. Colágeno do Tipo IX	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24

4.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1.	Delineamento do Estudo.....	25
4.2.	Considerações Éticas.....	25
4.3.	Critérios de Inclusão e Exclusão	25
4.4.	Coleta de Dados.....	26
4.4.1	Anamnese Fisioterapêutica	27
4.4.2	Medidas Antropométricas	27
4.5	Amostras biológicas	28
4.5.1	Extração e Purificação de DNA	28
4.5.2	Genotipagem pela técnica de PCR	28
4.6	Análises Estatísticas.....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.	CONCLUSÃO	37
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8.	ANEXOS	42
	ANEXO I.....	44
	ANEXO II.....	45
	ANEXO III.....	49
	ANEXO IV.....	51

Tabelas, Figuras e Tabelas

Tabelas

Tabela 1	Interpretação das classes de IMC, de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Obesidade (2016/2016) para a estratificação populacional com base nas orientações da OMS.....	28
Tabela 2	Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores do gene <i>COL9A3</i> utilizadas na qPCR para identificar os polimorfismos de nucleotídeos únicos rs2294984 e rs61734651.....	29
Tabela 3	Associação dos dados demográficos, antropométricos, hábito de vida e histórico familiar entre os grupos caso e controle para avaliação dos SNPs rs2294984 e rs61734651 e a vulnerabilidade de HDL em Goiânia-go (Brasil).....	31
Tabela 4	Interpretação dos dados estatísticos para a comparação das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos caso e controle do SNP rs2294984.....	32
Tabela 5	Interpretação dos dados estatísticos para a comparação das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos caso e controle do SNP rs61734651.....	33
Tabela 6	Associação da distribuição alélica e genotípica dos SNPs rs2294984 e rs61734651 do gene <i>COL9A3</i> entre o grupo caso e dois estágios da hérnia de disco lombar.....	35

Figuras

Figura 1	Imagem ilustrativa que representa a coluna Vertebral	14
Figura 2	Imagem representando uma Vértebra.....	15
Figura 3	Ilustração do Disco InterVertebral.....	18
Figura 4	Classificação Morfológica dos Estágios da Hérnia de Disco	21
Figura 5	Ilustração Esquemática de um Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP).....	22

Resumo

As dores nas costas estão presentes em 80% da população mundial, e um dos motivos mais comuns dessas dores são as hérnias de disco, sendo que elas podem ocorrer em qualquer parte da coluna vertebral, atingindo principalmente a região lombar. As Hérnias de Disco Lombar (HDL) podem surgir decorrentes de fatores ambientais como tabagismo, estilo de vida envelhecimento, ocupação, ou ainda por fatores genéticos. No Brasil existem poucos os estudos que relacionem as influências genéticas com o surgimento da HDL, não existindo ainda estudos que utilizem os SNPs para investigar o surgimento da enfermidade. Nosso estudo do tipo caso controle, teve como objetivo avaliar a associação entre a variação dos polimorfismos rs2294984 e rs61734651 do gene *COL9A3* com a hérnia de disco lombar. Participaram da pesquisa 118 indivíduos residentes em Goiânia (Brasil), os participantes foram divididos em dois grupos, onde 40 indivíduos formaram o grupo caso e 78 o grupo controle. Foram coletados 4mL de sangue periférico com o anticoagulante EDTA. O procedimento de extração foi realizado utilizando o kit comercial seguindo as normas do fabricante, em seguida o DNA foi armazenado em freezer -20°C aguardando o procedimento de qPCR. Para a amplificação dos sítios polimórficos rs2294984 e rs61734651 do gene *COL9A3* utilizamos 5ng de DNA genômico, 2,5µL de TaqMan® Universal Master Mix(R) concentrado a 2X e 0,25µL de sonda e primers concentrado a 20X. Após a realização dos testes estatísticos observou-se que não houve diferença significativa no estilo de vida, dados sociodemográficos e antropométricos. Os integrantes do grupo caso teve média de idade de 42,2 anos, sendo 17 mulheres e 23 homens, já o grupo controle teve média de idade de 42,6 anos, sendo 34 mulheres e 44 homens. Quando relacionamos a frequência alélica e genotípica do SNP rs2294984 entre o grupo caso e controle observamos que não houve diferenças estatísticas significativas. No entanto o SNP rs61734651 mostrou uma redução de cerca de 3x (2,8) na frequência do alelo C entre os casos, quando comparado ao grupo controle, foi observado um desvio entre os grupos para a distribuição alélica e para os genótipos C/T e T/T sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$), a presença do alelo T corresponde à troca de uma arginina por um triptofano no códon 103 da cadeia $\alpha 3$ (Trp3) da proteína colágeno IX, codificada pelo gene *COL9A3*. Portanto, nossos resultados demonstraram que a presença do alelo T do SNP rs61734651 em homozigose está envolvido com o desenvolvimento de HDL. Os indivíduos que possuíam o alelo Trp3 em seus genótipos apresentou uma chance aumentada de 11% de desenvolver a HDL, quando comparado com um grupo de pessoas saudáveis do estado de Goiás. São necessárias outras pesquisas para investigar a potencial relação do alelo Trp3 com o desenvolvimento da HDL.

Palavras chave: Polimorfismo. Lombalgias. HDL. SNP. qPCR

Abstract

About 80% of the world population suffer from back pain. The most common causes of this pain are spinal disc herniation, which could happen anywhere along the spine, but it is most frequent at the lumbar region, known as Herniated Lumbar Disc (HLD). They could be produced as consequence of environmental factors, such as chronic smoking, life style, aging, occupation. Genetic factors also contribute to the development of HLD. In Brazil, a very few studies have addressed the genetic influence on HLD occurrence, and no reports of the roll of SNPs in the susceptibility of this disease have been published for a Brazilian population. The current study investigated the potential association between polymorphic variants in rs2294984 and rs61734651 from the *COL9A3* gene and HDL. The study included 118 residents from Goiânia-GO (Brazil) divided in two groups. A total of 40 people comprised the group of cases and 78 comprised the control group. From each participant, 4mL of peripheral blood was collected in EDTA. DNA was isolated from biological samples using the commercial kit *IllustraBloodGenomicPrepMini Spin*® (GE Healthcare, UK), following the manufacturer's instructions. Isolated DNA was stored at -20°C. The SNPs were genotyped using TaqMan Real Time PCR® (SNP Genotyping kit, da AppliedBiosystems, EUA). Data was annotated in spreadsheets for the statistical analyses. Among cases, there were 17 women and 23 men whose average age was 42.2 years old. For controls, a total of 34 women and 44 men contributed to an average age of 42.6 years old. For SNP s2294984, no statistical defences were observed for either allelic and genotypic frequencies between cases and controls. However, for SNP rs61734651, a significant reduction (about 3x) in the frequency of the C allele was detected among cases. This reduction skewed the distribution of both allelic and genotypic frequencies from CC to CT and TT. The difference between cases and controls was statistically significant ($p < 0,05$) and the substitution of C for T caused the replacement of the aminoacid arginine by tryptophan in the codon 103 of the $\alpha 3$ chain (Trp3) of collagen IX. The results of the current study indicated the genotype TT was associated with HDL development in adults from central Brazil. The allele Trp3 increased 11% the chance of HDL among cases, when compare to controls. Thus, this study pointed out the need to further investigate the contribution of individual genetic makeup on the development of adult onset HDL.

key words: Polymorphism. Lombalgias. HDL. SNP. qPCR

1. INTRODUÇÃO

A Hérnia de Disco Lombar (HDL) resulta de alteração morfológica ou bioquímica do disco vertebral, que pode provocar dor lombar e radicular, fraqueza motora dentre outros sintomas. A dor lombar é conhecida desde a antiguidade, porém sua relação com a hérnia de disco só foi descrita no início do século 20 por William Jason Mixter e Joseph Barr (VIALLE et al., 2016). As alterações podem causar degeneração ao disco, sendo a causa desta degeneração multifatorial, podendo ser relacionada à idade, carga mecânica, obesidade, além de fatores que prejudicam a nutrição do disco Vertebral. Exames de imagem em diferentes populações mostram que a degeneração do disco tem início ainda durante a adolescência afetando grande parte da população durante toda a vida (KELEMPISIOTI et al., 2012; LUCHTMANN; FIRSCHING, 2016).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a dor lombar pode ser considerada como uma doença crônica. De acordo com a Organização das Nações Unidas Brasil (ONUBrasil) a hérnia de disco lombar é um dos problemas de saúde que mais causa impacto social, pessoal, ocupacional e econômico. Ainda de acordo com a ONUBrasil, em 2007, a HDL foi uma das principais causas para solicitação de aposentadoria por invalidez no território nacional. De acordo com estudos realizados por Vialle et al., (2016) 2 a 3% da população é afetada pela HDL, com sua prevalência em homens, a enfermidade é tão recorrente que é considerada um problema de saúde mundial.

Ainda não se sabe ao certo o motivo do desenvolvimento da HDL, no entanto alguns autores indicam que ela pode aparecer por motivos multifatoriais, que incluem hábitos individuais, estilos de vida e ocupação, tais como: tabagismo, profissão, esporte, lesões, dentre outros fatores. Adicionalmente, HDL pode surgir por influências genéticas. Existem alguns genes candidatos relacionados com a degeneração do disco vertebral, como o *ACAN*, *COL9A3*, receptores de vitamina D, entre outros (MARTIM et al., 2002; JIM et al., 2005; BAGHERI et al., 2016)

O gene *COL9A3*, localizado na região 20q13.33, contem 916 pares de base e codifica uma das três cadeias alfa do colágeno tipo IX, sendo o principal componente da cartilagem hialina. O colágeno tipo IX é uma molécula heterotrimérica, geralmente encontrada em tecidos que contem colágeno tipo II (NCBI).

Segundo o Banco de Dados GeneCardSuite, a má codificação de *COL9A3* está associada com Displasia Epifisária Múltipla e doenças do disco Lombar. No Banco de Dados

NCBI, é apresentado também o envolvimento de SNPs do *gene COL9A3* com doenças do tecido conjuntivo, doenças do aparelho auditivo, anomalias craniofaciais e Síndrome de Sticker. O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a associação potencial de dois SNPs (rs2294984 e rs61734651) do *gene COL9A3* com a Hérnia de Disco Lombar.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia da Coluna Vertebral

A coluna vertebral (CV), também chamada de coluna espinhal ou espinha, é constituída por uma série de ossos denominados Vértèbras. A coluna atua como uma haste flexível e resistente dando mobilidade ao corpo. Além de toda a flexibilidade que a coluna Vertebral proporciona ao organismo ela tem a função de sustentação da cabeça, ponto de fixação das costelas, para o cingulo do membro inferior, e fixação para os músculos do dorso, além de proteção da medula espinhal (EL-KHOURY; WHITTEN, 1993). A CV é um segmento complexo e de extrema relevância ao corpo humano. É constituída por 33 a 34 Vértèbras.

A CV possui quatro curvaturas naturais, sendo elas: cervical, torácica, lombar e sacrococcígeo (Figura 1). Essas curvaturas ajudam a CV a distribuir o peso que a mesma recebe todos os dias (DEFINO, 1999; NASCIMENTO, 2017).

