

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

Interação entre polimorfismos do gene VDR e padrões de
atividade física na determinação da DMO de mulheres
brasileiras no período pós-menopausa

PAULO GENTIL

BRASÍLIA-DF
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULO GENTIL

Interação entre polimorfismos do gene VDR e padrões de atividade física na determinação da DMO de mulheres brasileiras no período pós-menopausa

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Educação Física da Universidade Católica de Brasília como requisito para obtenção do grau de Mestre em Educação Física. Área de concentração: Atividade física e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira
Co-orientadores: Prof. Dr. Ricardo Jacó Oliveira e
Prof. Dr. Florêncio Figueiredo Neto

BRASÍLIA-DF
2006

DEDICATÓRIA

À minha família,

Por sempre ter me ajudado e acreditado em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Rinaldo Wellerson Pereira, pela paciência e pelas orientações em um campo até então desconhecido.

Ao professor Ricardo Jacó de Oliveira, pela oportunidade de ingressar no Mestrado e por me dar condições de desenvolver este projeto. Agradeço a boa-vontade, o apoio valioso no direcionamento do projeto, o estímulo à produção científica e a disponibilidade constante em ajudar.

Ao professor Florêncio Figueiredo Neto pela compreensão durante todo o processo.

Ao amigo Ricardo Moreno, companheiro na nova empreitada e sem o qual seria impossível o sucesso do projeto. Espero que todas as dificuldades e adversidades que enfrentou tenham sido vitoriosamente superadas e o final deste processo o torne uma pessoa ainda mais forte.

Aos meus pais Paulo e Ilma que sempre deram bons exemplos e, principalmente, muito amor. Vocês foram essenciais, ao fornecerem o ambiente adequado para meu desenvolvimento intelectual e humano. Por mais que eu agradeça a cada realização, ou ainda a cada dia, tenho certeza que nunca será o suficiente.

À minha irmã, Cristiane, que teve, tem e continuará tendo grande participação qualitativa e quantitativa na minha vida.

À minha esposa, Elke, pela compreensão e companheirismo durante as fases difíceis pelas quais passei e pela alegria nos bons momentos.

Ao professor Martim Bottaro, que auxiliou de forma indireta na realização desta pesquisa, especialmente devido ao incentivo à formação e ao refinamento de uma mentalidade científica.

Aos colegas do laboratório de Ciência Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, pela receptividade, ajuda e companheirismo.

Aos colegas, professores e alunos, do Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Educação Física da Universidade Católica de Brasília, pelo companheirismo ao longo de todo o processo.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	01
1.1. Objetivos.....	04
1.1.1. Objetivo geral.....	04
1.1.2. Objetivos específicos.....	04
2. Revisão de literatura.....	06
2.1. Envelhecimento e DMO.....	06
2.2. Estrutura e metabolismo ósseo.....	08
2.3. Genética e densidade mineral óssea.....	11
2.4. Receptor de vitamina D.....	13
2.4.1. Polimorfismos na região 3'(BsmI, ApaI e TaqI).....	15
2.4.2. Polimorfismos no local de iniciação da transcrição (FokI).....	19
2.4.3. Polimorfismo no local do fator de transcrição Cdx-2.....	24
2.4.4. Interação entre polimorfismo no gene VDR e atividade física.....	25
3. Material e métodos.....	29
3.1. Tipo de estudo.....	29
3.2. Amostra.....	29

3.3. Padrões de atividade física.....	30
3.4. Densidade mineral óssea.....	30
3.5. Estudo dos polimorfismos no gene VDR.....	31
3.5.1. Extração de DNA	32
3.5.2. Quantificação de DNA	33
3.5.3. Polimorfismos estudados no gene VDR.....	33
3.5.4. Amplificação do DNA – Polimerase Chain Reaction (PCR).....	34
3.5.5. Genotipagem	36
3.6. Cuidados Éticos.....	38
3.7. Tratamento estatístico	38
4. Resultados	40
4.1. Caracterização da amostra	40
4.2. Extração e quantificação das amostras de DNA	42
4.3. Amplificação pela PCR.....	43
4.4. Genotipagem por minisequenciamento.....	44
4.5. Associação entre genótipos VDR, DMO e nível de atividade física	45
4.5.1. <i>ApaI</i>	45
4.5.2. <i>TaqI</i>	46
4.5.3. <i>BsmI</i>	47
4.5.4. <i>Cdx-2</i>	48
4.5.5. <i>FokI</i>	49
5. Discussão.....	51

6. Conclusão	60
7. Referências bibliográficas	61
Anexo A – Questionário padrão.....	77
Anexo B – IPAQ – Versão curta.....	78
Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	80
Anexo D – Aprovação do Comitê de Ética.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Características da amostra.....	40
Tabela 02 - Características de tabagismo, obesidade, reposição hormonal, cor da pele auto-relatada, presença de doenças crônicas e nível de atividade física da amostra.....	41
Tabela 03 - Características da amostra de acordo com o genótipo <i>ApaI</i> e o nível de atividade física	46
Tabela 04 - Características da amostra de acordo com o genótipo <i>TaqI</i> e o nível de atividade física	47
Tabela 05 - Características da amostra de acordo com o genótipo <i>BsmI</i> e o nível de atividade física	48
Tabela 06 - Características da amostra de acordo com o genótipo <i>Cdx-2</i> e o nível de atividade física	49
Tabela 07 - Características da amostra de acordo com o genótipo <i>FokI</i> e o nível de atividade física	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01. Representação esquemática da estrutura de Exons e Introns do gene VDR e o posicionamento dos polimorfismos estudados na presente investigação..... 15
- Figura 02. Representação esquemática dos passos seguidos desde a amplificação pela PCR até a realização e análise da eletroforese..... 38
- Figura 03. Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Os quatro primeiros poços na parte superior e inferior do gel representam os padrões de concentração de DNA, respectivamente, com 20, 100, 200 e 400 ng/ul. Os demais poços são amostras de DNA genômico extraído de amostras de sangue 43
- Figura 04. Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela PCR com iniciadores para ApaI e TaqI em 4a; BsmI em 4b; Cdx-2 em 4c; e FokI em 4dExemplo de fotografia do gel de agarose realizado para quantificação do DNA de alto peso molecular extraído das amostras sangüíneas..... 44
- Figura 05. Eletroferograma de produtos de minisequenciamento para os locos Cdx2, TaqI, ApaI, BsmI e FokI. Neste eletroferograma todos os locos são heterozigotos. 45

RESUMO

Introdução: A genética é considerada o principal determinante da densidade mineral óssea (DMO). Recentemente, ganhou força a hipótese de que exista um gene principal que seria determinante para os fenótipos ósseos. Nesse sentido, o receptor de vitamina D (VDR) tem sido um dos genes mais estudados. Além de interferir diretamente a DMO, há evidências que os polimorfismos no gene VDR possam influenciar na resposta à atividade física. Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência conjunta dos polimorfismos no gene VDR e dos padrões de atividade física na DMO do colo do fêmur, triângulo de Ward e coluna lombar em mulheres brasileiras no período pós-menopausa. **Métodos:** Cento e noventa e duas mulheres participaram do experimento, a média de idade das participantes foi de $67,84 \pm 5,23$ anos, com $64,58 \pm 11,71$ kg de massa corporal e $151,99 \pm 6,34$ cm de estatura. Os polimorfismos avaliados foram: *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, *FokI* e *Cdx-2*. A genotipagem de SNPs foi realizada utilizando o sistema *SnaPSHOT Multiplex System*[®]. O padrão habitual de atividade física foi avaliado por meio do IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) e a amostra foi classificada como ativa (AT) ou insuficiente ativa (IA). A interação entre atividade física e os polimorfismos na determinação da DMO foi avaliada por meio de ANCOVA fatorial. As variáveis usadas como covariantes foram detectadas por meio de uma regressão linear múltipla *stepwise* para cada variável dependente. Caso fossem encontradas diferenças significativas na ANCOVA, foram realizadas comparações múltiplas com ajuste do intervalo de confiança pelo método de Bonferroni. Foi adotado $p < 0,05$ como nível de significância. **Resultados:** A análise separada dos polimorfismos não mostrou diferenças entre nenhum dos genótipos com relação à DMO nos sítios estudados. A ANCOVA fatorial não revelou interação entre padrão de atividade física e polimorfismos *ApaI*, *BsmI* e *TaqI*. No entanto, foram encontradas interações significativas entre atividade física e os polimorfismos *FokI* e *Cdx-2* para DMO no colo do fêmur e triângulo de Ward, com favorecimento para portadores do genótipo *ff* e *Cdx-G/G*.

ABSTRACT

Introduction: Genetic factors are considered to be the major determinants of bone mineral density (BMD). Recently, the hypothesis that a major gene determines most of the bone phenotypes variations is being widely accepted. In this regard, the vitamin D receptor (VDR) gene has been one of the most studied genes. Besides determining directly the BMD, there are evidences that the VDR gene may influence the bone responses to physical activity. Therefore, the purpose of the present study was to analyze the interactions between VDR polymorphisms and physical activity in the determination of BMD at the femoral neck, Ward's triangle and lumbar spine in Brazilian postmenopausal women. **Methods:** One hundred ninety two women participated in the experiment, with a mean age of 67.84 ± 5.23 years, body weight of 64.58 ± 11.71 kg and height of 151.99 ± 6.34 cm. The polymorphisms studied were: *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, *FokI* e *Cdx-2*. The single nucleotide polymorphisms (SNP) genotyping were conducted with the *SnaPSHOT Multiplex System*[®]. By using the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), subjects were classified as actives (AT) or insufficiently actives (IA). The interaction between physical activity level and VDR genotypes was assessed with a factorial ANCOVA for each site. The factors to be used as covariates were detected with stepwise multivariate regressions analyses. If significant differences were found in ANCOVA, multiple comparisons with confidence interval adjustment by the Bonferroni procedure were used. The significance was established as $p < 0.05$. **Results:** The analysis of different polymorphisms did not show differences in BMD at any site for any genotype. Factorial ANCOVA did not show interactions between PAL and *ApaI*, *BsmI* or *TaqI* polymorphisms at any site. However, significant interactions were found for physical activity level and both *Cdx-2* and *FokI* polymorphisms at the femoral neck and Ward's triangle, with more favorable responses to the ff and *Cdx-G/G* genotypes.

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço da idade há um crescente desequilíbrio entre os processos de absorção e formação óssea, resultando na progressiva diminuição da densidade mineral óssea (LIVSHITS *et al.*, 1998, 1999; MANOLAGAS, 2000), o que torna os ossos mais frágeis e aumenta o risco de incidência de fraturas (MATSUDO & MATSUDO, 1991; CUMMINGS, 1995; NIH, 2000). Estas fraturas acabam por causar grande sofrimento aos indivíduos idosos, além de significativo impacto social e econômico (KANIS & CLOSKEY, 1996; NIH, 2000; JOHNELL & KANIS, 2004).

As fraturas de quadril, por exemplo, estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade em idosos (KANIS & CLOSKEY, 1996; JOHNELL & KANIS, 2004). Estimativas revelam que 33% das mulheres e 17% dos homens que viverem até os 90 anos de idade sofrerão fraturas de quadril, desses, 12 a 20% falecerão durante o ano subsequente devido a complicações da lesão e, entre os sobreviventes, metade necessitará de auxílio para realização das atividades diárias (MATSUDO & MATSUDO, 1991; USDHHS, 1996; NIEMAN, 1999). Projeções em nível mundial revelam que o número de pessoas com fraturas de quadril está aumentando rapidamente e poderá exceder seis milhões anuais em 2050, segundo Melton (1993). Estimativas posteriores de Johnell & Kanis (2004), revelaram que, em 2050, a incidência de fraturas poderá exceder 21 milhões por ano.

No Brasil, a situação também é preocupante, o país tem uma população superior a 170 milhões de habitantes, sendo que cerca de 20% possuem mais de 55 anos de idade. Em relação às fraturas, Lacerda (2001) descreve que ocorrem cerca de 600.000 por ano em mulheres com idade superior a 50 anos. Nesse sentido, o Ministério da Saúde demonstrou, em 1998, gastos

operacionais superiores a 27 milhões de reais relacionados às internações decorrentes de fraturas do fêmur em pacientes com mais de 60 anos (MARQUES NETO, 2001).