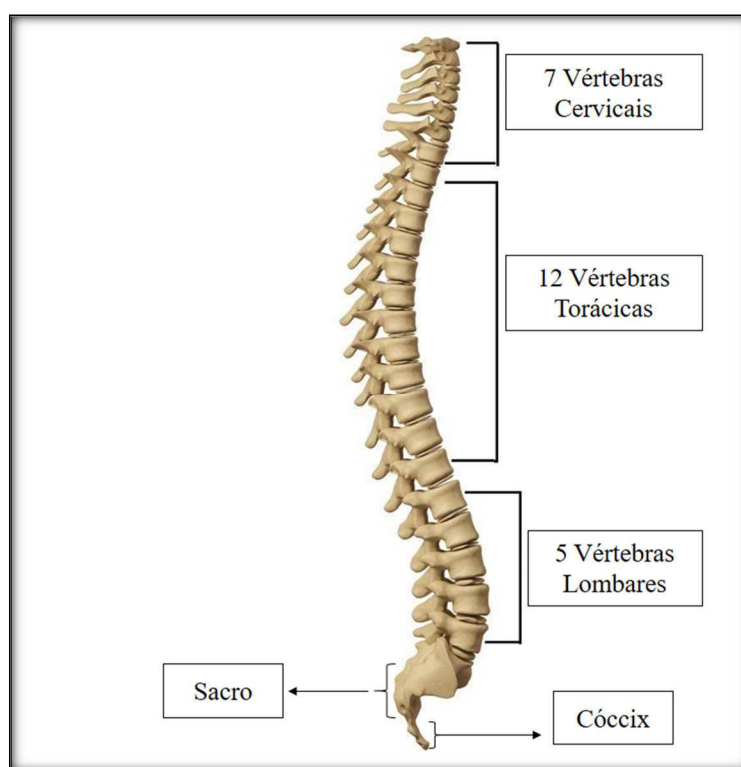


Figura 1: Imagem ilustrativa representando coluna vertebral. Fonte: adaptada por <https://educacao.umc.com.br/artigo/quantas-vertebras-temos-25951.html>

A estabilidade existente na coluna Vertebral é decorrente da interação de três pilares: passivo, ativo e neural. O sistema passivo é constituído pelas Vértèbras, disco Vertebral, ligamentos e articulações, sendo esses os responsáveis pela estabilidade e limitação passiva de

cada movimento. O sistema ativo é responsável pelo suporte, sustentação e rigidez no nível intervertebral, sendo assim ele é composto por músculos e tendões, que atuam na sustentação auxiliando nas forças exercidas no dia-a-dia (FRANÇA et al., 2008).

O sistema neural é formado por um conjunto de sistemas, o nervoso central e periférico, os quais são responsáveis pelas atividades musculares em respostas esperadas ou não, é ele que fornece estabilidade dinâmica ao corpo. O sistema neural faz ativações necessárias aos músculos no tempo certo, para proteção da coluna Vertebral e permitindo movimentos, como flexão e torção, aos quais a CV é submetida. (FRANÇA et al., 2008).

2.2 Vértebras

As Vértebras são constituídas por ossos trabeculares (osso esponjoso) vascularizados, de formato arredondado. Uma Vértebra típica é formada por duas partes principais, a parte anterior denominada corpo da Vértebra, e a parte posterior denominada de arco da Vértebra (NETO et al., 2006; BRAUM et al., 2016) (Figura 2).

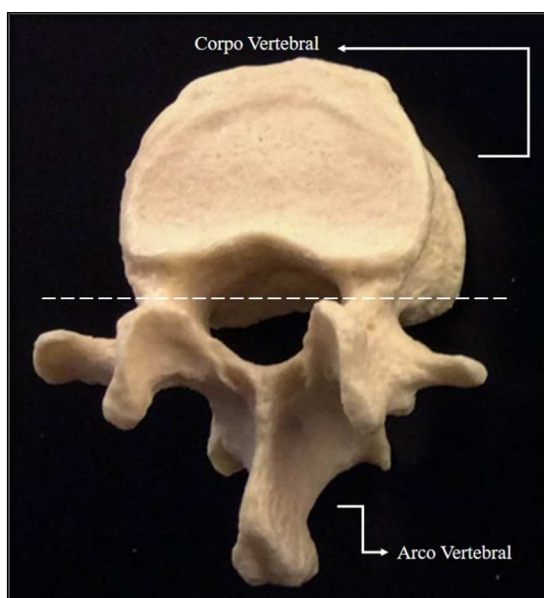


Figura 2: Imagem representativa de uma vértebra humana. Fonte adaptada: <https://www.thinglink.com/scene/972363459473702913>

2.2.1 Vértebras cervicais

A coluna cervical é constituída por 7 vértebras, sendo classificadas como típicas e atípicas. As vértebras atípicas são morfologicamente diferentes das demais vértebras da coluna, sua morfologia é diferenciada para a mobilidade necessária da cabeça, as três Vértebras são conhecidas como: altas, áxis e proeminente. Por sua vez as vértebras típicas são iguais as demais vértebras presentes na coluna (PLÁCIDO, 2015).

2.2.2 Vértexbras torácicas

A coluna torácica é constituída por 12 vértebras, comparadas com as vértebras da coluna cervical elas são mais resistentes e mais fortes. As vértebras torácicas são caracterizadas por suas fôveas, sendo elas necessárias para a articulação com as costelas. A movimentação existente nessa região é limitada por conta da fixação das costelas ao esterno (PLÁCIDO, 2015).

2.2.3 Vértexbras lombares

A coluna lombar é constituída por 5 vértebras, sendo considerada uma estrutura que oferece equilíbrio estático e dinâmico para a musculatura do tronco. É composta por uma estrutura que suporte a pressão existente nesta região, sendo ela amortecida pelas forças da gravidade que é formada neste local por meio do centro de gravidade corporal (NASCIMENTO, 2017).

2.3 Disco Intervertebral

Os discos intervertebrais (DI) são estruturas indispensáveis da coluna vertebral. Foi reconhecido pela primeira vez como uma entidade anatômica por Andreas Vesalius (1543), reconhecido por ser um dos primeiros anatomistas. Existem pelo menos 25 discos distribuídos entre as superfícies adjacentes das Vértebras os quais são unidos do eixo ao sacro. Os DI são separados de forma organizada por toda a CV, onde na coluna cervical possui 6 discos, na região torácica conta com 12 discos, 6 discos na região lombar e apenas 1 disco na região entre o sacro e o cóccix (HUMZAH; SOAMES, 1988).

2.3.1 Formação dos Discos Intervertebrais

Os discos intervertebrais são formados em torno da 5ª ou 6ª semana de gestação, sendo desenvolvidos embriologicamente tanto pelo mesênquima (formando o anel fibroso), quanto pela notocorda (formando o núcleo pulposo) (URBAN et al., 2000).

Durante o processo de condensação regular, o gene *PAX*, é expresso para formar o anel fibroso dos futuros discos intervertebrais, as regiões que não sofrem condensação formam os futuros corpos vertebrais. Após a condensação, ambas as regiões iniciam a formação de uma cartilagem do tipo hialina, em paralelo com o processo de condicionamento, a notocorda aumenta entre os corpos vertebrais para a formação do núcleo pulposo e desaparecem nas regiões em que as Vértebras estão se desenvolvendo. (URBAN et al., 2000; ROUGHLY, 2004).

2.3.2 Composição do Disco Intervertebral

A composição dos DI varia de acordo com a idade do indivíduo e sua localização na coluna vertebral. Eles, são estruturas de fibrocartilagem sendo sua função conectar os corpos vertebrais na direção caudo-rostral, e são caracterizados por três tipos de tecidos diferentes interligados: o núcleo pulposo (NP), ânulo fibroso (AF) e as placas terminais (PT) (ROUGHLY, 2004; FILHO, 2014; KAMPER et al., 2016; NEWELL et al., 2017)

2.3.2.1 Núcleo Pulposo

O NP funciona como um amortecedor, ele é uma estrutura gelatinosa a qual representa de 40% a 50% do volume total de um disco adulto. O núcleo pulposo é uma estrutura rica em água, correspondendo cerca de 90% de sua composição, isso faz com que gere uma pressão hidrostática que eleva em resposta ao carregamento compressivo produzindo uma pressão no ânulo fibroso circundante. Além de água o NP é constituído por proteoglicanos e colágeno (principalmente colágeno tipo II). Os proteoglicanos correspondem a cerca de 35 a 65% de seu peso seco, o restante do peso é composto por proteínas não colágenas e elastina. O teor de água presente no núcleo diminui cerca de 90 a 70% entre 1 a 80 anos de idade, refletindo conseqüentemente na diminuição dos proteoglicanos. Além da idade a posição do disco intervertebral na coluna também é responsável por uma variação de colágeno e proteoglicano, como nos casos dos DI encontrados na região cervical que possui mais colágeno comparado aos discos intervertebrais encontrados na região torácica, ocorrendo o inverso com os proteoglicanos. Um disco saudável suporta uma pressão de 500 a 870 quilopascals (kPa) na posição em pé, sentando de 460 a 1330 kPa e deitado de 91 a 539 kPa. A maior pressão do núcleo já descrita na literatura foi de 2300 kPa (SANTOS, 2003; ROUGHLY, 2004; ANTÔNIO, 2014; FILHO, 2014; NEWELL et al., 2017).

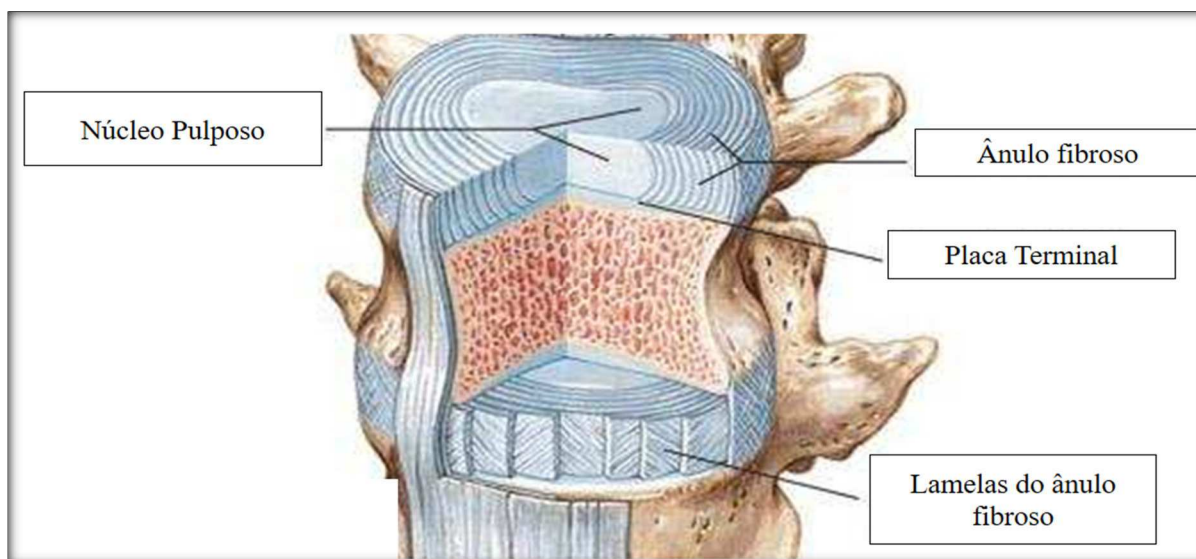


Figura 3: Ilustração do disco intervertebral, representando o núcleo pulposos, anulo fibroso e placas terminais. Fonte adaptada LEMOS 2011

2.3.2.2 Ânulo Fibroso

O ânulo fibroso é formado de 15 a 25 camadas concêntricas de lamelas, tendo aproximadamente de 0,05 a 0,5 mm de espessura, e são crescentes do interior para o exterior. Em média 48% das camadas lamelares possuem a circunferência incompleta, aumentando essa porcentagem com a idade. As camadas consistem em feixes de fibras de colágeno do tipo I fortes e grosseiras como encontradas no tendão, sua orientação varia entre $\pm 25-45^\circ$ referente ao plano transversal, no entanto o ângulo de inclinação é maior na direção central do disco. Uma malha de ponde trans-lamelar, baseada em colágenos, tem como objetivo proporcionar resistência ao cisalhamento entre lamelas adjacentes. Em um DI saudável o ânulo fibroso contém cerca de 65 a 70% de água, seu peso seco é constituído por aproximadamente 20% de proteoglicano, 50 a 70% de colágeno e apenas 2% de elastina (NETO, 2006; FILHO, 2014; NEWELL, 2017).

2.3.2.3 Placas Terminais (PT)

As placas terminais são finas camadas de cartilagem hialina, elas são encontradas nas superfícies superior e inferior dos DI, sua função é ligar o disco as Vértébras. Possui tamanho aproximado de 0,6 mm de espessura, no entanto são mais finas na região central do NP. A espessura das placas terminais diminui com o decorrer da idade. As PT têm em sua composição aproximadamente 60% de água, seu peso seco é composto por colágeno do tipo II, e proteoglicanos. A malha tridimensional de colágeno encontrada na placa impede o inchaço e o

tecido moderadamente estável é capaz de reduzir a taxa de água do NP pressurizado, ocorrendo ao mesmo tempo a difusão de nutrientes para dentro dos DI (SANTOS C. B. S. 2008; NEWELL et al., 2017).

2.3.3 Colágeno

O DI é composto por diversos tipos de colágeno como: os colágenos dos tipos I, II, III, V, VI, IX, XI, XII e XIV e a quantidade de colágeno presente no disco intervertebral varia de acordo com a idade do paciente. As camadas de colágeno fibrilar que compõem o disco são formadas principalmente de colágenos dos tipos I e II, onde as camadas mais externas do ânulo fibroso são compostas principalmente pelo colágeno do tipo I, enquanto o núcleo pulposo é rico em colágeno do tipo II. Os colágenos dos tipos V e XI são encontrados em baixa quantidade e constituem as fibras híbridas em conjunto com os colágenos dos tipos I e II. O colágeno do tipo IX é encontrado na superfície do colágeno do tipo II, enquanto os colágenos dos tipos XII e XIV podem ser encontrados de forma similar nas fibras de colágeno do tipo I. Os colágenos dos tipos III e VI foram descritos de forma peculiar cercado as células do AF e NP. Em discos adultos também foram encontrados colágeno do tipo X (ROUGHLY, 2004).

2.4 Aspectos Epidemiológicos e Fisiopatologia da Hérnia de Disco

A dor na região lombar e dor radicular nos membros inferiores são problemas comuns encontrados na medicina física e reabilitação. De acordo com Toktas et al., (2015), a dor lombar é causa mais associada com a incapacidade relacionada ao trabalho em indivíduos com menos de 45 anos de idade. A degeneração do disco intervertebral e a hérnia de disco lombar tem se tornado as principais causas das dores na região lombar (RODRIGUES et al., 2011; CHIUM et al., 2014)

As perturbações ocorridas no DI podem causar dor, déficit neurológico além de deficiência em alguns indivíduos afetados. As lombalgias têm se tornado uma enfermidade comum, crônica e de alto custo. As dores nas costas estão presentes em todos os países industrializados, estima-se que mais de 80% da população adulta já foi acometida por dores nas costas em algum momento da vida. A prevalência da dor lombar é de 4,8 em homens e 2,5 em mulheres ambos acima de 35 anos (ZAVARIZE; WECHSLER, 2012).

As lombalgias foram apontadas como sendo 2º causa que mais levou indivíduos a visitas constantes em hospitais, o 5º motivo para internações e a 3º causa mais frequente em procedimentos cirúrgicos. No ano de 2012 os EUA registraram mais de 52 milhões de pacientes

que procuraram ajuda médica por queixas de dor na região lombar, sendo estimado um custo médico direto de aproximadamente 253 bilhões de dólares (BOWLES; SETTON, 2017)

Segundo o IBGE, no Brasil, as dores nas costas, pescoço ou nuca foi o segundo motivo a deixar os trabalhadores fora de suas atividades, perdendo apenas para casos de gripes ou resfriados. As HDL correspondem 5% dos agravos em pacientes com queixas de dor nas costas.

Os discos intervertebrais lombares apresentam mais alterações destrutivas ao longo da vida comparado a outros tecidos musculoesqueléticos e, muitas vezes, participam diretamente nas dores lombar e ciática que afetam os membros inferiores (BEATTIE, 2008; CHIUM et al., 2014).

As hérnias de disco ocorrem com a degeneração das fibras do ânulo fibroso, permitindo que o conteúdo do núcleo pulposo migre do centro para a região periférica, em direção ao canal medular, ou por locais onde passam as raízes nervosas levando então a compressão das raízes nervosas. As hérnias podem surgir resultando de traumas súbitos como também podem surgir a partir de alterações crônicas provindas de alterações catabólicas ao longo da vida, levando então ao enfraquecimento das estruturas do DI (BUCKWALTER, 1995; KADOW et al., 2015).

Quando existe a herniação do disco intervertebral pode desenvolver quatro tipos de progressão: protrusão, prolapso, extrusão ou sequestro discal. Em casos de protrusão o disco fica um pouco saliente. Porém, o anel do ânulo fibroso não se rompe. No prolapso somente as fibras mais externas do ânulo fibroso se rompem, a extrusão é caracterizada pela ruptura de todas as fibras do ânulo fibroso, permitindo então o deslocamento do núcleo pulposo para a região epidural. O sequestro discal é reconhecido pela existência de fragmentos de núcleo pulposo e ânulo fibroso para fora do próprio disco. Essas anormalidades encontradas no DI podem pressionar a coluna medula espinhal, provocando nas pessoas, em alguns casos, muita dor nas costas ou ciática (Figura 4) (KOZACI et al., 2005; RODRIGUES et al., 2011; FRANÇA F. J. R. 2013; VULFSONS et al, 2017; COSTA; SANTOS FILHO, 2018).

As hérnias discais são mais comuns na região lombar, porém, podem também se manifestar nas regiões torácicas e cervicais. As HDLs são causas corriqueiras de dores lombar e ciática causando incapacidade ao indivíduo e grandes perdas econômicas por todo o mundo. O primeiro sinal do surgimento de HDL é uma dor intensa com pontada e queimação, que se espalha pelo nervo ciático, levando então a dificuldade de realizar as atividades diárias,

reduzindo a capacidade laboral e a qualidade de vida do indivíduo (COSTA; SANTOS FILHO, 2018).

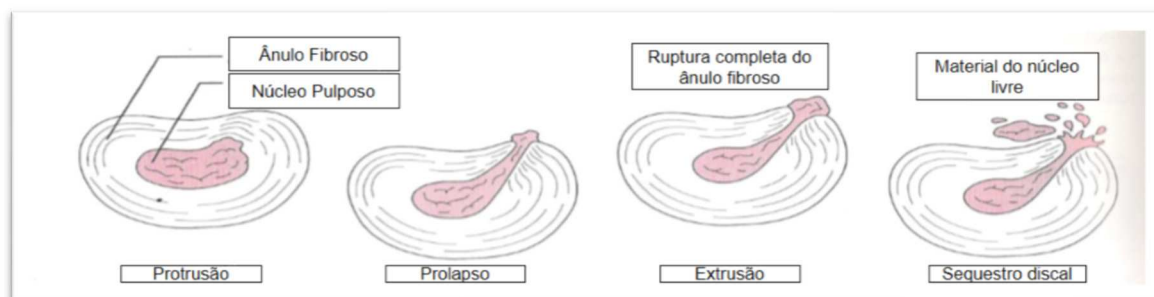


Figura 4: classificação morfológica dos estágios da hérnia de disco. Fonte adaptada, FRANÇA 2013.

A hérnia de disco é uma doença multifatorial, ou seja, resulta da participação de fatores ambientais e genéticos. Até 1992, pensava-se que as HDL eram causadas apenas por envelhecimento, tabagismo crônico, vibração veicular (andar de carro, moto, caminhão, ou seja, veículos automotivos) e pela ocupação dos indivíduos. No entanto, pesquisas recentes envolvendo famílias e gêmeos, destacam que componentes genéticos estão mais associados à doença, deixando os fatores externos em segundo lugar nas influências do surgimento de HDL (DONALLI III; DULEBON, 2017; BONO, 2018; BAGHERI et al., 2016).

O primeiro a propor a influência genética em problemas com os discos intervertebrais foi Jones et al., (1998). Embora os fatores genéticos associados a hérnia de disco ainda não sejam completamente compreendidos, acredita-se que os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem desempenhar um papel significativo na etiologia desta doença (HANAE et al., 2015).

Os SNPs são variações que estão presentes em mais de 1% da população. Cerca de 0,1% do genoma é diferente entre os seres humanos, na maioria das vezes essas diferenças correspondem aos polimorfismos, sendo os SNPs os maiores contribuintes por esta variabilidade genômica (REIS et al., 2016; ADMONI, 2017) (Figura 5).

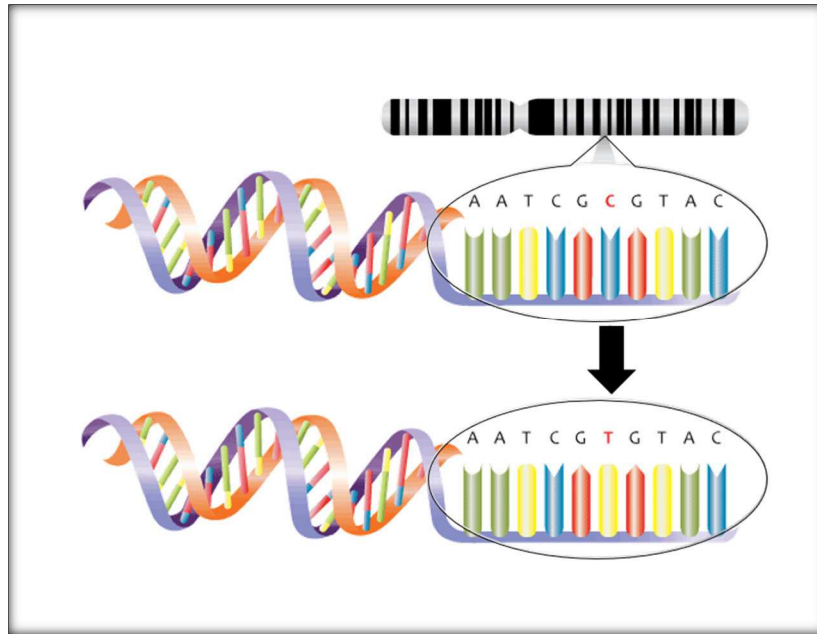


Figura 5: Ilustração esquemática de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Fonte adaptada de <http://www.differencebetween.com/difference-between-snp-and-vs-mutation/>.

Variações genéticas nos componentes do disco intervertebral podem contribuir para o desenvolvimento da HDL através da alteração da homeostase dos discos. Polimorfismos de genes que codificam colágenos I, II, III, IX e XI, proteoglicanos (aggrecan), citocinas (interleucinas I, VI e X), metaloproteinases de matriz II, III e IX e receptor de vitamina D parecem desempenhar papéis consideráveis na patologia desta doença (TOKTAS et al., 2015; ALMEIDA et al., 2014; BAGHERI et al., 2016).