A avaliação da DMO tem sido freqüentemente usada em idosos devido a sua estreita relação com a ocorrência de fraturas (MARSHALL *et al.*, 1996; DE LAET *et al.*, 1997; CHANDLER *et al.*, 2000), tanto que já se reconhece a baixa massa óssea como causadora da maioria das fraturas em idosos (SEELEY *et al.*, 1991). Segundo Marshall *et al.* (1996) a habilidade de prever fraturas por meio da DMO é similar, ou superior, à habilidade de prever infartos a partir da pressão sangüínea e melhor que a previsão de doenças cardiovasculares a partir dos níveis de colesterol. Estima-se que a queda de cada ponto de desvio-padrão (DP) na DMO corresponda a um aumento de 1,5 a 3 vezes no risco de fraturas (CUMMINGS *et al.*, 1993; MARSHALL *et al.*, 1996, DE LAET *et al.*, 1997). A queda de um DP na DMO da coluna, por exemplo, leva a uma possibilidade 2,3 vezes maior de fraturas neste local e a queda de um DP no quadril, leva a um aumento de 2,6 vezes (MARSHALL *et al.*, 1996).

Portanto, o entendimento e controle das mudanças ocorridas na DMO ao longo da vida são extremamente importantes para a saúde do idoso. Dentre os fatores que interferem na DMO estão o pico de massa óssea alcançada e a perda ocorrida ao longo do tempo, sendo ambos influenciados pela interação entre fatores genéticos e ambientais.

Atualmente, a genética tem sido considerada a principal determinante das variações nos fenótipos ósseos, com alguns autores estimando que a contribuição genética seja responsável por até 85% da variabilidade da DMO da coluna lombar e do quadril (DEQUECKER *et al.*, 1987; SLEMENDA *et al.*, 1991; SOWERS *et al.*, 1992; GUEGUEN *et al.*, 1995; LIVSHITS *et al.*, 1998; VAN DEN OORD *et al.*, 2004). Com base nesses dados, diversos estudos têm sido desenvolvidos para analisar os aspetos genéticos relacionados às variações na DMO.

Apesar de haver um grande número de genes atuando no controle dos fenótipos ósseos (LIU *et al.*, 2003), estudos recentes reforçaram a hipótese da existência de um gene principal (LIVSHITS *et al.*, 1996a, 1996b, 1999; DENG *et al.*, 2002a). Nesse sentido, o receptor de vitamina D (VDR, do inglês *vitamin D receptor*) é um dos genes mais conhecidos e estudados (RALSTON, 2002, LIU *et al.*, 2003). Estudos realizados com gêmeos revelaram que grande parte da similaridade da DMO pode ser explicada pela concordância do gene VDR (SPECTOR *et al.*, 1995; MORRISON *et al.*, 1992) e, desde o estudo inicial de Morrison *et al.* (1994), relacionando diretamente determinadas variações polimórficas no gene VDR com fenótipos ósseos, grande atenção foi dada à relação entre os diferentes alelos e a DMO. No entanto, a relação entre variações no gene VDR e a DMO ainda precisa ser esclarecida de forma mais consistente, tendo em vista os resultados controversos obtidos na literatura.

Apesar da inegável relevância da genética, há outros fatores interagindo na determinação dos fenótipos ósseos. Com relação aos fatores ambientais, a atividade física tem um importante papel, como mostram estudos nos quais se verificou que os estilos de vida mais ativos e a realização de exercícios estão associados com maiores valores de DMO (KRALL & DAWSON-HUGHES, 1994; KELLEY, 1998; COUPLAND *et al.*, 1999; ANDREOLI *et al.*, 2001; VUILLEMIN *et al.*, 2001; PUNTILA *et al.*, 2001) e menores índices de fraturas (CUMMINGS, 1995; FESKANICH *et al.*, 2002). No entanto, os resultados com os programas de atividade física ainda são controversos (BLOCK, 1997), o que, segundo autores, pode ser explicado, além das variações metodológicas, pela interação entre genes e fatores ambientais (LIU *et al.*, 2003). Portanto, o próprio resultado obtido por um programa de atividade física pode ser influenciado pelas características genéticas. Esta hipótese é corroborada por achados recentes que têm levado a uma crescente conscientização de que as respostas à atividade física sejam mediadas por

variações genéticas individuais (BRAY, 2000; RANKINEN *et al.*, 2001; RANKINEN *et al.*, 2002; PERUSSE *et al.*, 2003; WOLFARTH *et al.*, 2005).

A descoberta de populações com maior risco de desenvolver baixa DMO pode tornar mais eficiente uma abordagem preventiva, além disso, é importante entender como os possíveis genótipos interagem com estímulos ambientais, para designar a intervenção mais adequada para cada caso. É reconhecido que a perda de massa óssea associada ao envelhecimento sofre influência genética, entretanto, a determinação de genes específicos associados a esse processo ainda não é precisa. A identificação de genes associados à perda de massa óssea possibilitaria identificar os indivíduos propensos a desenvolver esses quadros e, sendo assim, o conhecimento científico buscado nesse estudo permitirá aliviar o sofrimento e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com idade avançada, por possibilitar o direcionamento de práticas preventivas precocemente, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de fraturas, as quais estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade na população idosa, e repercutem num aumento do custo assistencial em saúde.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Verificar a influência conjunta dos polimorfismos no gene VDR e dos padrões de atividade física na DMO em mulheres brasileiras no período pós-menopausa.

1.1.2. Objetivos específicos

- Genotipar os polimorfismos *FokI*, *CDx-2*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* na amostra estudada
- Avaliar associação dos polimorfismos individualmente com a DMO.

- Avaliar a interação entre exercício e polimorfismos do gene VDR na determinação da DMO.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Envelhecimento e DMO

Avanços terapêuticos e preventivos vêm aumentando gradativamente a expectativa de vida dos seres humanos (RAMOS, 1993). De acordo com o Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia, a expectativa de vida atual corresponde algo próximo de 66 anos, ou seja, 20 anos maior que a média de cinco décadas atrás (NÓBREGA *et al.*, 1999). Esta maior longevidade aliada à redução nas taxas de natalidade, leva a um envelhecimento gradual da população. Atualmente estima-se que cerca de 10 por cento da população mundial possua mais de sessenta anos, e estas proporções tendem a aumentar, como mostram projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), segundo as quais o número de idosos terá aumentado 15 vezes entre 1950 e 2025, enquanto a população total aumentará apenas cinco vezes.

No Brasil o fenômeno ocorre no mesmo sentido, com queda progressiva no percentual de pessoas com menos de 24 anos, segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio (2002). Dados do IBGE revelam que esta progressão levará o País a ter a sexta maior população de idosos do Mundo em 2030.

O envelhecimento traz alterações fisiológicas que levam a uma progressiva degeneração de diversos órgãos, dentre eles o esqueleto. Com o avanço da idade há um crescente desequilíbrio entre os processos de absorção e formação óssea, resultando em diminuição da DMO (LIVSHITS *et al.*, 1998, 1999; MANOLAGAS, 2000) e conseqüente fragilidade dos ossos, com aumento do risco de incidência de fraturas (MATSUDO & MATSUDO, 1991; CUMMINGS, 1995; NIH, 2000). Concomitantemente à idade avançada, alterações negativas no estado nutricional, sistema endócrino e padrões de atividades físicas levam ao desequilíbrio no processo de remodelação

óssea, ocorrendo perdas superiores à capacidade de regeneração (NIH, 2000). Outras condições que favorecem as doenças ósseas são: excesso de glucorticóides, hiperparatireoidismo, alcoolismo, imobilização prolongada, hipercalcúria e tabagismo (CUMMINGS *et al.* 1995).

As alterações no metabolismo ósseo expõem os idosos a um risco aumentado de fraturas, as quais causam grande sofrimento aos indivíduos e tem largo impacto econômico e social. As fraturas de quadril, por exemplo, configuram-se como uma das principais causas de mortalidade e perda de funcionalidade em idosos (KANIS & CLOSKEY, 1996; JOHNELL & KANIS, 2004). Estimativas revelam que 33% das mulheres e 17% dos homens que atingirem 90 anos de idade sofrerão fraturas de quadril, desses, 12 a 20% falecerão durante o ano subsequente devido a complicações da lesão e, entre os sobreviventes, metade necessitará de auxílio para realização das atividades diárias (MATSUDO & MATSUDO, 1991; USDHHS, 1996; NIEMAN, 1999). O número de pessoas com fraturas de quadril está aumentando rapidamente e pode exceder seis milhões por ano por volta de 2050 (MELTON, 1993). Estimativas realizadas por Johnell & Kanis (2004), revelaram que em 2050 a incidência de fraturas poderá exceder 21 milhões por ano.

Em relação ao Brasil, Lacerda (2001) descreve que anualmente ocorrem cerca de 600.000 fraturas em mulheres com idade superior a 50 anos. Nesse sentido, o Ministério da Saúde (1998) demonstrou gastos operacionais superiores a 27 milhões de reais relacionados às internações decorrentes de fraturas do fêmur em pacientes com mais de 60 anos (MARQUES NETO, 2001).

A ocorrência de fraturas tem estreita relação com queda na densidade mineral óssea (MARSHALL *et al.*, 1996; DE LAET *et al.*, 1997; CHANDLER *et al.*, 2000), sendo reconhecido que a maioria das fraturas nos idosos é decorrente da baixa massa óssea (SEELEY *et al.*, 1991). Nesse sentido, Marshall *et al.* (1996) sugerem que a habilidade de prever fraturas através da DMO é similar, ou melhor, que a habilidade de prever infartos a partir da pressão sanguínea e melhor que a previsão de doenças cardiovasculares a partir dos níveis de colesterol, sendo

estimado que a queda de cada ponto de desvio-padrão na DMO corresponda a um aumento de 1,5 a três vezes no risco de fraturas (CUMMING *et al.*, 1993; MARSHALL *et al.*, 1996, DE LAET *et al.*, 1997).

2.2. Estrutura e metabolismo ósseo

O corpo humano possui mais de 200 ossos, que oferecem suporte estrutural para os músculos, proteção aos órgãos vitais e armazenagem de cálcio. Os ossos são compostos por uma fase orgânica e uma fase inorgânica. A fase inorgânica, ou mineral, corresponde a 70% do peso ósseo, sendo composta primordialmente de cristais de hidroxapatita. Já a matriz orgânica é formada principalmente por fibras de colágeno tipo I, proteínas não-colágenas e substância fundamental (SZEJNFELD, 2000). Cada fibra de colágeno é composta por segmentos periódicos e repetidos, com os cristais de hidroxapatita posicionados junto a cada segmento da fibra, o que dá força à estrutura óssea, prevenindo-a de ceifar-se. Os filamentos de colágeno sobrepõem-se uns aos outros, causando também a sobreposição dos cristais de hidroxapatita. A matriz orgânica protege o osso de quebrar-se diante das tensões, já os sais ósseos impedem que o osso se fragmente (seja esmagado) por pressões externas (GUYTON & HALL, 2000).

Existem dois tipos de ossos no nosso corpo: cortical e trabecular. Ossos corticais, ou compactos, são as porções densas e correspondem à cerca de 80% da massa esquelética, envolvendo os ossos trabeculares ou esponjosos que ficam em contato direto com a medula óssea. A composição e a proporção destes dois tipos de ossos variam consideravelmente, os ossos das extremidades, por exemplo, têm mais tecido cortical, já as vértebras possuem maior massa trabecular. Diferentes patologias levam a padrões de perda óssea diferenciados, no hiperparatiróidismo, por exemplo, há maior perda de osso cortical (KHAN & BILEZIKIAN,

2000), enquanto que no hipoestrogenismo, há maior perda de osso trabecular (SZEJNFELD, 2000).

Depois da fase de crescimento ocorre a modelagem óssea, processo no qual o esqueleto é moldado em sua forma e tamanho. Após este período, tem lugar a contínua regeneração da estrutura óssea por meio da substituição de tecido antigo por novo, em um processo denominado remodelagem, que pode levar à completa substituição do esqueleto em 10 anos (MANOLAGAS, 2000). Em adultos, o processo de remodelagem normal não causa alterações significativas na DMO, pois a formação de tecido é igual à reabsorção. Porém, diante de condições patológicas, como ocorre com o avanço da idade, este equilíbrio é rompido e há mais remoção que deposição, com conseqüente perda de massa óssea.

Vê-se então, que o esqueleto é um órgão altamente dinâmico, no qual atuam células especializadas destacando-se os osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células de superfície.

Os osteoclastos são grandes células multinucleadas e fagocitóticas, originadas de células hematopoiéticas, provenientes da linhagem de monócitos/macrófagos. Quando em atividade, sua membrana é diferenciada de modo a formar as chamadas bordas de escova, local pelo qual a célula se prende à superfície óssea para iniciar o processo de absorção. Estas células possuem um grande número de ribossomos livres, complexos de Golgi, mitocôndrias e lisossomos (MANOLAGAS, 2000; SZEJNFELD, 2000), com os dois últimos tendo papel de destaque no processo de reabsorção óssea por fornecer metabólitos e enzimas essenciais à digestão das matrizes mineralizadas.