2.5 Colágeno do Tipo IX

O colágeno do tipo IX é um elemento fundamental na composição da cartilagem hialina, desempenhando papel de suporte entre as proteínas colágenas e não colágenas. O colágeno do tipo IX é uma proteína de estrutura heterotrimérica constituída por três cadeias α (alfa), $\alpha 1$ (IX), $\alpha 2$ (IX) e $\alpha 3$ (IX) que são codificadas pelos genes *CO9a1*, *COL9a2* e *COL9A3*, respectivamente. São genes considerados importantes ao risco de desenvolvimento de hérnias de disco e degeneração lombar (NCBI; CHAN et al., 2006; KALB 2012; HOLWERDA, 2014; MYLLYHAR, 2014; RAHIN et al., 2016).

O gene *COL9A3* está localizado no cromossomo 20q13.33, no éxon 33, também conhecido como cadeia de colágeno $\alpha 3$, colágeno do tipo IX $\alpha 3$ dentre outros. Constitui a parte estrutural da matriz extracelular proporcionando resistência as trações além de ser componente estrutural

da cartilagem hialina e humor vítreo presente o olho. Na posição 310 do gene *COL9A3* existe o SNP rs617346 e na posição 51 está presente o SNP 2294984 (dbSNP; GeneCards).

O SNP rs2294984 também é um SNP do tipo *missense* representado pelos alelos A/G, encontra-se localizado na posição 51 do gene *COL9A3* (dbSNP).

O SNP do tipo *missense* rs61734651 corresponde a uma troca de C por T na posição 310 do gene *COL9A3* localizado em 20q13.33 (dbSN). Vários autores o tratam como a troca de uma arginina por um triptofano no códon 103 da proteína colágeno IX na cadeia $\alpha 3$ do gene *COL9A3*, esses mesmos autores denominam o SNP rs61734651 por Trp3, ou alelo Trp3 (JANECZKO et al., 2004; KALES, 2004; RATHOUD et al., 2012; HANAIEI et al., 2015).

O estudo do gene *COL93* tem se tornado necessário para a população mundial, sendo ele é um dos componentes da proteína colágeno do tipo IX, que está presente no núcleo pulposo, ânulo fibroso e nas placas terminais. Em especial, o SNP rs61734651, também denominado por alguns autores por alelo Trp3, é relatado como fator de risco quando existe a troca de uma arginina para um triptofano. O aminoácido triptofano é relativamente raro em colágenos, pois ele é hidrofóbico, A troca da arginina pelo triptofano altera a conformação da tripla hélice da proteína, além de interferir na relação existente entre os colágenos do tipo IX e II ou ainda prevenir a ação da lisil oxidase sendo ela que catalisa a formação das retículas, causando então as lombalgias. (KARPPINEN et al., 2003; ROTHOD et al., 2012).

Sabe-se que a HDL é uma patologia presente em praticamente todo o globo terrestre, sendo assim estudar a genética da doença é de grande importância em todo o mundo. No Brasil ainda são poucos os estudos sobre a genética da doença, principalmente em relação ao SNPs rs2294984 e rs61734651, sobre os mesmos não foram encontrados relatos na literatura, ou seja, estudos dos SNPs com a população brasileira.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação potencial entre a variação polimórfica dos SNPs rs2294984 e rs61734651 do gene *COL9A3* com a hérnia de disco lombar em adultos residentes de Goiânia, Goiás, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer as frequências alélicas e genotípicas do gene *COL9A3* com a população estudada;

- ✓ Investigar polimorfismos do gene *COL9A3* na população estudada e correlacionar os achados com a presença de HDL;

- ✓ Comparar os escores alélicos entre os grupos caso e controle;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

O presente estudo refere-se a um estudo do tipo caso-controle, pareado em quinquênio por sexo e idade. As análises foram conduzidas no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da Escola de Ciências Agrárias e Biológicas da PUC Goiás, juntamente com o Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene)/Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN) da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás (SES-GO).

O grupo caso foi composto por pacientes tratados ou com tratamento fisioterápico em andamento para HDL das Clínicas Escolas das PUC-Goiás, Universidades Estadual de Goiás, Faculdade Padrão, Associação dos Deficientes Físicos do Estado de Goiás (ADFEGO) e no Centro de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo (CRER). Já o grupo controle foi composto por indivíduos da população de Goiânia, sem histórico de lombalgias ou HDL, sendo algumas coletas feitas no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás.

4.2 Considerações éticas

O estudo foi conduzido em conformidade com o disposto na Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUC-Goiás, com a CAAE 16600513.5.0000.0037 e parecer 563.672 (Anexo I). Os participantes foram esclarecidos sobre a pesquisa e procedimentos metodológicos pela equipe antes e durante o curso da mesma. Todos os protocolos seguiram os acordos internacionais de controle de qualidade e ética.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

A pesquisa contou com 118 participantes, sendo 40 casos e 78 controles. Todos os participantes doaram voluntariamente o material biológico para as análises genéticas. Para a coleta de dados, foi aplicada uma ficha de avaliação contendo informações dos dados clínicos, demográficos e antropométricos (Anexo II). Para a escolha dos participantes do grupo caso, as informações coletadas referentes aos dados clínicos, correlacionavam o nível vertebral da HDL e o tipo de herniação, além de histórico familiar para hérnia de disco lombar, prática de atividades físicas, hábitos de vida e doenças concomitantes. Todos os voluntários foram corretamente esclarecidos sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I).

Os parâmetros utilizados para inclusão no estudo foram:

- Homens e mulheres;
- Adultos com idade entre 20 a 60 anos;
- Indivíduos com HDL diagnosticada por exame de imagem (Ressonância Magnética – RM ou Tomografia Computadorizada – TC para confirmar o diagnóstico). Os participantes diagnosticados com hérnia de disco foram encaminhados para compor o grupo Ca;

As medidas tomadas para exclusão do estudo foram: (considerando exames de TC ou RM, diagnóstico médico e relato do participante)

- Pessoas com HDL de traumática;
- Portadores de doenças reumáticas e neurológicas previamente diagnosticadas;
- Pessoas que além de hérnia de disco lombar apresentavam hérnia na região cervical e/ou torácica;
- Indivíduos sem a presença de HDL, mas com a presença de quais quer sintomas de lombalgias, lombocitalgia;
- Pessoas com algum tipo de restrição cognitiva ou que tenha alguém desconforto o qual impediria a realização de coleta de sangue ou dados importantes para a pesquisa;
- Indivíduos com HDL, tratados ou não tratados, de forma cirúrgica ou conservadora;
- Para o grupo controle, foram selecionadas pessoas sem HDL sintomática;

4.4 Coleta de dados

As coletas de dados tiveram início a partir da formação de uma equipe devidamente treinada, só então foi aplicado os questionários e padronizado as metodologias de extração de DNA e técnica de qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa).

O primeiro passo ao conversar com os possíveis participantes foi para esclarecer todas as dúvidas referente à pesquisa e importância da mesma, além de deixá-los cientes que os dados do estudo seriam conservados com total sigilo, e o mesmo teria liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento. Durante o mesmo passo, foram discutidos sobre alguns pontos de exclusão do estudo. Ao se confirmar o potencial enquadramento dos participantes na pesquisa, foi apresentado ao entrevistado o TCLE para leitura e assinatura. No segundo passo, transcorreu a anamnese para coleta de dados utilizando-se uma ficha de avaliação. Ao final de todo o procedimento de anamnese ocorreu o terceiro e último passo, no qual foi realizada a

coleta de sangue periférico por meio de venipunção periférica. Todos os processos foram realizados em espaços adequados e com total privacidade aos entrevistados.

4.4.1 Anamnese Fisioterapêutica

A realização da anamnese ocorreu a partir de uma ficha avaliativa, sendo a mesma composta por dados pessoais, clínicos e hábitos de vida. Nos dados pessoais a intenção era obter informações como: nome, idade, profissão, tempo de profissão, telefone e endereço. Referente aos hábitos de vida as questões eram relacionadas ao estilo de vida dos indivíduos levantando questões como: elitismo e tabagismo, se os participantes faziam ou não a prática regular de exercícios físicos, histórico de doenças concomitantes, dados antropométricos, histórico familiar para HDL, histórico cirúrgicos na coluna lombar. Para os dados clínicos foi questionado sobre a presença ou ausência de HDL, o nível vertebral onde ocorreu a hérnia de disco, grau da hérnia de disco (extrusão, protrusão ou sequestro discal), além de resultados de exames TC e/ou RM.

4.4.2 Medidas antropométricas

Para a mensuração do peso (massa corporal) foi usada uma balança antropométrica (Welmy, Brasil) com capacidade para 150 Kg em frações de 100 g com o voluntário sem calçados. Para a verificação da estatura foi usado um estadiômetro (Welmy, Brasil) com um campo de 0,8 a 2,0 metros, com tolerância de aproximadamente 5 centímetros. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado de acordo com o proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1998, sendo citado pela Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, como uma das formas de classificação da massa corporal, mostrada na Tabela 1. O cálculo do IMC foi feito dividindo-se o peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros: $\text{peso (kg)/altura (m)}^2$ (OMS, 1998; Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2009/2010).

Tabela1: Interpretação das classes de IMC, de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Obesidade (2016) para a estratificação populacional com base nas orientações da OMS.

Classificação	IMC (Kg/m²)
Baixo peso	<18,5
Peso normal	18,5 a 24,9
Sobrepeso ou pré-obeso	25 a 29,9
Obeso I	30,0 a 34,9
Obeso II	35,0 a 39,9
Obeso III	≥40

4.5 Amostras biológicas

Foi coletado de cada participante 4mL de sangue periférico, utilizando o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras biológicas foram aliquotadas e identificadas em microtubos de 2mL e armazenadas em freezer a -20°C, para posteriormente serem utilizadas na técnica de extração de DNA.

4.5.1 Extração e purificação do DNA

O procedimento de extração de DNA foi realizado usando o Kit comercial *IllustraBloodGenomicPrepMini Spin*® (GE Healthcare, UK), de acordo com as orientações do fabricante. O DNA isolado foi identificado e armazenado em freezer a -20°C para mais tarde ser utilizado na genotipagem dos SNPs rs2294984 e rs61734651 do gene *COL9A3*.

4.5.2 Genotipagem pela técnica de qPCR

Foram realizadas pesquisas referentes as variantes polimórficas do gene *COL9A3* relacionando os mesmos com a hérnia de disco lombar em adultos. Os sítios polimórficos rs2294984 e rs61734651 foram genotipados utilizando o kit comercial TaqMan Real Time PCR® (SNP Genotyping kit, da AppliedBiosystems, EUA). O kit continha as sequências senso e antisenso dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) que amplificavam as sequências polimórficas de interesse. Além de duas sondas TaqMan® MGB, no qual para o SNP rs2294984, o alelo A é marcado pelo fluoróforo VIC (amarelo) e o alelo G é marcado pelo fluoróforo FAM (verde). Para o SNP rs61734651 o alelo C foi marcado com o fluoróforo VIC (amarelo) enquanto o alelo T foi marcado com o fluoróforo FAM (verde) (Tabela 2). As genotipagens foram realizadas através de análises do padrão de fluorescências de cada amostra utilizando o termociclador *Rotor-Gene Q*® da QIAGEN – SP.

Tabela2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores do gene *COL9A3* utilizadas na qPCR, para identificar os polimorfismos rs2294984 e rs61734651 em adultos.

Polimorfismo	Sequência dos oligonucleotídeos
rs2294984	5' CCGCTCCTGCTCCTGCTCCTGCTCG[A/G]GGAGCTTCTGGCGGCCGC CGGGGCG 3'
rs61734651	5' TGGACCCAAGGGTGCCCCTGGGGAA[C/T]GGGTAAGTGCCTGCGCC GAACCCAG 3'

Fonte: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2017)

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas, incluindo a estimativa do risco relativo, foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) (IBM, EUA), versão 2.2. Todas as análises estatísticas foram realizadas levando-se em consideração um intervalo de confiança foi de 95% e um nível de significância foi de 5%.

As frequências alélicas entre os grupos caso e controle de ambos os SNPs e a frequência genotípica do SNP rs2294984 foram obtidas a partir do teste de Qui-quadrado (X^2) de Person, já as frequências genotípicas do SNP rs61734651 foram obtidas com o auxílio do teste de X^2 de *Posthoc*. Para calcular o Risco Relativo (RR) foi usado como comorbidade a presença do alelo T na população de casos e controles.

O risco relativo foi calculado a partir do programa SPSS utilizando como comorbidade a presença do alelo T na população de casos e controles.

Também utilizamos o teste de X^2 de *Pearson* no grupo caso para investigar a associação entre as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs com dois tipos de estágios da HDL, sendo eles a extrusão e a protrusão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo participaram 118 indivíduos com média de idade de $42,4 \pm 9,1$. Um total de 43,2% representara o sexo feminino e 56,4% o sexo masculino. De acordo com a Literatura a prevalência das hérnias de disco sintomática foi estimado em cerca de 1 a 3% na população geral, sendo comum em indivíduos com idade entre 30 a 50 anos, atingindo principalmente o sexo masculino. A distribuição por sexo, no presente estudo, está em conformidade com o esperado para a ocorrência de HDL na população mundial (BONO, 2018).

As ocupações relatadas foram agrupadas de acordo com as recomendações da Classificação Brasileira de Ocupação (CBO, 2002). Informações como tempo de profissão e tabagismo dentre outras informações estão apresentadas na Tabela 3. O estilo de vida tem sido muito discutido em diversos estudos que apontam o tabagismo, tipo de ocupação, idade ou até mesmo altura como potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de HDL (IBGE; KARPPINEN et al., 2003; DOS REIS et al., 2001 DONALLI III; DULEBOHN, 2017).

Foi observado uma distribuição homogênea ente os grupos casos e controle, a partir da aplicação do teste X^2 de *Pearson*, que não mostrou diferenças significativas, justificando a adequação dos controles ao grupo de caso no presente estudo.

Tabela3: Associação dos dados demográficos, antropométricos, hábitos de vida, histórico familiar entre os grupos caso e controle para avaliação dos SNPs rs2294984 e rs61734651 e sua associação dá HDL em Goiânia-GO.

	Grupos			P
	Caso	Controle	Total	
	40 (33,9)	78 (66,1)		
	<i>Média ± DP</i>			
Idade (Anos)	42,2 ± 9,2	42,6 ± 9,2	42,4 ± 9,1	0,74*
IMC (Kg/m²)	25,4 ± 3,2	26,0 ± 3,3	25,8 ± 3,3	0,35*
Tempo de Profissão (Anos)	11,6 ± 8,9	12,3 ± 10,0	12,1 ± 9,6	0,90*
	<i>n (%)</i>			
Sexo				
Feminino	17 (42,5)	34 (43,6)	51 (43,2)	0,91**
Masculino	23 (57,5)	44 (56,4)	67 (56,8)	
Profissão				
Estudante	0 (0,0)	6 (7,7)	6 (5,1)	0,24**
Profissionais da ciência	10 (25,0)	19 (24,4)	29 (24,6)	
Serviços administrativos	10 (25,0)	11 (14,1)	21 (17,8)	
Serviços gerais e reparação	10 (25,0)	25 (32,1)	35 (29,7)	
Trabalhadores do Comercio	10 (25,0)	17 (21,8)	27 (22,9)	
Tabagismo				
Não	32 (80,0)	61 (78,2)	93 (78,8)	0,82**
Sim	8 (20,0)	17 (21,8)	25 (21,2)	
Atividade Física				
Não	27 (67,5)	56 (71,8)	83 (70,3)	0,63**
Sim	13 (32,5)	22 (28,2)	35 (29,7)	
Histórico Familiar				
Não	24 (60,0)	55 (70,5)	79 (66,9)	0,25**
Sim	16 (40,0)	23 (29,5)	39 (33,1)	
Estágio de Hérnia				
Extrusão discal	10 (25,0)	NA	NA	NA
Protrusão discal	30 (75,0)			

*Mann-Whitney; **Qui-quadrado; NA = não se aplica

Ao avaliar a distribuição alélica e genotípica para o SNP rs2294984 entre os grupos caso e controle, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A frequência do alelo A no grupo caso correspondeu a 45% e no grupo controle 46,2%, enquanto o alelo G representou 55% no grupo caso e 53,8% no grupo controle. A frequência genotípica do genótipo A/G correspondeu a 90% no grupo caso e 92,3% no grupo controle, enquanto o genótipo G/G representou 10% no grupo caso e 7,7% no grupo controle (Tabela 4). Não foram

encontrados artigos que relacionem o SNP rs2294984 com a hérnia de disco. A falta de associação observado no presente estudo reforça que o polimorfismo rs2294984 não foi um marcador adequado para a HDL na população de Goiânia (Brasil).

Tabela4. Interpretação dos dados estatísticos para a associação alélica e genotípica entre os grupos caso e controle do SNP rs2294984.

	Grupos		Total	P
	Caso	Controle		
rs2294984				
A/G	36 (90,0)	72 (92,3)	108 (91,5)	0,67*
G/G	4 (10,0)	6 (7,7)	10 (8,5)	
rs2294984				
A	36 (45,0)	72 (46,2)	108 (45,8)	0,87*
G	44 (55,0)	84 (53,8)	128 (54,2)	

*Qui-quadrado de Pearson

Por outro lado, para o SNP rs61734651 foi identificado uma redução de cerca de 3x (2,8) na frequência do alelo C entre os casos, quando comparado ao grupo controle. Conseqüentemente, houve um aumento na frequência do alelo T entre os casos. Foi observado um desvio entre os grupos caso e controle para a distribuição alélica e para os genótipos C/T e T/T (Tabela 5). Este desvio do esperado foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) e correspondendo à troca de uma arginina por um triptofano no códon 103 da cadeia $\alpha 3$ (Trp3) da proteína colágeno IX, codificada pelo gene *COL9A3*.

Na literatura o Trp3 é considerado um alelo de risco para as doenças lombares, além da Displasia Epifisária Múltipla. Em um estudo realizado na Turquia foram analisados 75 indivíduos do grupo caso e 25 indivíduos do grupo controle, naquele estudo o alelo Trp3 (alelo T) foi encontrado em 5 indivíduos que compunham o grupo caso, de acordo com os autores esses mesmos indivíduos tinham relatos cirúrgicos do disco lombar (TOKTAS et al., 2015; KARAARSLAN et al., 2017).

Em um outro estudo transversal realizado na Grécia, foram analisados 207 indivíduos divididos em caso controle, sendo 107 do grupo caso e 100 do grupo controle. Ao estudar o gene *COL9A3*, a variante Trp3 no SNP rs61734651 apresentou-se com uma frequência de 4,3% na população de indivíduos portadores de doença do disco intervertebral sintomática. Paasilta et al., (2001) relataram os resultados de um estudo realizado na Finlândia, no qual a presença

do alelo Trp3 foi significativamente maior correspondendo a 12,2% do total de 171 entre os casos de doenças lombares (KALES et al., 2004).

No presente estudo, os dados da frequência de alelo Trp3 sugerem que a presença do alelo T em homozigose pode estar associada ao desenvolvimento da HDL. Em contrapartida, o alelo C poderia atuar como um fator de proteção, reduzindo então a chance de desenvolver a hérnia de disco lombar. Na população de Goiânia, os indivíduos que possuíam o alelo T do SNP rs61734651 em seus genótipos apresentaram cerca de 11% de aumento para ocorrência de HDL, quando comparado com o grupo saudável. Estes achados corroboram com os estudos anteriormente citados e também os resultados de Rahim et al., (2016), que indicaram um aumento de cerca 3 vezes para o desenvolvimento da degeneração do disco intervertebral entre os indivíduos portadores do alelo Trp3.

Tabela 5. Interpretação dos dados estatísticos para a associação alélica e genotípica entre os grupos caso e controle do SNP rs61734651.

	Grupos		Total	P
	Caso	Controle		
rs61734651				
C/C	0 (0,0)	1 (1,3)	1 (0,8)	0,47**
C/T	4 (10,0)	20 (25,6)	24 (20,3)	0,04**
T/T	36 (90,0)	57 (73,1)	93 (78,8)	0,03**
rs61734651				
C	4 (5,0)	22 (14,1)	26 (11,0)	0,03*
T	76 (95,0)	134 (85,9)	210 (89,0)	

*Qui-quadrado de Pearson; **Qui-quadrado Posthoc

Em um outro estudo do tipo transversal foram analisados 135 homens, nesse estudo observou-se a associação da obesidade persistente e o gene *COL9A3* com a degeneração do disco intervertebral. Em seus resultados eles observaram que 17% dos indivíduos eram portadores do alelo Trp3 (T), de acordo com os autores de 45 a 71% da degeneração do disco em indivíduos com obesidade persistente pode ser devido à combinação de fatores como a obesidade e a presença do alelo Trp3 (SOLOVIEVA et al., 2002; TOKTAS et al., 2015).

Para avaliação da idade e IMC, em função do genótipo do SNP rs61734651 dos grupos caso e controle utilizamos o teste de Pearson. A partir do teste não foi encontrada significância estatística, em relação as análises testadas (Gráfico 1).

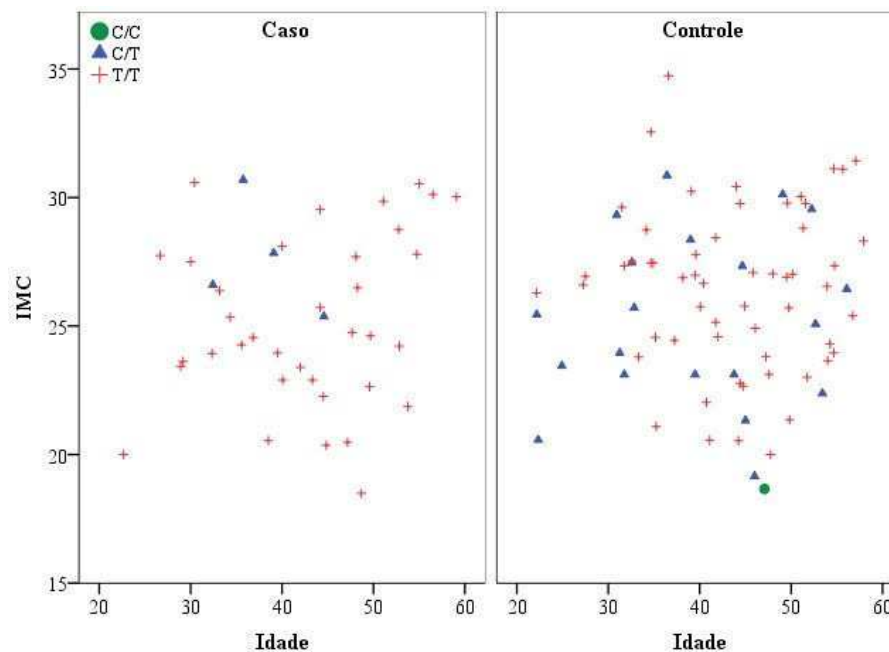


Gráfico1: interpretação dos dados estatísticos para correlação do IMC e idade em função do genótipo do grupo caso e controle.

No entanto em um outro estudo no Sul da China foram analisados 810 indivíduos com idade entre 18 a 55 anos, eles foram testados para os genes *COL9a1*, *COL9a2* e *COL9A3*. Para o alelo Trp3, apenas 88 indivíduos foram avaliados e o alelo T não foi observado entre os participantes (JIM et al., 2005). De acordo com o banco de dados NCBI, 1000 genomas, não foram encontrados relatos para o SNP rs61734651 na população asiática. Sendo assim, a presença ou ausência de Trp3 numa população pode ser afetada pela etnia.