Quando em atividade, os osteoclastos se unem à superfície óssea pela sua borda de escova. Após esta adesão o compartimento extracelular é acidificado por meio da secreção de prótons pela anidrase carbônica e liberação de ATP e CO₂ pelas mitocôndrias. O pH ácido dissolve os cristais minerais, tornando possível que enzimas específicas, liberadas pelos

lisossomos, degradem a matriz óssea. Os subprodutos da reação, como cálcio e fósforo, são transportados para dentro dos osteoclastos.

Os osteoblastos são células mononucleadas originadas das células mesenquimais – de onde também se originam os adipócitos e condrócitos – presentes no perióstio e no endóstio. Uma característica marcante destas células é a proeminência do retículo endoplasmático rugoso e do aparelho de Golgi, que evidencia sua alta capacidade de síntese protéica e intensa atividade secretora (COMPSTON, 2001). A principal função dos osteoblastos é a formação óssea, iniciada com a secreção das proteínas constituintes da matriz óssea e sua posterior mineralização, pela deposição da hidroxapatita (MANOLAGAS, 2000).

Osteoblastos maduros podem se incorporar à matriz óssea, dando origem aos osteócitos. Os osteócitos detectam estímulos mecânicos e as necessidades de aumento ou diminuição da massa óssea frente às respostas externas (OWAN *et al.*, 1997) por meio de extensões da sua membrana plasmática, formando uma rede de comunicação entre si e com outras células, como as células formadoras de osteoblastos, os osteoblastos e células de superfície.

Ao final do período produtivo, os osteoblastos tornam-se achatados, formando as células de superfície, que ocupam a maior parte dos ossos. Estas células secretam a enzima colagenase, responsável pela remoção da matriz não mineralizada da superfície óssea, o que permite aos osteoclastos prenderem-se a essa região e iniciarem o processo de reabsorção (MANOLAGAS, 2000; SZEJNFELD, 2000).

Apesar de possuírem funções antagônicas, os osteoclastos e os osteoblastos atuam em conjunto durante a remodelação óssea. No esqueleto adulto saudável, ambos se encontram em uma estrutura chamada Unidade Multicelular Básica (UMB), que possui osteoclastos presentes na parte frontal e osteoblastos na parte posterior. Em uma UMB ativa, os osteoclastos se aderem ao osso e o reabsorvem por acidificação ou digestão proteolítica, com o avanço da UMB os

osteoclastos são removidos do local de reabsorção e os osteoblastos iniciam o processo de formação óssea (MANOLAGAS, 2000).

A vida média da UMB varia entre seis e nove meses, porém as células que a compõem duram consideravelmente menos – os osteoclastos duas semanas e os osteoblastos três meses (MANOLAGAS, 2000). Esta diferença entre o período de existência das células, entre si e entre a própria UMB, exige o fornecimento contínuo de osteoblastos e osteoclastos, o que será determinante na homeostase óssea. O recrutamento poderá ser de duas formas: serial e paralelo. No modelo paralelo, a diferenciação e proliferação de osteoblastos e osteoclastos ocorrem simultaneamente em resposta a quaisquer sinais que solicitem a geração de UMB. No modelo serial, tanto a lesão tecidual quanto a tensão mecânica estimulam a diferenciação e proliferação preferencial dos osteoblastos para o local afetado.

Na senescência há menor deposição de ossos nos ciclos de remodelação, levando a menor espessura das paredes ósseas, especialmente nos ossos trabeculares (PARFITT *et al.*, 1997; MANOLAGAS *et al.*, 2000). Apesar de algumas alterações ocorridas com o avanço da idade serem confundidas com deficiências hormonais, a menor taxa de nascimento de células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), assim como o menor tempo de vida dos osteócitos são característicos da idade avançada (JILKA *et al.*, 1996; D'IPPOLITO *et al.*, 1999, MANOLAGAS, 2000).

2.3. Genética e densidade mineral óssea

Os fatores genéticos são considerados os principais determinantes dos fenótipos ósseos (DEQUECKER *et al.*, 1987; POCOCK *et al.* 1987; SLEMENDA *et al.*, 1991; SOWERS *et al.*, 1992; KRALL & DAWSON-HUGHES, 1993; GUEGUEN *et al.*, 1995; FLICKER *et al.*, 1995; ARDEN & SPECTOR, 1997; LIVSHITS *et al.*, 1998, 2004; DENG *et al.*, 1999, 2000, 2002;

NGUYEN *et al.*, 2003; VAN DEN OORD *et al.*, 2004), podendo determinar até 92% da variação da DMO na coluna, 85% no quadril (POCOCK *et al.*, 1987) e cerca de 60% no antebraço (LIVSHIST *et al.*, 1996; 1999). Segundo Livshits *et al.* (1998, 1999) cerca de 60% da variação total na massa óssea é explicada por fatores genéticos, Nguyen *et al.* (2003) estimam que esta proporção varie entre 31 e 72%.

Estudos em gêmeos trazem a oportunidade de investigar a influência de fatores genéticos e ambientais na determinação de fenótipos específicos. Por meio da comparação entre gêmeos uni vitelinos e bi vitelinos pode-se inferir a influência dos genes nas características estudadas. Nesse sentido, Smith *et al.* (1973) verificaram que a hereditariedade é responsável por cerca de 40% da variação na massa óssea do rádio. Estudos posteriores conduzidos por Pocock *et al.* (1987) confirmaram este resultado e mostraram que fatores genéticos podem determinar cerca de 92% da variação de DMO lombar, 73% no colo de fêmur, 85% no triângulo de Ward e 57% no trocânter. Estes resultados foram confirmados em amostras compostas somente por gêmeas no período pós-menopausa em estudos posteriores. No entanto, os valores foram mais reduzidos, variando de 6,8% na coluna lombar a 18,6% no colo do fêmur (FLICKER *et al.*, 1995; ARDEN *et al.*, 1996).

A comparação entre pais e filhos mostra os mesmos resultados, porém com números menos expressivos (KRALL & DAWSON-HUGHES, 1993; GUEGUEN *et al.*, 1995; NGUYEN *et al.*, 2003). Os estudos de Seeman *et al.* (1994) e Evans *et al.* (1988) revelam que filhas de osteoporóticas têm menor DMO que pessoas da mesma idade, mostrando, em muitos casos, DMO lombar abaixo do limiar sugerido para ocorrência de fraturas. Esta forte característica hereditária da DMO pode ser um dos fatores que levam mulheres cujas mães tenham sofrido fraturas de quadril antes dos 80 anos a tornarem-se duas vezes mais propensas a sofrer as mesmas fraturas (CUMMINGS *et al.*, 1995).

Estudos de mapeamento por ligação genética levaram a identificação de locos relacionados a fenótipos ósseos (KOLLER *et al.*, 2000; DENG *et al.*, 2002b), sem, no entanto, mostrar uma definição precisa dos locais responsáveis pelo controle da massa óssea (LIVSHITS *et al.*, 2004). Apesar de haver um grande número de genes atuando no controle da massa óssea, estudos recentes reforçaram a hipótese da existência de um gene principal, responsável por 16% a 65% das variações na DMO (LIVSHITS *et al.*, 1996a, 1996b, 1999, 2002, 2004; CARDON *et al.*, 2000; DENG *et al.*, 2002a; NGUYEN *et al.*, 2003).

Atualmente, grande parte das pesquisas tem sido direcionada à busca de genes específicos que possam ter relação direta com os fenótipos estudados. Para que seus resultados sejam mais precisos, tais buscas são baseadas nos efeitos biológicos dos genes. Nesse sentido, o gene VDR surge como um candidato promissor, tornando-se um dos genes mais conhecidos e estudados em sua relação com os fenótipos ósseos (RALSTON, 2002, LIU *et al.*, 2003).

Estudos feitos com gêmeos uni vitelinos e bi vitelinos revelam que grande parte da similaridade da DMO pode ser explicada pela concordância do gene VDR (MORRISON *et al.*, 1992, 1994; SPECTOR *et al.*, 1995). Portanto, desde o estudo inicial de Morrison *et al.* (1994), o qual relacionou diretamente variações polimórficas no gene VDR com fenótipos ósseos, grande atenção foi dada à relação entre os diferentes alelos e a DMO.

2.4. Receptor de vitamina D

O receptor de vitamina D é uma proteína pertencente à superfamília de fatores reguladores transcricionais de ação trans, composta pelos receptores de esteróides e de hormônio da tireóide (BAKER *et al.*, 1988; HANNAH & NORMAN., 1994).

Para exercer seus efeitos, a vitamina D é convertida em sua forma ativa, a 1,25 dihidroxivitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] ou calcitriol. A ação do calcitriol, por sua vez, se dá por

meio de um receptor nuclear específico, o VDR (HAUSSLER *et al.*, 1998; ERBEN, 2001), o qual regula a transcrição gênica pela ligação aos elementos responsivos de vitamina D na região promotora dos genes alvos (HANNAH & NORMAN., 1994; HAUSSLER *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 1998; OZISIK *et al.*, 2001; ERBEN, 2001). Dentre os fatores controlados pelo VDR estão os genes do hormônio da paratireóide (DEMAY *et al.*, 1992) e IL-6 (ALROY *et al.*, 1995), que são controlados negativamente, e a osteocalcina (DEMAY *et al.*, 1990) e as proteínas ligantes de cálcio no intestino e rins (OZISIK *et al.*, 2001; VAN CROMPHAUT *et al.*, 2001) que sofrem controle positivo.

O VDR é expresso em um grande número de tecidos, mas as maiores concentrações estão no intestino, onde a vitamina D exerce sua principal função: aumentar a absorção de cálcio e fósforo (HAUSSLER *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 1998; ERBEN, 2001). Apesar de osteoblastos (NARBAITZ *et al.*, 1983) e células precursoras de osteoclastos (ROODMAN, 1996) também expressarem VDR, a atuação direta da vitamina D no metabolismo ósseo ainda não pôde ser confirmada. Sabe-se, por exemplo, que ação da vitamina D é relacionada à produção de osteocalcina, colágeno tipo I e fosfatase alcalina pelos osteoblastos (REICHEL *et al.*, 1989; HANNAH & NORMAN., 1994). No entanto, ratos sem VDR apresentam mineralização normal dos ossos quando lhes são administradas quantidades adequadas de cálcio e fósforo (WEINSTEIN *et al.*, 1984; LI *et al.*, 1998), o que traz a sugestão de que os efeitos da vitamina D nos ossos sejam indiretos, mediados pelo controle da absorção de cálcio (ERBEN, 2001).

O gene para o receptor de vitamina D humano está localizado no cromossomo 12 (GOMEZ ALONSO *et al.*, 1998) e teve sua clonagem completa publicada em 1988, por Baker *et al.* Alguns polimorfismos conhecidos no gene VDR estão esquematizados na figura 1.

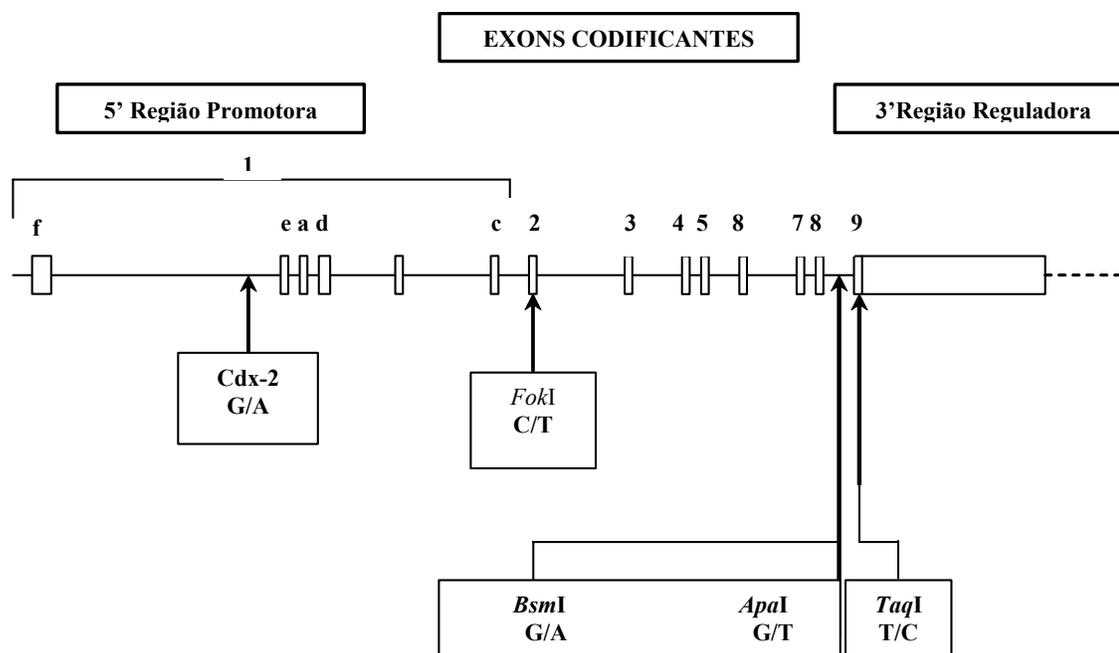


Figura 01. Representação esquemática da estrutura de Exons e Introns do gene VDR e o posicionamento dos polimorfismos estudados na presente investigação.