Para observar se há associação entre os SNPs rs227394984 e rs61734651 com os dois estágios da HDL, extrusão e protrusão, foi usado o teste de X^2 de *Pearson*. Foram testados 40 indivíduos, ou seja, apenas os participantes que compuseram o grupo caso, os quais foram separados pelo nível da hérnia de disco lombar em extrusão e protrusão.

Não foi encontrado na literatura relação direta entre protrusão ou extrusão com a presença dos SNPs rs2294984 ou rs61734651(Trp3). No entanto, em diversos artigos, foi citado que a presença do SNP rs61734651 (Trp3) pode aumentar o risco da degeneração discal (SOLOVIEVA et al., 2002; KARPPINEN et al., 2003; RAHIN et al., 2016). De acordo com Paasilta et al., (2001) a presença do alelo Trp3 pode aumentar em até 3 vezes o risco de desenvolver alguma doença do disco intervertebral.

De acordo com o banco de dados dbSNP o SNP, rs2294984 é representado pelos alelos A/G, onde o alelo ancestral é representado por G. Após realizar teste de *qui-Quadrado de*

Perason para os indivíduos que compuseram o grupo caso verificamos que houve uma frequência de 50% do alelo A para extrusão e 43,3% do mesmo alelo para protrusão. Já para o alelo G, encontramos uma frequência de 50% para os indivíduos portadores de extrusão e 56,7% do mesmo alelo para os portadores de protrusão.

Referente aos resultados genotípicos foram observados para A/G uma frequência de 100% para os indivíduos portadores de extrusão e 86,7% para protrusão. Enquanto que para o genótipo G/G observou-se uma frequência de 0% para extrusão e 13,3% para protrusão, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6: Associação da distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs2294984 e rs61734651 do gene *COL9A3* entre o grupo caso e dois estágios da hérnia de disco lombar.

	Estágio de Hérnia n (%)		Total	p*
	Extrusão discal	Protrusão discal		
rs2294984				
A/G	10 (100,0)	26 (86,7)	36 (90,0)	0,22
G/G	0 (0,0)	4 (13,3)	4 (10,0)	
rs61734651				
C/T	1 (10,0)	3 (10,0)	4 (10,0)	0,99
T/T	9 (90,0)	27 (90,0)	36 (90,0)	
rs2294984				
A	10 (50,0)	26 (43,3)	36 (45,0)	0,60
G	10 (50,0)	34 (56,7)	44 (55,0)	
rs61734651				
C	1 (5,0)	3 (5,0)	4 (5,0)	0,99
T	19 (95,0)	57 (95,0)	76 (95,0)	

*Qui-quadrado de Pearson

De acordo com o Banco de dados dbSNP, o SNP rs61734651 é representado como C/T, sendo o alelo C o ancestral. Após a realização do teste de X^2 Foi identificado que o alelo C correspondeu a 5% da frequência em indivíduos portadores de extrusão e 5% em indivíduos portadores de protrusão. Nos achados genotípicos encontramos 10% de C/T para protrusão e extrusão, enquanto para T/T encontramos 90% para ambos os grupos (Tabela 6).

Após a realização dos testes estatísticos não foram encontramos associação alélica ou genotípica de nenhum dos SNPs avaliados no presente estudo com os estágios da hérnia de disco lombar aqui investigados. O que demonstra que a presença do alelo selvagem ou alelo

mutado não contribuiu para a progressão da hérnia de disco. No presente estudo, o alelo T do SNP rs61734651 do gene *COL9A3* pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento da hérnia de disco, mas não para a sua evolução clínica. O genótipo A/G do SNP rs2294984 foi o de maior frequência nos grupos caso e controle, apesar de não ter sido identificada diferença estatisticamente significativa.

As informações genéticas correspondem a um componente chave na degeneração do disco intervertebral. O envolvimento considerável de fatores genéticos neste processo de adoecimento da população aponta para perspectivas relevantes em relação ao diagnóstico e a prevenção. Nesse sentido, já é possível pensar estratégias da medicina personalizada para a HDL e também se oportuniza a propositura de estudos adicionais que investiguem a contribuição dos SNPs na suscetibilidade para o desenvolvimento da hérnia de disco lombar em diferentes populações.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi avaliada a associação entre SNPs do gene *COL9A3* (rs2294984 e rs61734651) com a hérnia de disco lombar na população de Goiânia (Brasil). Os resultados de 118 indivíduos avaliados, divididos em grupos caso e controle apontaram:

- ✓ Não foi observada relação entre as frequências alélicas e genotípicas do SNP rs2294984 com a hérnia de disco lombar;
- ✓ O alelo Trp3 no SNP rs61734651 aumentou em 11% a chance de desenvolver HDL entre os portadores, quando comparado ao grupo saudável;
- ✓ O alelo T do SNP rs61734651 do gene *COL9A3* pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento da hérnia de disco, mas não para sua evolução clínica;
- ✓ Não foram encontrados associação alélica ou genotípica de nenhum dos SNPs avaliados com os estágios da hérnia de disco lombar.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMONI SHARON NINA. O polimorfismo de um único nucleotídeo rs713041 no gene GPX4 modula a susceptibilidade à neuropatia autonômica cardiovascular em portadores de diabetes mellitus tipo 1. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2017.

ALMEIDA T. R. S. H.; HENRIQUE M. D.; MOURA M. E. L.; et al. 2014 **Hérnia de Disco Lombar: Riscos e Prevenção**. *Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança–Dez*, v. 12, n. 2.

ANTÔNIO, S. F.; PERNAMBUCO, R. A. 2014. **Diagnóstico diferencial das cervicalgias**. *RBM Rev Bras Med. online*, disponível em: http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=1434&fase=imprime. Acessado em 16 de fevereiro 2018.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO). *Diretrizes Brasileiras de Obesidade* (2016). Disponível em: <http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/92/57fcc403e5da.pdf>. Último acesso em: 03 de março de 2018

Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=1299. Último acesso em 03 de março de 2018.

Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=1299. Último acesso em: 03 de março de 2018.

BAGHERI M. H.; AMIR P. H.; MAJID M. S.; et al. 2016 **MRI Phenotyping of COL9A2/Trp2 and COL9A3/Trp3 Alleles in Lumbar Disc Disease: A Case-control Study in South-Western Iranian Population Reveals a Significant Trp3-Disease Association in Males**. *Spine*, v. 41, n. 21, p. 1661-1667.

BRAUN R. A.; MILITO F. R. B.; et al. 2016 **Vértebras em marfim: achados de imagem nos diferentes diagnósticos**. *Radiologia Brasileira*, v. 49, n. 2.

BEATTIE P. 2008 **Current understanding of lumbar intervertebral disc degeneration: a review with emphasis upon etiology, pathophysiology, and lumbar magnetic resonance imaging findings**. *journal of orthopaedic & sports physical therapy*, v. 38, n. 6, p. 329-340.

- BONO C. M. 2018. **Lumbar Disc Herniation and Radiculopathy**. In: *Principles of Orthopedic Practice for Primary Care Providers*. Springer Cham. p. 37-46.
- BOWLES R. D.; SETTON, L. A. 2017. **Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair**. *Biomaterials*, v. 129, p. 54-67.
- BUCKWALTER J. A. 1995 **Aging and degeneration of the human intervertebral disc**. *Spine*, v. 20, n. 11, p. 1307-1314.
- BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Populacional 2010a. Disponível em: < <http://censo2010.ibge.gov.br/> >, acessado em: 09 novembro de 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. Classificação Brasileira de Ocupações (CBO) 2002. Disponível em <<http://www.mtecbo.gov.br/cbsite/pages/informacoesGerais.jsf#6>>. Acessado em: 28 de fevereiro de 2018.
- CARVALHO L. B.; OYAKAWA A.; MARTINS R. S.; et al 2013 **Hérnia de disco lombar: tratamento**. *Revista Acta Fisiátrica*, v. 20, n. 2, p. 75-82, 2016.
- CHAN D.; SONG Y.; SHAM P. 2006. **Genetics of disc degeneration**. *European spine journal*, v. 15, n. 3, p. 317-325, 2006.
- CHIU, C. C.; CHUANG T.Y.; CHANG K.H. et al. 2014. **The probability of spontaneous regression of lumbar herniated disc: a systematic review**. *Clinical rehabilitation*, v. 29, n. 2, p. 184-195.
- COSTA S. O.; SANTOS FILHO, S. D.; 2018. **Atuação da hidroterapia em idosos com hérnia de disco: uma revisão de literatura**. *Research, Society and Development*, v. 7, n. 3, p. 6.
- DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE 2009/2010 (ABESO) – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 3ed. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009
- DEFINO H. L. A. 1999 **Trauma raquimedular**. *Medicina* v. 32, n. 4, p. 388-400, 1999.
- DONNALLY III, C. J.; DULEBOHN, S. C. 2017 **Lumbar Degenerative Disk Disease**. *Radiology* v. 245, n 1, p 43 – 6.

DOS REIS W. D.; NASCIMENTO R. C. R. C. V.; ET AL. 2017. **Benefícios da musculação para portadores de hérnia de disco.** *Revista da Universidade Ibirapuera*, v. 13, p 56-61.

EL-KHOURY G. Y.; WHITTEN C. G. 1993. **Trauma to the upper thoracic spine: anatomy, biomechanics, and unique imaging features.** *AJR. American journal of roentgenology*, v. 160, n. 1, p. 95-102.

FILHO, DÉLIO EULÁLIO MARTINS FILHO. Densidade de células metabolicamente ativas nos discos interVértébrais lombares de humanos e sua relação com a vascularização da placa terminal. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2014

FRANÇA F. J. R.; BURKE T. N.; CLARET D. C.; et al. 2008 **Estabilização segmentar da coluna lombar nas lombalgias: uma revisão bibliográfica e um programa de exercícios.** *Fisioterapia e Pesquisa*, v. 15, n. 2, p. 200-206.

FRANÇA Fabio Jorge Renovato. Estabilização Segmentar Lombar e TENS na Hérnia Discal Lombar: Um Segmento Clínico Randomizado. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina de São Paulo. São Paulo, São Paulo, 2013.

GeneCardsSuite Banco de dados: disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL9A3>. Último acessado em: 17 de fevereiro de 2018.

HANAEI S.; ABDOLLAHZADE S.; KHOSHNEVISAN A.; ET AL. 2015. Genetic aspects of intervertebral disc degeneration. **Reviews in the neurosciences**, v. 26, n. 5, p. 581-606.

Holwerda Teri Lynn. Effects of Individual Characteristics and Symptoms on Physical Function in Persons with Lumbar Degenerative Conditions. Tese (Doutoranda em Fisiologia) Michigan State University. Michigan, 2014.

HUMZAH M. D.; SOAMES R. W. 1988 **Human intervertebral disc: structure and function.** *The Anatomical Record*, v. 220, n. 4, p. 337-356.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE): <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad98/saude/metodologia.shtm> Último acesso em: 02 de agosto de 2017.

JANECZKO Ł.; JANECZKO M.; Chrzanowski R.; et al. 2014. **The role of polymorphisms of genes encoding collagen IX and XI in lumbar disc disease.** *Neurologia i neurochirurgia polska*, v. 48, n. 1, p. 60-62.

JIM J. T.; HIETALA N. N.; KENNETH M.C.; et al 2005. **The TRP2 allele of COL9A2 is an age-dependent risk factor for the development and severity of intervertebral disc degeneration.** *Spine*, v. 30, n. 24, p. 2735-2742.