2.4.1. Polimorfismos na região 3' (*BsmI*, *ApaI* e *TaqI*)

O gene VDR possui uma longa região 3' não traduzida, comum a todos os receptores esteróides, cuja significância ainda não é totalmente conhecida (BAKER *et al.*, 1988). A maioria dos polimorfismos estudados até o momento são mutações e/ou deleções ocorridas dentro de introns nesta região, como as detectadas pelas enzimas de restrição *BsmI* e *ApaI*. Apesar destas mudanças não alterarem a seqüência de aminoácidos resultante, supõe-se que elas possam estar em desequilíbrio de ligação com algum outro fator genético ou alterar a estabilidade do RNAm (MORRISON *et al.*, 1992, 1994; GOMEZ ALONSO *et al.*, 1998; TSURITANI *et al.*, 1998; RALSTOM, 2002; LIU *et al.*, 2003; VAN DEN OORD *et al.*, 2004), no entanto, esta última hipótese foi contestada pelos resultados obtidos no estudo de Durrin *et al.* (1999).

O polimorfismo mais investigado é aquele definido pela presença ou ausência de um sítio para a enzima de restrição *BsmI*, no intron 8 (MORRISON *et al.*, 1992, 1994; FERRARI *et al.*,

1999). Um outro polimorfismo presente neste intron é aquele em um sítio de restrição para a enzima *ApaI* (MORRISON *et al.*, 1992; AUDI *et al.*, 1999). Estes dois polimorfismos, *ApaI* e *BsmI*, estão em forte desequilíbrio de ligação, o genótipo *AA* está presente em mais de 80% de portadores do genótipo *BB* (MORRISON *et al.*, 1992, 1994).

Ao contrário dos polimorfismos acima, o *TaqI* está em uma região transcritora, caracterizada pela troca da Timina por Citosina no exon 9. No entanto, a troca de bases nitrogenadas não altera o aminoácido a ser sintetizado, pois tanto os códons ATT quanto ATC codificam para a Isoleucina (OZISIC *et al.*, 2001). Os polimorfismos *BsmI* e *TaqI* são estreitamente relacionados, os genótipos *BB*, *Bb* e *bb* são associados aos *tt*, *Tt* e *TT*, respectivamente (MORRISON *et al.*, 1994; TOKITA *et al.*, 1996; TSURITANI *et al.*, 1998; RUBIN *et al.*, 1999).

O primeiro estudo encontrado que relacionou as variações polimórficas no gene VDR com a DMO, foi publicado por Morrison *et al.* (1994). Este estudo apontou para uma associação entre o genótipo *BB* e baixa DMO em mulheres. Este trabalho estimou que portadoras do genótipo *BB* chegassem “ao limiar de fraturas” (DMO < 2 DP, em relação a mulheres jovens saudáveis) cerca de 10 anos antes que portadoras do genótipo *bb*. Em adição, os resultados mostraram que portadoras do genótipo *bb* possuíam maior DMO na coluna lombar e colo do fêmur, com a variação *Bb* mostrando valores intermediários. Surgiu, assim, a hipótese que os alelos *B*, *A* e *t* estariam relacionados à menor massa óssea.

Diversos estudos posteriores corroboraram estes resultados em mulheres no período pós-menopausa (HOWARD *et al.*, 1995; GEUSENS *et al.*, 1997; KIEL *et al.*, 1997; VANDEVYVER *et al.*, 1997; GENNARI *et al.*, 1998; GOMEZ ALONSO *et al.*, 1998), pré-menopausa (KIEL *et al.*, 1997; LARAZZETI CASTRO *et al.*, 1997) e jovens de ambos os sexos (FERRARI *et al.*, 1998; MCGUIGAN *et al.*, 2002), especialmente quando se avaliou a coluna lombar. Os

resultados no colo do fêmur mostraram a mesma tendência, no entanto, dificilmente atingiram significância estatística (DAWSON-HUGHES *et al.*, 1995; HOWARD *et al.*, 1995; GOMEZ ALONSO *et al.*, 1998).

Apesar de alguns resultados positivos, há uma série de estudos que não encontraram relação entre os genótipos caracterizados pela *ApaI*, *BsmI* e *TaqI* e a DMO, seja em mulheres no período pós-menopausa (LOONEY *et al.*, 1995; JORGENSEN *et al.*, 1996; GRAAFMANS *et al.*, 1997; ZMUDA *et al.*, 1997; TSURITANI *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2001; ZAJICKOVA *et al.*, 2002) ou pré-menopausa (WILLING *et al.*, 1998; QIN *et al.*, 2004). Outros estudos mostraram também uma relação inversa à proposta inicialmente (HOUSTON *et al.*, 1996; UITTERLINDEN *et al.*, 1996; RUBIN *et al.*, 1999; BLANCHET *et al.*, 2002; TOFTENG *et al.*, 2002), inclusive estudos conduzidos pelo mesmo grupo que realizou a pesquisa pioneira (BELL *et al.*, 2001).

A análise de prevalência dos polimorfismos do gene VDR em pessoas com baixa DMO trouxe resultados controversos, mostrando uma relação inversa à encontrada por Morrison *et al.* (1994). Looney *et al.* (1995) verificaram que, em mulheres caucasianas com DMO na coluna lombar extremamente baixa ($< 50 \text{ mg/cm}^3$), havia menor proporção do genótipo *BB* em relação ao grupo controle (pessoas saudáveis). Recentemente, Douroudís *et al.* (2003) reportaram dados similares, revelando que mulheres de origem helênica com osteoporose e osteopenia possuíam maior frequência dos genótipos *bb*, *aa* e *TT*, em comparação com mulheres de DMO normal.

Tendo em vista a controvérsia acerca das influências do polimorfismo VDR em mulheres adultas, passou-se a especular que as interações seriam melhores vistas na juventude, pois haveria menor quantidade de estímulos ambientais interferindo nos resultados. Tao *et al.* (1998) sugerem que o polimorfismo do VDR influencie no aumento de massa óssea ocorrido na fase de crescimento, assim, os efeitos dos diferentes alelos seriam melhores observados nos primeiros 20

anos de idade. A hipótese foi comprovada em seu estudo, no qual o genótipo *tt*, foi relacionado à menor DMO em meninas de sete anos. Sainz *et al.* (1997) estudaram a influência dos polimorfismos *BsmI*, *ApaI* e *TaqI* na DMO de crianças pré-púberes estadunidenses de origem mexicana e obtiveram resultados similares, ao verificar que os genótipos *aa* e *bb* estão relacionados à maior DMO na coluna lombar e colo do fêmur, a mesma tendência foi verificada para o genótipo *TT*, mas as diferenças não foram significativas.

No entanto, há estudos que não suportam esta hipótese. Gunnes *et al.* (1997) não encontraram relação entre os aumentos de DMO no antebraço e o genótipo de *VDR* de crianças e adolescentes e Ames *et al.* (1999) não verificaram relação entre o polimorfismo *BsmI* e a DMO em crianças. Kitagawa *et al.* (1998), por sua vez, encontraram relações inversas às esperadas ao verificar que o genótipo *Aa* estava relacionado à maior DMO no antebraço, em comparação com o genótipo *aa*, em jovens japonesas (média de idade de 18,4 anos). Diante da controvérsia em relação aos polimorfismos, alguns autores compararam a interação entre os diferentes alelos, partindo do pressuposto que a análise de haplótipos seria mais eficiente.

Por meio de análises com três enzimas restritivas, Gennari *et al.* (1998) verificaram que, em mulheres italianas no período pós-menopausa, a DMO lombar era maior no genótipo *aabbTT*, em comparação com *AABBtt* e *AaBbTt*, havendo uma tendência similar para o fêmur. Posteriormente, ao analisar os polimorfismos *TaqI* e *ApaI* em conjunto, Gennari *et al.* (1999) verificaram que a variação *aaTT* resultava em maior DMO lombar que a *AAtt*. No entanto, a controvérsia aparece em um estudo de Utterlinden *et al.*, (1995; 1996), no qual se verificou que o haplótipo *AbT* foi relacionado a uma menor DMO em idosos de ambos os sexos.

Portanto, além dos achados iniciais não serem comprovados de forma consistente, vê-se que há evidências contrárias à suposição de que os alelos *b*, *a* e *T*, sozinhos ou em conjunto, sejam associados à maior DMO, o que tem trazido sérios questionamentos à sua real importância.

2.4.2. Polimorfismos no local de iniciação da tradução (*FokI*)

Até o momento, há apenas um polimorfismo conhecido que altere significativamente a estrutura protéica do receptor de vitamina D. Este polimorfismo se localiza na região 5' e é comumente identificado pela enzima de restrição *FokI*.

O gene VDR possui dois potenciais códons de iniciação da tradução (ATG) no exon 2, o processo é iniciado habitualmente no primeiro códon (BAKER *et al.*, 1988). No entanto, uma mutação específica caracterizada pela substituição da timina por citosina no primeiro códon, faz com que a tradução inicie-se no ATG seguinte, o que causa a produção de uma proteína 3 aminoácidos mais curta. Deste modo, enquanto o produto predito da tradução do VDR é uma proteína de 427 aminoácidos (BAKER *et al.*, 1988), a proteína traduzida por um alelo *F* (com restrição para enzima *FokI*) apresenta apenas 424 aminoácidos.

Estudos *in vitro* demonstraram a existência de diferenças funcionais entre os polimorfismos, o alelo mais curto (*F*) apresenta uma ativação transcricional 1,7 vez maior (ARAI *et al.*, 1997) que o alelo *f*, mais longo. Diferenças funcionais também foram encontradas por Colin *et al.* (2000) e Jurutka *et al.* (200), no entanto, os resultados são controversos (GROSS *et al.*, 1996; WHITFIELD *et al.*, 2001).

Em um estudo realizado com 110 mulheres japonesas no período pré-menopausa (idade média de 32 anos), Arai *et al.* (1997) verificaram que a presença do primeiro local de tradução em homozigose (*ff*) relacionava-se a DMO lombar 10,7% menor, em comparação com a ausência do primeiro ATG (*FF*). Posteriormente, Choi *et al.* (2000) examinaram a relação entre o polimorfismo *FokI* e a DMO em 174 mulheres coreanas no período pós-menopausa (idade média de 55 anos) e obtiveram resultados similares, com as portadoras do genótipo *ff* mostrando DMO lombar 13,3% menor que portadoras do *FF*.

Estudos em outras populações mostram os mesmos padrões. Gross *et al.* (1996) verificaram que mulheres pós-menopausa de origem mexicano-estadunidense portadoras do genótipo *ff* possuíam DMO lombar 12,8% menor que portadoras do genótipo *FF* e 10,9% menor que o genótipo *Ff*. Neste estudo também foi verificado que portadoras do genótipo *ff* apresentavam maior perda óssea no colo do fêmur no período de 2 anos, a perda para este genótipo era de 4,73%, enquanto o genótipo *Ff* perdeu 0,54% e o *FF* apresentou ganhos de 0,5%.

Posteriormente, um estudo com 400 mulheres italianas (idade média de 58 anos) verificou que portadoras do genótipo *FF* possuíam DMO da coluna 6% maior em relação a portadoras do genótipo *ff*, aproximando-se da significância estatística ($p = 0,06$). Ao segregar os grupos pela quantidade de anos desde a menopausa, verificou-se uma correlação positiva no grupo com menos de 5 anos, e o genótipo *FF* apresentou valores de DMO lombar 9% maiores que o *ff* (GENNARI *et al.*, 1999). A segregação pela idade trouxe resultados similares, com o genótipo *ff* apresentando menor DMO nas mulheres com menos de 60 anos.

Tofteng *et al.* (2002) verificaram em mulheres caucasianas pós-menopausa com IMC abaixo de 25 kg/m^2 ($n = 282$), que os genótipos *FF* e *Ff* estavam associados com menor DMO no quadril e rádio. Os valores na coluna lombar mostraram a mesma tendência, sendo cerca de 5% maiores no genótipo *ff*, mas não atingiram significância estatística. A análise de mulheres obesas, no entanto, não mostrou resultados significativos em nenhuma medida.

Em uma pesquisa feita com 114 mulheres caucasianas no período pós-menopausa (idade média > 60 anos), Zajickova *et al.* (2002) verificaram que o genótipo *ff* apresentava valores de DMO no quadril 9,4% menores em comparação com o *Ff*. Houve uma tendência similar para a coluna lombar que, no entanto, não atingiu significância estatística.

Harris *et al.* (1997) realizaram um estudo envolvendo mulheres negras ($n = 82$) e caucasianas ($n = 72$) no período pré-menopausa e encontraram valores de DMO 7,4% e 2,9%

menores no colo do fêmur nos genótipos *ff*, em comparação com *FF* e *Ff*, respectivamente. Os valores da DMO na coluna lombar e corpo inteiro tiveram tendências similares, mas não atingiram significância. Ao analisar as mulheres caucasianas separadamente, os resultados foram mais expressivos, com os valores para o corpo inteiro 4,3% menores no genótipo *ff*, em comparação com o *FF*. No colo do fêmur, a DMO do grupo *ff* foi 12,1% e 4,1% menor, em relação às variações *FF* e *Ff*. A análise separada de negras não mostrou diferenças significativas, apesar de tendências similares. É interessante ressaltar que o grupo de mulheres negras tinha uma ingestão de cálcio significativamente menor que as mulheres caucasianas, o que pode ter influenciado nos resultados.

Estudos em crianças também trouxeram resultados similares. Ames *et al.* (1999) estudaram 72 crianças (idade entre 7,5 e 12 anos) com dietas ricas em cálcio (1200 mg/dia) das quais 38 eram caucasianas, 18 afro-americanas e 16 mexicano-estadunidenses. Os resultados mostram que, independente da etnia, os portadores do genótipo *FF* tinham DMO total 8,4% e 4,8% maiores que os *ff* e *Ff*, respectivamente. Os resultados revelaram também que o genótipo *FF* estava associado a uma absorção de cálcio 52,9 e 29,6% maior em relação aos genótipos *ff* e *Ff*, respectivamente. As análises feitas com *BsmI* não revelaram associação com nenhum parâmetro analisado.

Confirmando as correlações positivas, estudos transversais mostram que a prevalência do genótipo *FF* é menor e a do *ff* maior em mulheres com osteoporose e osteopenia. Gennari *et al.* (1999) verificaram que a prevalência do genótipo *ff* é duas vezes maior em mulheres com osteoporose, em relação a mulheres sem a patologia. Os autores encontraram também um aumento de duas a três vezes no risco de fraturas vertebrais em portadoras do alelo *f* em homozigose. Posteriormente, os resultados do estudo de Choi *et al.* (2000) revelaram que o

percentual de mulheres osteoporóticas com genótipo *ff* era cerca de três vezes maior do que em mulheres normais.

Existe também a hipótese de haver interação entre os polimorfismos na região 3' e 5'. Ao cruzar os genótipos *BsmI* e *ApaI* com o *FokI*, foram encontradas evidências sugestivas em duas ocasiões. Em 1998, Ferrari *et al.* (1998) verificaram em meninas pré-púberes com os genótipos *bb* ou *aa*, que a DMO lombar era maior com a presença concomitante do genótipo *FF* (*bbFF* ou *aaFF*), em relação à presença do *ff* (*bbff* ou *aaFF*). Posteriormente, Ferrari *et al.* (1999) verificaram que indivíduos com o alelo *f* apresentavam menor DMO (coluna lombar, colo do fêmur, trocânter e corpo inteiro) quando havia presença concomitante do genótipo *BB*, em relação aos outros genótipos *BsmI*.

O polimorfismo da região 5' também pode ajudar a explicar diferenças étnicas na DMO (HARRIS *et al.*, 1997; AMES *et al.*, 1999). Estudos feitos com caucasianos mostraram resultados similares na distribuição dos genótipos (GROSS *et al.*, 1996; HARRIS *et al.*, 1997, FERRARI *et al.*, 1998, ECCLESHALL *et al.*, 1998), no entanto, os asiáticos e negros apresentam padrões diferenciados. Em relação aos caucasianos, os asiáticos mostram menor frequência do genótipo *FF* (ARAI *et al.*, 1997; CHOI *et al.*, 2000), já os negros têm maior frequência do genótipo *FF* e raramente apresentam o genótipo *ff* (HARRIS *et al.*, 1997; AMES *et al.*, 1999). Segundo HARRIS *et al.* (1997) o polimorfismo no códon de iniciação pode ser responsável por até um terço das diferenças de DMO no fêmur entre negros e caucasianos.

Apesar de resultados mais consistentes, há estudos nos quais não se verificou interação entre o polimorfismo *FokI* e a DMO (ECCLESHALL *et al.*, 1998; FERRARI *et al.*, 1998; SOWERS *et al.*, 1999) e estudos que sugerem a relação inversa à inicialmente proposta (LAAKSONEN *et al.*, 2004).

Ferrari *et al.* (1998) não encontraram diferenças significativas entre a DMO e os genótipos *FokI* em mulheres pré-menopausa (idade entre 18,7 e 56 anos) e meninas na pré-puberdade (idade entre 6,6 e 11,4 anos), havendo apenas uma tendência à menor DMO lombar em meninas pré-púberes com o genótipo *ff*.

Um estudo envolvendo 174 mulheres caucasianas de origem francesa no período pré-menopausa (idade entre 31 e 56 anos) também não encontrou correlações entre os genótipos *FokI* e a DMO (ECCLESHALL *et al.*, 1998), no entanto, os marcadores para reabsorção óssea mostraram-se mais elevados nos portadores do genótipo *ff*, o que pode estar relacionado à maior perda óssea verificada por Gross *et al.* (1996).

Posteriormente, ao analisar 261 mulheres pré e peri-menopausa (idade entre 28 e 48 anos), Sowers *et al.* (1999) não encontraram relação entre o polimorfismo no local de iniciação da transcrição e as medidas de DMO.

Em um estudo com 124 adolescentes finlandeses, Laaksonen *et al.* (2004) verificaram que os valores da DMO no rádio e ulna foram maiores para meninas com o genótipo *ff* em comparação com os grupos *FF* e *Ff*, no entanto os resultados não atingiram significância. Em meninos, a ANCOVA revelou diferença entre os genótipos e, apesar do grupo *FF* apresentar os menores valores, as análises *post-hoc* não revelaram diferenças entre os genótipos, no entanto deve-se ressaltar que apenas dois meninos possuíam o genótipo *ff*, o que não permite avaliar a relação dose-resposta entre o genótipo e a DMO.

2.4.3. Polimorfismo no local do fator de transcrição *Cdx-2*

Em 1999, Yamamoto *et al.* descreveram um sítio de ligação para o fator de transcrição específico do intestino *Cdx-2* na região promotora do gene *VDR*. Posteriormente, Arai *et al.* (2001) identificaram um polimorfismo neste local, definido pela substituição de uma guanina por

uma adenina, os alelos foram denominados Cdx-G ou Cdx-A, de acordo com a base presente. Essa mutação parece ser funcional, pois influencia a expressão gênica do VDR no intestino, de modo que a variação Cdx-A possui maior afinidade com a proteína Cdx-2, o que leva a maior atividade de transcrição, em relação ao alelo Cdx-G (ARAI *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2003).

A primeira pesquisa conhecida sobre o polimorfismo Cdx-2 foi realizada com 261 mulheres japonesas nos períodos pré e pós-menopausa (ARAI *et al.*, 2001). De acordo com os resultados, o polimorfismo Cdx-2 apresentou-se significativamente relacionado à DMO lombar em mulheres pós-menopausa, mas não em mulheres pré-menopausa, com o grupo Cdx-A/A tendo a maior DMO e o Cdx-G/G a menor, com valores intermediários para o genótipo Cdx-A/G.

Em um estudo com 2848 holandeses (idade entre 55 e 80 anos) Fang *et al.* (2003) verificaram que indivíduos com o alelo Cdx-A, apresentavam menos fraturas lombares, sendo o efeito similar para ambos os sexos, no entanto não houve relações entre os polimorfismos Cdx-2 e a DMO na coluna lombar e no colo do fêmur. Quando os indivíduos com baixa ingestão de cálcio foram analisados separadamente, houve uma tendência do genótipo Cdx-A/A apresentar maior DMO.

Morita *et al.* (2005) avaliaram a interação entre os polimorfismos Cdx-2 e fatores ambientais na determinação da DMO em 1.340 mulheres japonesas. Os sítios avaliados foram coluna lombar (L2-L4), colo do fêmur, terço distal do rádio e sítio ultra-distal do antebraço. De acordo com os resultados, a DMO no sítio ultra-distal do antebraço foi menor em mulheres no período pré-menopausa portadoras do genótipo Cdx-G/G em comparação com os demais genótipos. Nenhuma outra diferença na DMO foi encontrada entre os genótipos nos demais sítios analisados em mulheres no período pré ou pós-menopausa. Além das medidas iniciais foi realizado um acompanhamento após três anos com 950 participantes do estudo. Durante este

acompanhamento, não foram verificadas associações entre dos genótipos Cdx-2 e as mudanças na DMO em nenhum dos sítios avaliados.

O polimorfismo Cdx-2 também se mostra alterado nas diferentes etnias. O alelo Cdx-A é mais freqüente nos negros (74%), seguido pelos asiáticos (43%) e menos freqüente nos brancos (19%) (ARAI *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2003).

2.4.4. Interação entre polimorfismo no gene VDR e atividade física

Uma das explicações para as divergências entre os estudos sobre as relações do VDR com a DMO pode ser a interação entre genes e fatores ambientais, dentre os quais se inclui a atividade física (BLANCHET *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2003). De fato, há uma crescente conscientização de que as respostas às atividades físicas sejam mediadas por variações genéticas individuais (BRAY, 2000; RANKINEN *et al.*, 2001; RANKINEN *et al.*, 2002; PERUSSE *et al.*, 2003; WOLFARTH *et al.*, 2005).

Tendo em vista que a ação da vitamina D está relacionada com o processo de fortalecimento dos ossos e reparo de micro fraturas que ocorrem com os exercícios (GALLAGHER *et al.*, 1990; JONES *et al.*, 1998), a alteração da sua atividade, devido aos diferentes polimorfismos, pode trazer adaptações diversas em resposta à atividade física.

Nesta linha, Tsuritani *et al.* (1998) estudaram as mudanças na DMO em relação aos polimorfismos VDR em mulheres caucasianas (idade entre 60 e 70 anos) submetidas a um programa de caminhadas de 12 meses e verificaram que somente as portadoras do genótipo *bb* apresentaram acréscimo significativo da DMO lombar em relação ao grupo controle, composto por portadoras do mesmo genótipo.

No entanto, Jarvinen *et al.* (1998) não encontraram diferenças entre os ganhos de DMO e os genótipos VDR (*BB*, *Bb* e *bb*) em mulheres caucasianas no período pré-menopausa submetidas

a um programa de 18 meses de atividade física de alto impacto. De acordo com os resultados, independente do genótipo, as participantes obtiveram os mesmos benefícios com a atividade física.

Posteriormente, Kitagawa *et al.* (2001) estudaram a inter-relação entre a realização habitual de atividade física e o polimorfismo no gene VDR na determinação da DMO do antebraço de jovens japonesas (idade de 18 a 19 anos). Na comparação com a análise por *ApaI*, verificou-se que os efeitos da atividade física eram significativos no genótipo *aa*, mas não no genótipo *Aa*. Quando se analisou o polimorfismo através da *TaqI*, foi verificado que a atividade física exercia efeitos mais significativos na DMO de portadores do genótipo *TT*, em comparação com *Tt*.

Blanchet *et al.* (2002) analisaram 575 mulheres canadenses no período pós-menopausa, dividindo-as, através de um questionário, em sedentárias, moderadamente ativas e ativas. De acordo com os resultados, mulheres ativas com o genótipo *bb* apresentavam menor DMO na coluna lombar, em comparação com mulheres ativas com a variação *BB*, sugerindo uma melhor resposta à atividade física em portadoras desta variação.

Deste modo, em relação aos polimorfismos localizados na região não traduzida 3', os resultados são controversos, alguns estudos mostraram benefícios para os alelos *a*, *b* e *T* (TSURITANI *et al.*, 1998; KITAGAWA *et al.*, 2001), alguns não mostraram diferenças (JARVINEN *et al.*, 1998) e outros até mesmo mostraram uma relação negativa (BLANCHET *et al.*, 2002)

Até o momento, são conhecidos apenas dois estudos que analisaram a interação entre atividade física e o polimorfismo 5' em relação ao metabolismo ósseo, e apenas um que verificou interação entre o polimorfismo Cdx-2 e atividade física.