JONES G. et al. 1998. **Allelic variation in the vitamin D receptor, lifestyle factors and lumbar spinal degenerative disease.** *Annals of the rheumatic diseases*, v. 57, n. 2, p. 94-99.

KADOW, T.; GWENDOLYN S. NAM V.; et al. **2015 Molecular basis of intervertebral disc degeneration and herniations: what are the important translational questions?** *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, v. 473, n. 6, p. 1903-1912.

KALB S.; MARTIROSYAN N. L.; KALANI M. Y. S.; et al. 2012. Genetics of the degenerated intervertebral disc. **World neurosurgery**, v. 77, n. 3, p. 491-501.

KALES, S. N.; LINOS A.; CHATZIS C.; et al. 2004. The role of collagen IX tryptophan polymorphisms in symptomatic intervertebral disc disease in Southern European patients. **Spine**, v. 29, n. 11, p. 1266-1270.

KAMPER M.; HAMANN N.; PREIN C.; et al. 2016. **Early changes in morphology, bone mineral density and matrix composition of vertebrae lead to disc degeneration in aged collagen IX^{-/-} mice.** *Matrix Biology*, v. 49, p. 132-143.

KARARSLAN N.; KAYA Y. E.; YILMAZ I.; et al. 2017. Will it be possible to prevent lumbar degenerative disc diseases in the future by means of vitamin D receptor gene manipulation. *Journal of Medicine and Medical Science*, v 5, online, disponivel em: https://www.researchgate.net/profile/Ibrahim_Yilmaz2/publication/320305896_Will_it_be_possible_to_prevent_lumbar_degenerative_disc_diseases_in_the_future_by_means_of_vitamin_D_receptor_gene_manipulation/links/59de16940f7e9bec3bae124b/Will-it-be-possible-to-prevent-lumbar-degenerative-disc-diseases-in-the-future-by-means-of-vitamin-D-receptor-gene-manipulation.pdf. Acessado em: 17 de fevereiro de 2018.

KARPPINEN J.; PAAKKO, E.; PAASSILTA P.; et al. 2003. **Radiologic phenotypes in lumbar MR imaging for a gene defect in the COL9A3 gene of type IX collagen.** *Radiology*, v. 227, n. 1, p. 143-148.

KELEMPISIOTI A.; ESKOLA P. J.; OKULOFF A.; et al. 2011. **Genetic susceptibility of intervertebral disc degeneration among young Finnish adults.** *BMC medical genetics*, v. 12, n. 1, p. 153.

LUCHTMANN M.; FIRSCHING R. 2016 **Lumbar Disc Herniation: Evidence-based Guidelines-a Review**. *The Indian Practitioner*, v. 69, n. 3, p. 61-66.

MARTIN M. D.; BOXELL C. M.; MALONE D. G. 2002 **Pathophysiology of lumbar disc degeneration: a review of the literature**. *Neurosurgical focus*, v. 13, n. 2, p. 1-6.

MYLLYHARJU J. 2014. **Extracellular matrix and developing growth plate**. *Current osteoporosis reports*, v. 12, n. 4, p. 439-445.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1299>. Acessado em: 02 de agosto de 2017.

NASCIMENTO, M. T. A. 2017 **Exercícios para a Musculatura Estabilizadora do Tronco: Uma Proposta de Treinamento**. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. Ano 2, Vol. 1. pp 321-330.

NETO A. R. R.; BARRETO G. A.; CORTEZ P. C. 2006 **SINPATCO: Sistema inteligente para diagnóstico de patologias da coluna vertebral**. In: *Congresso Brasileiro de Automática*. 2006. p. 929-934.

NEWELL N.; LITTLEB J. P.; CHRISTOU A.; 2017. **Biomechanics of the human intervertebral disc: A review of testing techniques and results**. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 69, p. 420-434.

Organização das Nações Unidas no Brasil: <https://nacoesunidas.org/tratamento-de-dor-lombar-e-tema-de-novo-fasciculo-de-publicacao-da-opasoms/>. Acessado em: 02 de agosto de 2017.

PAASSILTA P.; LOHINIVA J.; GÖRING H.H. H.; et al. 2001. **Identification of a novel common genetic risk factor for lumbar disk disease**. *Revista Jama*, v. 285, n. 14, p. 1843-1849.

PLÁCIDO, Sara Cristina Martins Plácido. Avaliação Biomecânica das Vértebras C6 – C7 e Disco Intervertebral. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Biomédica) Instituto Politécnico de Bragança. Portugal, Bragança, Santa Apolónia. 2015.

RAHIM M.; COLLINS M.; SEPTEMBER A. 2016. **Genes and musculoskeletal soft-tissue injuries**. *Genetics and Sports*. Karger Publishers, v, 61 p. 68-91.

REIS L. M.; RODRIGUES F. W.; SILVA R.E.; et al. 2016. **Análise da relação da ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único do gene DOCK9 em ceratocone.** *Revista Brasileira de Oftalmol*, v. 75, n. 3, p. 223-7.

RODRIGUES L. M. R.; THÉRÉSE R. T.; MADER A. M.; 2011. **Análise comparativa histopatológica entre a hérnia de disco contida e extrusa.** *Coluna/Columna*, v. 10, n. 1, p. 55-57.

ROUGHLEY, P. J. 2004. **Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix.** *Spine*, v. 29, n. 23, p. 2691-2699.

RATHOD T.N.; CHANDANWALE A. S.; GUJRATHI S.; et al 2012. **Association between single nucleotide polymorphism in collagen IX and intervertebral disc disease in the Indian population.** *Indian journal of orthopaedics*, v. 46, n. 4, p. 420.

SANTOS M. 2003. **Hérnia de disco: uma revisão clínica, fisiológica e preventiva.** *Revista Digital*, v. 65, p. 1.

SOLOVIEVA S.; LOHINIVA J.; LEINO-ARJAS P.; et al. 2002. **COL9A3 gene polymorphism and obesity in intervertebral disc degeneration of the lumbar spine: evidence of gene-environment interaction.** *Spine*, v. 27, n. 23, p. 2691-2696.

TOKTAŞ Z. O.; EKŞİ M. S.; YILMAZ B.; et al. 2015 Association of collagen I, IX and vitamin D receptor gene polymorphisms with radiological severity of intervertebral disc degeneration in Southern European Ancestor. **European Spine Journal**, v. 24, n. 11, p. 2432-2441.

URBAN, J. P. G.; ROBERTS, S.; RALPHS, J. R. 2000. **The nucleus of the intervertebral disc from development to degeneration.** *American Zoologist*, v. 40, n. 1, p. 53-61.

VIALLE E.; UEDA W. K.; VIALLE, L. R. G. 2016 **Resultados do tratamento da hérnia discal lombar aguda com bloqueio anestésico transforaminal.** *Coluna/Columna*, v. 15, n. 3, p 191-194.

VULFSONS S.; BAR N.; 2017 **EISENBERG, Elon. Back Pain with Leg Pain.** *Current pain and headache reports*, v. 21, n. 7, p. 32.

ZAVARIZE, S. F.; WECHSLER, S. M. 2012. **Perfil criativo e qualidade de vida: implicações em adultos e idosos com dor lombar crônica.** *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 15, n. 3, p. 403-414.

8. ANEXOS

Anexo I: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de polimorfismos nos genes COL9A2 e Agrecan em indivíduos com hérnia de disco lombar.

Pesquisador: Nara Lígia Leão Casa

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 16600513.5.0000.0037

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC/Goias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC/Goias

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 563.672

Data da Relatoria: 26/02/2014

Apresentação do Projeto:

A presente proposta de estudo será conduzida no NPR (Núcleo de Pesquisas Replicon) da PUC-Goias e no LaGene (Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/Lacen, Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Sysneiro, SES-GO, Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de Goias. Amostras de sangue periférico (SP) serão obtidas de indivíduos com idade entre 30 e 55 anos, de ambos os sexos, que são ou foram atendidos nas clínicas escolas de fisioterapia da Pontifícia Universidade Católica de Goias (PUC-Goias, Universidade do Estado de Goias (UEG) e Faculdade Padrão em Goiania.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a possível associação entre os polimorfismos nos genes COLA92 e Agrecan com a hérnia de disco lombar.

Objetivo Secundário:

- Verificar alterações genéticas nos genes COL9A2 e Agrecan associadas à hérnia de disco lombar;
- Estabelecer as frequências alélicas e genotípicas do SNP rs7533552 no gene COL9A2;
- Estabelecer as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs1042631 e rs1516797 no gene

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 74.605-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3946-1512 **Fax:** (62)3946-1070 **E-mail:** cep@pucgoias.edu.br



Continuação do Parecer: 563.672

Agregan;

- Verificar a prevalência diferencial da hérnia de disco lombar em homens e mulheres;
- Utilizar os resultados obtidos para sugerir medidas de prevenção e orientação de hábitos cotidianos para o paciente e família.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pedidos de adequações foram atendidos: foi providenciado o cadastramento do LaGene como instituição coparticipantes, com o anexo de ciência da instituição como coparticipante e a Universo foi removida do projeto; o TCLE foi reformulado como solicitado pelo CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram atendidos.

Recomendações:

As recomendações foram atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências e/ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A aprovação deste, conferida pelo CEP, não isenta o Pesquisador de prestar satisfação sobre sua Pesquisa em casos de alteração de amostra ou centros de coparticipação. É exigido a entrega do relatório final após conclusão da pesquisa.

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069

Bairro: Setor Universitário

CEP: 74.605-010

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3946-1512

Fax: (62)3946-1070

E-mail: cep@pucgoias.edu.br

Anexo II.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada “ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NA REGIÃO VNTR DO GENE *AGGRECAN* E A HÉRNIA DE DISCO LOMBAR”.

Meu nome é Nara Lígia Leão Casa, sou fisioterapeuta e responsável (sob orientação da Prof. Dra. Maria Paula Curado e co-orientação do Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz) por esta pesquisa. A área de atuação é em saúde. Após ler este documento com atenção e estar esclarecido(a) sobre as informações necessárias, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final do documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é da pesquisadora responsável. Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Nara Lígia Leão Casa nos telefones (62) 99645497 ou (62) 30155009 ou em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo telefone (62) 3946-1512.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA

O título do estudo é “ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NA REGIÃO VNTR DO GENE *AGGRECAN* E A HÉRNIA DE DISCO LOMBAR”.

Esta pesquisa justifica-se por serem a lombalgia e a lombociatalgia sintomas comumente associados à hérnia de disco lombar, sendo os mesmos vistos como problemas de saúde pública nas sociedades industrializadas. Apesar de tradicionalmente, a degeneração discal e hérnia de disco lombar estarem associadas a fatores ambientais, ergonômicos e antropométricos, estudos relatam que a hereditariedade tem papel relevante nas mesmas. Isso tem despertado interesse por estudar a predisposição genética para a hérnia de disco lombar, envolvendo genes como o *aggrecan*, citado em estudos recentes. Apesar de ser uma condição benigna, a hérnia de disco lombar apresenta alto acometimento em adultos e alta frequência nos consultórios médicos e fisioterápicos. No Brasil, poucos estudos foram conduzidos visando associar a hérnia de disco e polimorfismos no gene *aggrecan*. Espera-se que os dados obtidos a partir deste estudo possam contribuir para o conhecimento das comunidades médica, fisioterápica e científica trazendo informações que colaborem com a prevenção e tratamento dos indivíduos acometidos.

- Sua participação será de grande importância para este estudo, pois através dela poderemos correlacionar alterações genéticas com a hérnia de disco lombar.