Com relação aos polimorfismos Cdx-2, Morita *et al.* (2005) estudaram a interação entre os diferentes genótipos e fatores ambientais na determinação da DMO em mulheres japonesas. Os autores reportaram interações significativas entre os genótipos e a participação em atividades desportivas no segundo grau na determinação da DMO. Em mulheres no período pós-menopausa, as portadoras do genótipo Cdx-G/G que participavam de atividades desportivas apresentavam maior DMO na coluna lombar e colo do fêmur em comparação com não-participantes, tais diferenças não ocorreram em portadoras dos demais genótipos.

Os estudos sobre o polimorfismo *FokI* também foram conduzidos em japoneses. Tajima *et al.* (2000) relacionaram o polimorfismo *FokI* à resposta do metabolismo ósseo ao treinamento de força em 34 jovens (idade entre 18 e 31 anos) japoneses do sexo masculino. Neste estudo, o número reduzido da amostra tornou necessário agrupar os genótipos *Ff* e *ff* em um só grupo: portadores do alelo *f*. Ao analisar os dados de todos os indivíduos, os resultados mostraram que após um mês de treino de força é possível verificar aumento nos marcadores de formação óssea e queda nos marcadores de reabsorção. No entanto, o aumento dos níveis de fosfatase alcalina (*B-ALP*) não foi significativo e as quedas nos níveis de determinados marcadores de reabsorção óssea (*cross-linked NH₂-terminal teropeptide of type I collagen*) foram menos expressivas em portadores do alelo *f*, apesar de não terem diferença significativa entre os grupos, o que levou os autores a sugerir que portadores do genótipo *FF* sejam melhores respondedores.

Em um estudo transversal, Nakamura *et al.* (2002) compararam fenótipos ósseos (DMO, conteúdo mineral óssea, massa óssea) de jovens japoneses, atletas e sedentários, em relação ao genótipo VDR, utilizando a enzima restritiva *FokI*. Como a quantidade do genótipo *ff* foi baixa, as comparações foram feitas entre as variações *FF* e *Ff*. No grupo controle, não houve relação entre os genótipos de VDR e os fenótipos ósseos, no entanto, no grupo de atletas o conteúdo

mineral ósseo (CMO) da coluna lombar e o volume ósseo eram maiores na presença de FF , a DMO apresentou uma tendência similar, mas sem diferenças estatisticamente significativas.

Neste mesmo estudo, foi verificado que as diferenças na CMO da coluna eram mais expressivas entre atletas e não-atletas com genótipo FF , do que com a variação Ff . Os autores sugeriram que os ossos de pessoas com genótipo FF adquirem mais massa em função dos exercícios, reforçando a hipótese de que o alelo F em homozigose torne os indivíduos melhores respondedores.

Infelizmente, os dois estudos acima (TAJIMA *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2002) foram feitos com amostras relativamente reduzidas, o que limita suas conclusões. O fato de não haver possibilidades de realizar comparações com os genótipos mais extremos (ff e FF), também pode ter reduzido a significância dos resultados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo

Estudo em corte transversal, no qual a variável dependente é a densidade mineral óssea (DMO), e as variáveis independentes são os polimorfismos no gene receptor de vitamina D (VDR) e o nível de atividade física.

3.2. Amostra

A amostra foi composta por 192 voluntárias, residentes no Distrito Federal e participantes do Projeto Geração de Ouro da Universidade Católica de Brasília. As características da amostra estão presentes na tabela 01, na seção de resultados.

Foram adotados os seguintes critérios de exclusão:

- Estar impossibilitado de realizar as medidas no aparelho DXA
- Não estar no período pós-menopausa
- Não ser nascida no Brasil
- Possuir implantes metálicos no corpo
- Possuir disfunções hormonais (paratireóides e ovários) ou doenças que alterem o metabolismo ósseo.

O estado de reposição hormonal, tabagismo, uso de suplementos de cálcio e a cor da pele declarada pelo próprio indivíduo foram avaliados por meio de um questionário padrão (Anexo A). O padrão de atividade física foi avaliado pelo International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). Um avaliador esteve presente no momento de preenchimento dos questionários para sanar dúvidas, no entanto, o avaliador não interferia com relação à resposta sobre a cor da pele.

3.3. Padrões de atividade física

Os níveis habituais de atividade física foram avaliados por meio da versão curta do IPAQ (Anexo B). O IPAQ foi desenvolvido como um instrumento para monitorar de forma padronizada a atividade e inatividade física em diversos países do Mundo (CRAIG *et al.*, 2003). O modelo usado no presente estudo corresponde à tradução oficial em português da versão curta (disponível no site www.celafiscs.com.br), previamente validada para a população brasileira (MATSUDO *et al.*, 2001; PARDINI *et al.*, 2001). A avaliação leva em consideração a duração e frequência das atividades físicas realizadas em uma semana, considerando-se apenas sessões superiores a 10 minutos contínuos. Os resultados do questionário possibilitam a divisão em cinco categorias: sedentários, insuficientemente ativos “B”, insuficientemente ativos “A”, ativos e muito ativos. Alguns autores (HALLAL *et al.*, 2003) adotam a divisão em dois grupos, determinando como ponto de corte as recomendações mínimas de atividade física do American College of Sports Medicine, Center for Disease Control and Prevention (PATE *et al.*, 1995) e do relatório do U.S. Surgeon General (USDHHS, 1996), seguindo este princípio, os grupos foram divididos em insuficiente ativos (IA), contendo os indivíduos classificados como sedentários e insuficientemente ativos “A” e “B”, e ativos (AT), contendo os indivíduos classificados como ativos e muito ativos.

3.4. Densidade mineral óssea.

As mensurações foram realizadas no laboratório de imagens e no laboratório de estudos em educação física e saúde (LEEFS) da Universidade Católica de Brasília (UCB-DF). A densidade mineral óssea foi obtida utilizando-se o método da absorptometria por raios-X de dupla energia (DXA), realizado em um aparelho modelo Lunar DPX-IQ. Nesta medida, os indivíduos

permanecem em decúbito dorsal sobre uma mesa, com seus membros inferiores relaxados e separados um do outro. Os membros superiores foram posicionados ao longo do corpo com os antebraços em pronação. Os sítios escolhidos para as medidas foram as vértebras lombares L2-L3-L4, o triângulo de Ward e o colo do fêmur.

Para o preparo, foram dadas as seguintes recomendações: não ingerir comprimidos de cálcio no dia do exame; não ter realizado exame radiológico com uso de contraste nos 14 dias anteriores; não realizar exame de medicina nuclear nos três dias anteriores; fazer jejum de cerca de duas a quatro horas; evitar usar roupas com acessórios de metal no exame. A avaliação foi contra-indicada nos casos de fratura e/ou implante metálico nas regiões analisadas.

3.5. Estudo dos polimorfismos no gene VDR

Todo o procedimento de genotipagem foi realizado pelos próprios pesquisadores. As participantes foram convidadas a comparecer ao Laboratório de Estudos em Educação Física e Saúde (LEEFS), localizado no Campus I da Universidade Católica de Brasília, para que fosse realizada a coleta sanguínea. O material biológico foi armazenado na geladeira local até que ocorresse a coleta de todas as voluntárias. Essa etapa teve uma duração aproximada de 02 meses, tendo em vista que as visitas aconteciam numa frequência semanal de duas a três vezes, com uma média de 15 voluntárias por visita. Em seguida, as amostras foram levadas ao Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia, localizado no Campus II da Universidade Católica de Brasília, onde todo o procedimento de extração do DNA até a obtenção dos genótipos foi realizado.

3.5.1. Extração de DNA

Um técnico devidamente treinado realizou a coleta de amostra sanguínea (3 a 5 ml) de todas as participantes por meio da veia antecubital. O material biológico foi colhido em tubos com vácuo estéreis contendo anticoagulante EDTA. O DNA genômico de alto peso molecular foi extraído dos leucócitos periféricos pelo método “salting out” (MILLER *et al.*, 1988).

Os procedimentos de extração envolveram basicamente três passos:

a) Quebra das células com remoção das membranas lipídicas por meio da adição de um tampão com detergente. A solução usada no procedimento foi denominada Tampão A, composta por sacarose (0.32 M), Tris-HCl (10 mM, pH 7.6), MgCl₂ (5 mM) e o detergente não iônico Triton X 100 (1 %). Após a homogeneização do sangue, um volume inicial de 750 µl foi depositado em um microtubo de 1,5 ml. Adicionou-se 750 µl do Tampão A, sendo o material centrifugado a 2.500 rpm por 20 minutos para condensação do pellet, com descarte posterior do sobrenadante.

b) Remoção das proteínas celulares e histonas ligadas ao DNA - o pellet foi suspenso em um composto denominado Tampão B (25mM de EDTA com pH 8.0 e 75mM de NaCl) e foram adicionados o SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% e proteinase K (10 mg/ml). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C durante uma hora para ação da enzima. Após a incubação foi adicionado NaCl (6 M) para precipitar o DNA, seguido de uma nova centrifugação da mistura com a finalidade de precipitar impurezas no fundo dos tubos.

c) Precipitação do DNA em álcool – o sobrenadante obtido no item anterior e foi transferido para um tubo e posteriormente foi adicionado etanol absoluto, na proporção de duas vezes o volume contido no tubo. Misturou-se por inversões cuidadosas, e nesse momento possível a visualização da precipitação do DNA. Foi realizada outra centrifugação com a finalidade de aderir o DNA ao fundo dos tubos, descartando-se em seguida o sobrenadante com

cuidado para não perder o pellet. Após a evaporação completa do etanol, foram adicionados 300 µl de TE para conservação do DNA.

3.5.2. *Quantificação do DNA*

A concentração do DNA extraído foi estimada em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. Em cada poço do gel foi aplicado um volume de 8 µl (4 µl de tampão de carregamento e 4 µl do DNA extraído e conservado em TE). Foi utilizado como padrão para quantificação o lambda DNA em concentrações de 20, 100, 200 e 400ng/µl. Após aproximadamente 15 minutos de eletroforese a 80 V, o gel foi fotografado em luz ultravioleta. As “bandas” formadas pelo DNA foram comparadas com as dos marcadores e, por meio da inspeção visual, foi realizada a quantificação do DNA. Após a quantificação, todas as amostras de DNA foram diluídas em TE, de forma a ficar numa concentração final de 5 ng/µl.

3.5.3. *Polimorfismos estudados no gene VDR*

Os polimorfismos no gene VDR comumente investigados em estudos de associação são, de maneira geral, nomeados pelas enzimas de restrição utilizadas para sua genotipagem por meio de PCR-RFLP (polimorfismos de tamanho em fragmentos de restrição). O Cdx não gera ou abole sítio para enzima de restrição. Os polimorfismos utilizados neste trabalho são amplamente citados na literatura como *ApaI*, *BsmI*, *Cdx*, *FokI* e *TaqI*. Todos estes polimorfismos estão depositados no banco de dados dbSNP no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) com as respectivas denominações rs7975232, rs1544410, rs17883968, rs2228570 e rs731236. Ao longo deste trabalho os alelos e, conseqüentemente, os genótipos para os locos *ApaI*, *BsmI*, *FokI* e *TaqI* serão denominados utilizando a letra inicial da enzima de restrição em maiúscula e minúscula.

Para facilitar o entendimento, segue a abaixo a relação dos alelos em termos de nucleotídeos com os alelos representados pelas letras das enzimas de restrição.

a) rs7975232 (Polimorfismo *ApaI*) - será usado *A* para identificar o alelo com a presença de Timina (T) e *a* para o alelo com a presença de Guanina (G). Conseqüentemente, $AA = TT$, $Aa = GA$ e $aa = GG$;

b) rs1544410 (Polimorfismo *BsmI*) - será usado *B* para designar o alelo com a presença de Adenina (A), e *b* para a presença de Guanina (G). Portanto, $BB = AA$, $Bb = AG$ e $bb = GG$;

c) rs17883968 (polimorfismo Cdx-2). As siglas usadas para os polimorfismos Cdx-2 serão equivalentes às mesmas empregadas anteriormente (ARAI *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2003). Será usado Cdx-G para designar o alelo com a presença de Guanina (G) e Cdx-A para o alelo com a presença de Adenina (A). Deste modo, $Cdx-G = GG$, $Cdx-G/A = GA$ e $Cdx-A = AA$.

d) rs2228570 (Polimorfismo *FokI*) - será usado *F* para designar o alelo com ausência do primeiro códon de iniciação devido à troca de Timina (T) por Citosina (C) e *f* para o alelo que possui o primeiro códon de iniciação. Portanto, $FF = CC$, $Ff = CT$ e $ff = CC$;

e) rs731236 (Polimorfismo *TaqI*) - será usado *T* para designar o alelo com a presença de Timina (T) e *t* para o alelo com a presença de Cistina (C). Deste modo, $TT = TT$, $Tt = TC$ e $tt = CC$;

3.5.4. Amplificação do DNA – Polimerase Chain Reaction (PCR)

Os sítios polimórficos foram amplificados por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Essa técnica permite que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado milhares de vezes em poucas horas. A técnica implica na utilização de fragmentos de DNA fita simples (iniciadores) que delimitam a região a ser amplificada. A técnica de PCR é baseada na capacidade da enzima Taq polimerase exercer

sua função em temperaturas elevadas que promovem normalmente a desnaturação do DNA. O fato ocorre pois a enzima, extraída de uma bactéria que vive em altas temperaturas denominada *Thermus Aquaticus*, tem característica termoestável, o que é de grande importância uma vez que a reação se processa em diferentes ciclos de temperaturas. O $MgCl_2$ favorece o estímulo da Taq polimerase e os dNTPs conferem maior reprodutibilidade à reação.

Os iniciadores para a PCR e a metodologia de genotipagem utilizados neste trabalho seguiram os procedimentos adotados em Pereira et. al. (dados não publicados). Para amplificação pela PCR, novos iniciadores foram desenhados. Para os polimorfismos *ApaI* e *TaqI*, os iniciadores para PCR foram os mesmos, pois os polimorfismos encontram-se em regiões próximas do gene VDR (Exon 9 e Intron entre Exons 8 e 9 o *Taq I* e o *Apa I*, respectivamente).

A PCR foi realizada em um volume final de 10 μ l, seguindo o seguinte protocolo: Tampão 1x, $MgCl_2$ 1,5 μ M, dNTPs 250 μ M, iniciadores 1 μ M, Taq DNA Polimerase 1 U e 10-20 ng de DNA.

Após o preparo, a reação foi colocada em um termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), alternando temperaturas de 95°, 63° e 72° com o intuito de promover a desnaturação do DNA (separação das fitas devido ao rompimento das pontes de hidrogênio), anelamento dos iniciadores às fitas simples de DNA e ligação dos dNTPs às fitas, respectivamente. O programa utilizado adotou a seguinte variação de temperatura: 05 minutos a 95°; 14 ciclos (01 minuto 95° - 01 minuto a 63° - 01 minuto a 72°); 25 ciclos (01 minuto a 95° - 01 minuto a 56° - 01 minuto a 72°); 10 minutos a 72°; e mantido em 10° até a reação ser retirada do termociclador.

3.5.5. Genotipagem

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por meio de minisequenciamento (SYVÄNEN, 1999) utilizando o sistema comercial SNaPshot™ Multiplex System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). No minisequenciamento, a reação de síntese de DNA catalisada por uma DNA polimerase é usada para distinguir diferentes alelos. O princípio da reação é anelar um iniciador exatamente adjacente ao nucleotídeo polimórfico e permitir a extensão de um único nucleotídeo. Isto é possível graças à inclusão somente de di-desoxiribonucleotídeos (ddNTP) na reação. No caso específico do sistema SNaPshot™ os ddNTPs são marcados com moléculas fluorescentes, especificamente o ddATP (verde), o ddTTP (vermelho), ddGTP (azul) e o ddCTP (preto). Para diferenciação dos locos a serem genotipados caudas de poli T foram adicionados aos iniciadores de minisequenciamento.

O protocolo de minisequenciamento pelo sistema SNaPshot™ foi desenvolvido para genotipagem simultânea de até 10 polimorfismos de uma única base. Neste trabalho os fragmentos foram amplificados individualmente por PCR e em seguida misturados em quantidades equimolares (1µl do produto de cada fragmento, totalizando 4µl). Posteriormente, os conjuntos de fragmentos foram submetidos ao protocolo de minisequenciamento. O passo inicial foi a eliminação dos iniciadores da PCR e dos dNTPs. O processo de purificação, envolveu a adição de 0,25 U da enzima SAP e 0,15 U da enzima ExoI para cada µl de produto de PCR. Um volume de 4 µl de produto de PCR foi purificado. Para ação das enzimas a mistura foi incubada em um termociclador de acordo com a seguinte programação: 90 minutos a 37°C e 20 minutos a 80°C. Com os produtos de PCR purificados, foi dado início ao preparo das reações de extensão. Os reagentes desse processo foram a mistura de reação do sistema SNaPshot™ (Snapshot Ready Reaction Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), os iniciadores de extensão e água Milli-Q para completar um volume final de 5µl. A mistura de reação do sistema contém a

AmpliTaq DNA polimerase, os ddNTPs fluorescentes e o tampão da reação. Em seguida, a reação foi colocada no termociclador de acordo com a seguinte programação: 25 ciclos de variações de temperaturas (10 segundos a 96°, 5 segundos a 50° e 30 segundos a 60°) e mantida a 4° até que o produto fosse retirado. Em seguida, foi realizada uma nova purificação com a finalidade de remoção dos ddNTPs não incorporados com 0.15 U da enzima SAP para cada μl do produto e levado para o termociclador (60 minutos a 37° e 15 minutos a 75°).

Com os produtos de extensão já purificados, procedeu-se à preparação das placas para realização da eletroforese. Para cada uma das amostras, foi conduzida uma mistura com volume final de 10 μl , dos quais 1 μl foi composto pelo produto. Os demais componentes da mistura foram um padrão de tamanho molecular (GS120 Liz, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (0.2 μl) e formamida altamente deionizada (8,8 μl), para desnaturação do produto. A Eletroforese foi em seguida realizada em um seqüenciador automático de DNA (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com subsequente análise dos eletroferogramas através dos softwares Genescan 3.7 e Genotyper 3.7 para obtenção dos genótipos referentes a cada uma das amostras. O procedimento descrito acima é mostrado de maneira esquemática na figura 02.

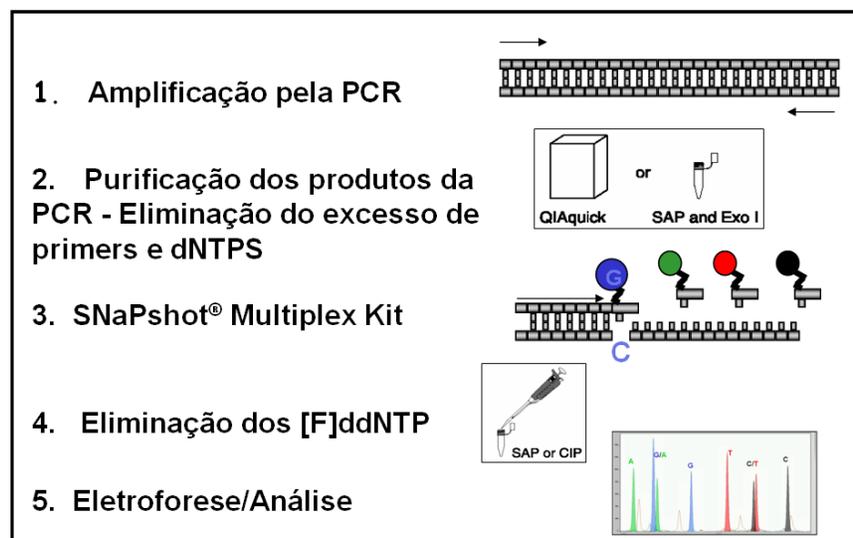


Figura 02. Representação esquemática dos passos seguidos desde a amplificação pela PCR até a realização e análise da eletroforese.

3.6. Cuidados Éticos

Antes do início da pesquisa, os voluntários foram convidados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido, contendo todas as informações sobre o estudo, tais como vantagens e desvantagens do protocolo, o seu significado, e o possível uso dos resultados esperados (Anexo C). Aos sujeitos coube autorizar ou não o armazenamento dos dados e materiais coletados, que estão mantidos sob a guarda do pesquisador, no laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Católica de Brasília (Anexo D)

3.7. Tratamento estatístico

Para apresentação dos resultados foram utilizados procedimentos padrão de estatística descritiva, com o cálculo da média e desvio padrão. Uma análise exploratória foi realizada para

verificar se os dados seguiam uma distribuição normal por meio do teste de Kolmogorov-Smirnoff e definir sobre a utilização de testes paramétricos. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado pelo teste chi-quadrado para os polimorfismos estudados.

Para determinar os fatores que influenciam significativamente nos fenótipos estudados, foram realizadas regressão lineares multivariadas *stepwise* incluindo as seguintes variáveis: idade, índice de massa corporal, reposição hormonal, tabagismo, cor da pele reportada pelo participante e suplementação de cálcio. Os fatores que influenciavam a variável dependente ($p < 0,05$) foram utilizados como co-variantes nas análises posteriores para evitar potenciais diferenças devido a fatores externos.

A interação entre atividade física e polimorfismos VDR na determinação da DMO foi avaliada por meio da ANCOVA fatorial [genótipo (3) x nível de atividade física (2)]. Os genótipos foram divididos em três categorias e o nível de atividade física em duas categorias: ativos (AT) e insuficiente ativos (IA). As variáveis de caracterização da amostra (idade, peso, estatura, IMC e percentual de gordura) foram comparadas por meio de ANOVA fatorial [genótipo (3) x nível de atividade física (2)]. Quando as análises indicavam diferenças significativas, foram utilizadas comparações múltiplas com ajuste do intervalo de confiança pelo método de Bonferroni para identificar onde as diferenças ocorriam. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Todas as análises foram realizadas com a utilização do software SPSS 8.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra

Os resultados da caracterização da amostra estão apresentados de forma descritiva na tabela 01, considerando-se médias e desvios-padrão das variáveis. Um total de 192 mulheres no período pós-menopausa participaram do estudo. Todas as participantes responderam os questionários e foram avaliadas com relação à massa corporal total, estatura e composição corporal.

Tabela 1: características da amostra

Variável	Média ± Desvio padrão
N	192
Idade (anos)	67,84 ± 5,23
Massa corporal (kg)	64,58 ± 11,71
Estatura (cm)	151,99 ± 6,34
IMC (g/m ²)	27,91 ± 4,48
Percentual de gordura	38,32 ± 6,34
DMO L2-L4 (g/cm ²)*	0,974 ± 0,181
DMO colo (g/cm ²)	0,868 ± 0,137
DMO ward (g/cm ²)	0,683 ± 0,159

IMC – índice de massa corporal; DMO – densidade mineral óssea

* n = 191

As características referentes a tabagismo, obesidade, reposição hormonal, cor da pele auto-relatada, presença de doenças crônicas, suplementação de cálcio e o nível atividade física estão descritas na tabela 02. Ao utilizar uma classificação de obesidade baseada pelo IMC, na qual indivíduos que apresentam valores superiores a 30 Kg/m² são considerados como acometidos (GEUSENS *et al.*, 1997), observou-se a ocorrência de obesidade em 28,8% das voluntárias. Apenas uma pequena parte da amostra (4%) relatou ser fumante. As doenças

crônicas mais prevalentes foram: hipertensão arterial, osteoporose e diabetes mellitus tipo II, as quais acometiam 66,5%, 30,4% e 16,7% das voluntárias, respectivamente. Dentre as participantes, 17,2% relataram estar sendo submetida à terapia de reposição hormonal. As cores “branca” e “morena” foram as mais reportadas pelas participantes, ambas relatadas por 41,1% da amostra.

Tabela 2. Características de tabagismo, obesidade, reposição hormonal, cor da pele auto-relatada, presença de doenças crônicas e nível de atividade física da amostra.

Característica	N (%)
Fumante	
Sim	4 (2,1)
Não	188 (97,9)
Obesidade	
Sim (IMC > 30Kg/m ²)	55 (28,6)
Não (IMC < 30Kg/m ²)	137 (71,4)
Reposição Hormonal	
Sim	33 (17,2)
Não	159 (82,8)
Suplementação de cálcio	
Sim	53 (30,5)
Não	121 (69,5)
Cor da pele	
Branca	79 (41,1)
Morena	79 (41,1)
Negra	31 (16,1)
Vermelha	3 (1,6)
Doenças Crônicas	
Hipertensão arterial	127 (66,5)
Osteoporose	58 (30,4)
Diabetes tipo II	32 (16,7)
Nível de Atividade Física (IPAQ)	
Sedentárias	8 (4,2)
Insuficientemente ativas B	20 (10,4)
Insuficientemente ativas A	47 (24,5)
Ativas	113 (59,4)
Muito Ativas	3 (1,6)

Os resultados do IPAQ revelaram que 4,2% da amostra foram classificadas como sedentárias, 10,4% insuficientemente ativas “B”, 24,5% insuficientemente ativas “A”, 59,4% ativas e 1,6% muito ativas. Deste modo, o grupo AT incluiu 60,9% da amostra e o IA 39,1% (Tabela 2).