- O objetivo da presente pesquisa é investigar a possível correlação entre os polimorfismos no gene *AGGRECAN* com a hérnia de disco lombar em homens e mulheres domiciliados na região metropolitana de Goiânia, buscando utilizar os resultados obtidos para sugerir medidas de prevenção e orientação de hábitos cotidianos para o paciente e família.

- Sua colaboração é importante e necessária para o desenvolvimento do estudo, porém é totalmente **VOLUNTÁRIA**.

- O estudo será realizado através de uma ficha de avaliação para anotação de dados antropométricos, dados relacionados ao diagnóstico de hérnia de disco lombar e resultados das análises genéticas. Será realizada a coleta de amostra biológica (sangue) para realização das avaliações genéticas.

- Será feita a coleta de 4 mL de sangue venoso mediante a punção do antebraço com anticoagulante para evitar a coagulação do sangue. Da amostra de sangue, será feita extração do DNA para determinação genético-molecular. Os tipos genéticos serão confrontados com as repostas e as alterações individuais e o exame terá a finalidade de avaliar se existe alguma correlação entre a hérnia de disco lombar e as alterações genéticas encontradas.

- A coleta de sangue e dos dados clínicos e antropométricos serão realizados no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) e locais com prévia autorização (Centro de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo CRER, Associação dos Deficientes Físicos de Goiás ADFEGO, Clínicas Escolas da Universidade do Estado de Goiás, PUC-GOIÁS e Faculdade Padrão). Os demais procedimentos citados anteriormente serão realizados no NPR da Pontifícia Universidade Católica de Goiás na Rua 235 nº 40 Área 4 Bloco L - Setor Universitário.

- Nenhuma pesquisa com os seres humanos é livre de riscos. Os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem risco mínimo aos participantes. Os principais riscos envolvidos neste estudo são: Hematoma e formação de edema (inchaço) pelo extravasamento de sangue no local da coleta, lipotímia (queda de pressão), fatos consequentes da coleta sanguínea por nervosismo e Aicmofobia (medo de agulha). Caso ocorra qualquer intercorrência devido a coleta sanguínea os pacientes serão encaminhados ao **Serviço de Atendimento Médico (SAS/SESMT)** da PUC-Goiás. Este encaminhamento poderá ocorrer em qualquer momento, não só durante ou após o termino do estudo, mas também tardiamente, desde que seja detectado o problema.

- Caso haja qualquer dano psicológico a qualquer dos participantes da pesquisa, os mesmos serão encaminhados ao **Centro de Estudo Pesquisas Práticas Psicológicas (CEPSI)** da PUC-Goiás. Este encaminhamento poderá ocorrer em qualquer momento, não só durante ou após o termino do estudo, mas também tardiamente, desde que seja detectado o problema.
- Após a realização do exame, o sangue será desprezado de acordo com as normas previstas pela RDC N°33/ANVISA.
- As fichas de avaliação serão armazenadas por 5 anos no Núcleo de Pesquisa Replicon da PUC-Goiás e posteriormente serão descartadas.
- Será mantido sigilo absoluto em relação aos nomes dos participantes da pesquisa.
- Os resultados encontrados terão finalidade apenas para a pesquisa.
- Caso queira saber das informações adicionais, entre em contato com a pesquisadora em qualquer momento do estudo pelos telefones já informados acima.
- Caso desista de participar, poderá manifestar-se sobre a decisão em **qualquer momento** e não sofrerá nenhuma restrição.
- Não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação, porém o participante que se sentir prejudicado com a pesquisa, poderá recorrer a Justiça Comum e o que for decidido judicialmente será acordado pelo pesquisador da pesquisa. No que se diz respeito ao ressarcimento financeiro, **NÃO HAVERÁ** nenhum gasto por parte dos indivíduos envolvidos na pesquisa, pois este custo será de responsabilidade da pesquisadora responsável.
- Caso você tenha algum gasto referente **à sua participação nesta pesquisa**, como transporte até o local da coleta de dados, você será ressarcido pela pesquisadora responsável.
- Os resultados individuais e coletivos do estudo serão repassados após o término da pesquisa, bem como serão divulgados o dia e o local da defesa deste estudo.
- Sua participação será muito importante, pois poderá contribuir nas ações de promoção e prevenção na saúde.

Goiânia, _____ de _____ de 20__.

Nara Lígia Leão Casa
Pesquisadora responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Eu, _____,

RG: _____ CPF: _____, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa intitulada é “ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NA REGIÃO VNTR DO GENE *AGGRECAN* E A HÉRNIA DE DISCO LOMBAR” como voluntário.

Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pela pesquisadora Nara Lígia Leão Casa sobre os procedimentos envolvidos na pesquisa, assim como os possíveis riscos e sobre os benefícios para a pesquisa.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

A pesquisadora responsável garantiu-me sigilo e privacidade dos meus dados pessoais e os resultados encontrados no exame realizado.

Goiânia, _____ de _____ de 20____.

*

Nome e Assinatura do participante

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____.

Nome: _____.

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do participante em participar da pesquisa.

Nome e Assinatura da pesquisadora

Anexo III.

Ficha de Avaliação

Nº _____

FICHA DE AVALIAÇÃO

1. DADOS PESSOAIS

DATA: ___/___/___

Nome: _____

Idade: _____ Data de nascimento: _____

Nacionalidade: _____ Naturalidade: _____

Sexo: ()M ()F

Profissão: _____ Se

aposentado descreva ocupação anterior: _____

Telefone: _____ / _____

Endereço: _____

2. ANAMNESE

a) Diagnóstico de hérnia de disco lombar: _____

b) Resultado do exame de imagem: _____

c) Hábitos de vida:

Tabagismo: Sim () Não ()

Tempo de tabagismo: _____

Etilismo: Sim () Não ()

Tempo de etilismo: _____

d) Prática atividade física regular (considerar duas vezes ou mais por semana):

Sim () Não ()

Qual? _____

Quantas vezes na semana?

2x por semana 3x por semana 4x por semana 5x por semana
 6x por semana Diariamente

e) Antecedentes Cirúrgicos para Coluna Lombar:

Sim Não Qual? _____

f) Doenças Concomitantes:

Sim Não

HAS Diabetes Cardiopatias

Doença da tireoide Doença reumática Doença Neurológica

Outra(s) _____

g) História familiar para hérnia de disco lombar:

Sim Não Não soube relatar

Em caso de resposta SIM indicar grau de parentesco: _____

3. MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS:

Peso: _____ kg. Altura _____ m. IMC: _____

Anexo IV.

Folder

(distribuído aos participantes da pesquisa)

HÉRNIA DE DISCO



REFERÊNCIAS

- APARICIO, J.P., et al. The IL-1 β (=5953 T/C) gene polymorphism associates to symptomatic lumbar disc herniation. *Eur Spine J*, v.20, n.3, p.383-89, 2011.
- CHAN, W.C.W., et al. Structure and biology of the intervertebral disk health and disease. *Orthop. Clin. N Am*, v.42, p.447-464, 2011.
- CONG, L., et al. The interaction between aggrecan gene VNTR polymorphism and obesity in predicting incident symptomatic lumbar disc herniation. *Connective Tissue Research*, v.55, n.5-6, p.384-390, 2014.
- FERNANDEZ, J.S., et al. Correlação do sinalde lasague e manobra de elevação da perna reificada com os achados cirúrgicos em pacientes com cialgia portadores de hérnia discal lombar. *Coluna*, v.11, n.1, p.32-4, 2012.
- VIALLE, L.R., et al. Hérnia discal lombar. *Rev Bras Orto*, v.45, n.1, p.17-22, 2010
- NEGRELLI, WF. Hérnia discal: procedimento de tratamento. *Acta Ort Bras*, v.9, n.4, 2001.
- Physio works. Bulging Disc. Disponível em: http://physioworks.com.au/injuries-conditions-1/bulging_disc

ELABORAÇÃO:
NARA LIGIA LEÃO CASA
FISIOTERAPEUTA, ESPECIALISTA EM FISIOTERAPIA ORTOPÉDICA.
CREFITO 11: 35799F

CUIDADOS POSTURAIS



NO TRABALHO

Procure sentar-se alinhado com o eixo da cadeira, evitando ficar torto. Os pés devem ficar apoiados no chão ou num apoio levemente inclinado. Joelhos em ângulo de 90°. Em frente ao computador ajuste a distância dos olhos ao monitor (cerca de 50cm). Faça pausas regulares, procurando relaxar e alongar.

AO SENTAR

Evite cruzar as pernas ou dobrar muito os joelhos. Mantenha as costas retas e os pés bem apoiados no chão. Caso seus pés não toquem o chão, providencie um apoio e coloque-o sob os pés.



AO LEVANTAR

Dobre os joelhos, vire de lado, e leve o corpo até sentar, ajudando com apoio dos braços.



AO VESTIR

Ao vestir-se ou amarrar sapatos, procure manter-se sentado evitando dobrar o corpo, para que não haja sobrecarga na coluna.



AO ANDAR

Procure andar o mais ereto possível, imaginando que alguém está puxando você para cima.

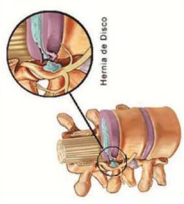


AO DORMIR

A posição ideal é a de lado com os joelhos dobrados e a coluna reta. Use um travesseiro adequado na cabeça e um entre as pernas. Se for dormir de costas, os travesseiros devem ser colocados abaixo da cabeça e dos joelhos. Nunca durma de barriga para baixo!

O QUE É HERNIA DE DISCO?

A coluna vertebral é composta por vértebras. No seu interior existe um canal por onde passa a medula espinhal. Entre as vértebras cervicais, torácicas e lombares estão os discos intervertebrais, estruturas em forma de anel, compostos por tecido cartilaginoso e elástico. São constituídos por três elementos integrados que atuam para facilitar os movimentos da coluna e absorver os impactos durante as atividades cotidianas.



Os discos desgastam-se ou degeneram-se com o tempo e o uso repetitivo, o que facilita a formação da hérnia de disco. A hérnia discal caracteriza-se pelo deslocamento ou projeção do núcleo pulposo através do ânulo fibroso degenerado. Ocorre em qualquer nível vertebral, sendo mais frequente na região baixa da coluna, designada como lombar. Estima-se que 2 a 3% da população possam ser afetados, sendo mais comum nos homens acima de 35 anos de idade.

SINAIS E SINTOMAS

Dor na coluna lombar que pode evoluir para lombociatalgia, descrita como dor lancinante ou em queimação, que irradia inferiormente pelas faces posterior ou lateral da perna, frequentemente associada a alterações de sensibilidade.

CAUSA

Predisposição genética é um importante fator de risco para a degeneração do disco e consequente formação da hérnia discal lombar, além de fatores ambientais e ergonômicos, como atividades laborais que sobrecarregam e/ou provocam vibração sobre a coluna vertebral, fumo, obesidade e trauma.

TRATAMENTO

Os objetivos do tratamento são aliviar a dor e estimular a recuperação neurológica, promovendo o retorno precoce às atividades da vida diária e ao trabalho. O tratamento conservador é eficaz em 80% dos casos, incluindo analgésicos, AINES e fisioterapia. Dentre os recursos fisioterapêuticos, destacam-se a fisioterapia manual, exercícios de estabilização vertebral, Reeducação Postural Global (RPG) e pilates. Na falha do tratamento conservador ou nos casos de progressão dos sintomas neurológicos, a cirurgia está indicada.

ORIENTAÇÃO

Apesar de ser uma doença benigna, a hérnia de disco lombar afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes. Cuide da saúde da sua coluna, conhecendo os fatores de risco, adquirindo hábitos de vida saudáveis e tendo uma postura correta no dia-a-dia. Importante o acompanhamento com o médico e fisioterapeuta.