A regressão linear múltipla revelou que o modelo mais eficiente para predição da DMO no colo do fêmur e triângulo de Ward incluía o IMC, idade, reposição hormonal e tabagismo. Os valores de r^2 foram de 0,268 e 0,256 para o colo do fêmur e triângulo de Ward, respectivamente. As variáveis incluídas no modelo de predição da DMO lombar foram IMC e idade ($r^2 = 0,153$). Todas as análises posteriores para os sítios específicos foram realizadas com estes parâmetros como co-variantes.

4.2. Extração e quantificação das amostras de DNA

A figura 03 apresenta o exemplo de uma foto de gel de agarose realizado para quantificar as amostras de DNA extraídas. Os quatro primeiros poços de cada uma das duas linhas correspondem ao padrão para quantificação (lambda DNA) em concentrações de 20, 100, 200 e 400ng/ μ l, da esquerda para a direita. Foi observado que as amostras exemplificadas apresentaram uma concentração variando entre 300 e 600 ng/ μ l de DNA de alto peso molecular.

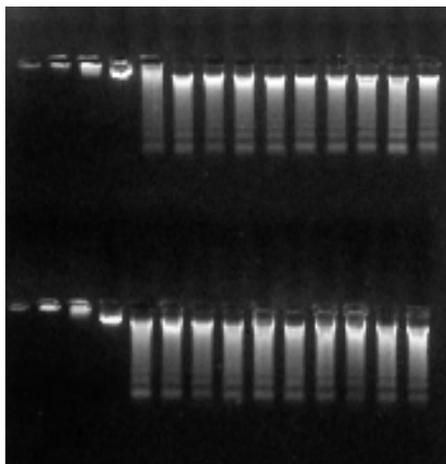


Figura 03. Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Os quatro primeiros poços na parte superior e inferior do gel representam os padrões de concentração de DNA, respectivamente, com 20, 100, 200 e 400 ng/ul. Os demais poços são amostras de DNA genômico extraído de amostras de sangue.

4.3. Amplificação pela PCR

Os polimorfismos presentes ao longo do gene VDR adotados para fazer parte da presente investigação foram os seguintes: *ApaI*, *BsmI*, *Cdx-2*, *FokI* e *TaqI*. A figura 04 exemplifica uma fotografia de gel de agarose correspondente à amplificação dos fragmentos contendo os sítios polimórficos estudados. O primeiro poço da esquerda para a direita contém o padrão de tamanho (1Kb *plus*) para estimativa do comprimento do fragmento. Como previsto com base nos iniciadores desenhados, os fragmentos amplificados possuíam em torno de 200 pares de bases. Os fragmentos onde estão localizados os polimorfismos *ApaI/TaqI*, *BsmI*, *Cdx-2* e *FokI*, correspondem às fotografias ilustradas nas figuras 04a, 04b, 04c e 4d, respectivamente.

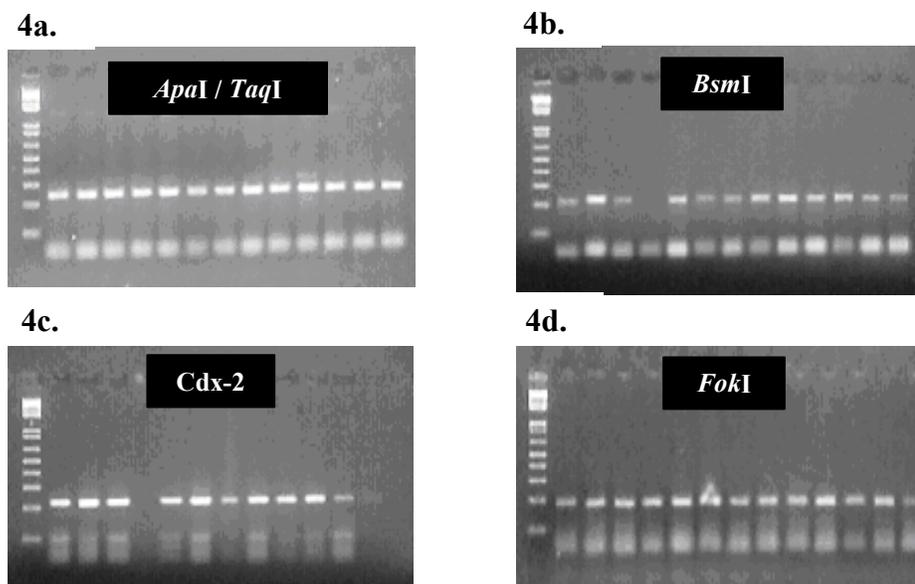


Figura 04. Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela PCR com iniciadores para *ApaI* e *TaqI* em 4a; *BsmI* em 4b; *Cdx-2* em 4c; e *FokI* em 4d.

4.4. Genotipagem por minisequenciamento

A figura 05 ilustra um exemplo da genotipagem de uma amostra como aparece no *software*. Observando a figura da esquerda para a direita, nota-se que o primeiro loco refere-se ao *Cdx-2* com tamanho de pico em torno de 21 pares de base; o segundo loco corresponde ao *TaqI* com tamanho de pico em torno de 28 pares de base; o terceiro refere-se ao polimorfismo *ApaI* cujo tamanho do pico situa-se em torno de 35 pares de base; o quarto loco corresponde ao *BsmI* cujo pico apresenta um tamanho médio de 44 pares de base; e o quinto e último pico refere-se ao polimorfismo *FokI* e apresenta um tamanho situado em torno de 44 pares de base. No caso da amostra exemplificada na figura, o genótipo apresentado foi o heterozigoto para todos os locos.

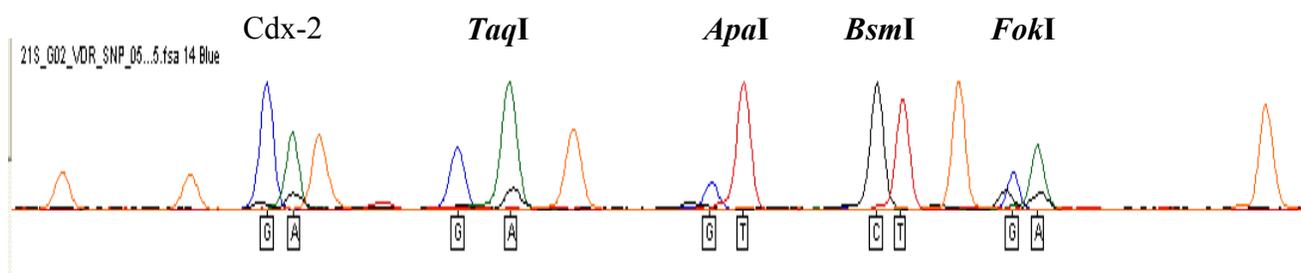


Figura 05. Eletroferograma de produtos de minisequenciamento para os locos *Cdx2*, *TaqI*, *ApaI*, *BsmI* e *FokI*. Neste eletroferograma todos os locos são heterozigotos.

4.5. Associação entre genótipos VDR, DMO e nível de atividade física

Como relatado anteriormente, cinco polimorfismos ao longo do gene VDR foram adotados na presente investigação: *ApaI*, *BsmI*, *Cdx-2*, *FokI* e *TaqI*. Foram coletadas amostras de sangue de todas as participantes, entretanto, devido a inconsistências durante o procedimento de genotipagem, algumas amostras foram descartadas. Dessa forma, ocorreu pequena diferença na quantidade de indivíduos entre os polimorfismos. Em 50 amostras, o processo de genotipagem foi realizado em duplicidade com a finalidade de verificar a similaridade dos resultados, sendo observada congruência em 100% dos casos.

Os testes de chi-quadrado revelaram que a distribuição de todos os genótipos estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para uma melhor visualização, os resultados serão apresentados separadamente para cada polimorfismo.

4.5.1. *ApaI*

A frequência do alelo *a* foi de 0,412 e do *A* foi 0,588. A distribuição dos genótipos foi 15,4% para o *aa*; 51,6% para o *Aa* e 32,3% para o *AA*. Os resultados com relação aos polimorfismos *ApaI* estão apresentados na tabela 03.

A avaliação dos polimorfismos *ApaI* não mostraram diferenças entre os genótipos para a DMO no colo do fêmur [$f(2,188) = 0,17$, $p = 0,983$], coluna lombar [$f(2,187) = 0,126$, $p = 0,882$] e triângulo de Ward [$f(2,188) = 0,117$, $p = 0,890$]. De modo similar, a interação entre os polimorfismos e o nível de atividade física não foi estatisticamente significativa para o colo do fêmur [$f(2,188) = 0,253$, $p = 0,777$], coluna lombar [$f(2,187) = 2,591$, $p = 0,078$] e triângulo de Ward [$f(2,188) = 0,106$, $p = 0,900$].

Tabela 03: Características da amostra de acordo com o genótipo *ApaI* e o nível de atividade física

	IA			AT			p [#]
	<i>aa</i>	<i>Aa</i>	<i>AA</i>	<i>aa</i>	<i>Aa</i>	<i>AA</i>	
N	12	36	25	17	61	37	
Idade (anos)	68,55±4,72	65,79±4,41	67,05±5,22	64,79±4,74	67,06±5,40	66,76±4,89	0,021*
Massa corporal (kg)	63,91±13,55	66,61±10,67	64,00±15,29	62,21±11,00	64,43±11,46	63,53±9,77	0,867
Estatura (cm)	152,36±5,87	151,70±5,87	151,23±5,82	152,86±6,57	152,20±6,34	151,82±7,42	0,912
IMC (g/m ²)	27,43±4,92	28,96±4,48	27,81±5,43	26,57±3,88	27,77±4,40	27,46±2,89	0,812
% de gordura	37,49±8,36	39,76±6,26	38,99±7,76	39,10±4,58	37,33±6,18	37,96±5,63	0,27
DMO L2-L4 (g/cm ²)	0,973±0,200	0,966±0,168	0,937±0,186	0,935±0,251	1,006±0,184	0,986±0,143	0,078
DMO colo (g/cm ²)	0,854±0,133	0,878±0,112	0,853±0,151	0,888±0,142	0,868±0,138	0,876±0,132	0,777
DMO ward (g/cm ²)	0,651±0,138	0,693±0,141	0,669±0,155	0,728±0,163	0,676±0,171	0,693±0,126	0,9

Onde: IA – Insuficientemente ativo; AT – ativos; IMC – índice de massa corporal; DMO – densidade mineral óssea

valor de p para interação entre atividade física e polimorfismo VDR

* $aa-IA > aa-AT$

4.5.2. *TaqI*

Os resultados com relação ao polimorfismo *TaqI* estão apresentados na tabela 04. A frequência do alelo *t* foi 0,334; a do alelo *T* foi 0,666. O genótipo *tt* estava presente em 15,1% dos sujeitos, o *Tt* em 36,2% e o *TT* em 48,61%.

Não houve diferença significativa entre os genótipos *TaqI* para DMO no colo do fêmur [$f(2,185) = 1,575$, $p = 0,210$], coluna lombar [$f(2,184) = 1,113$, $p = 0,331$] e triângulo de Ward

[$f(2,185) = 1,665$, $p = 0,192$]. A interação entre os polimorfismos e o nível de atividade física não foi estatisticamente significativa para o colo do fêmur [$f(2,185) = 1,791$, $p = 0,170$], coluna lombar [$f(2,184) = 0,118$, $p = 0,889$] e triângulo de Ward [$f(2,187) = 0,624$, $p = 0,537$].

Tabela 04: Características da amostra de acordo com o genótipo *TaqI* e o nível de atividade física

	IA			AT			p [#]
	<i>Tt</i>	<i>Tt</i>	<i>TT</i>	<i>tt</i>	<i>Tt</i>	<i>TT</i>	
N	9	29	33	19	38	57	
Idade (anos)	68,25±6,86	65,76±4,53	67,03±4,42	65,71±5,22	66,03±4,65	67,34±5,49	0,337
Massa corporal (kg)	58,50±9,67	66,40±13,15	66,71±13,02	63,59±8,19	64,65±9,47	62,68±11,54	0,248
Estatura (cm)	148,50±5,04	152,16±5,73	152,42±5,87	151,71±6,51	154,35±6,39	150,78±6,74	0,053*
IMC (g/m ²)	26,51±4,01	28,59±4,90	28,69±5,17	27,55±2,41	27,03±2,70	27,55±4,53	0,564
% gordura	35,75±6,87	39,25±7,80	39,51±6,59	39,49±4,30	36,51±4,52	37,87±6,71	0,13
DMO L2-L4 (g/cm ²)	0,885±0,179	0,981±0,184	0,946±0,168	0,977±0,158	1,014±0,173	0,976±0,198	0,889
DMO colo (g/cm ²)	0,807±0,123	0,873±0,138	0,875±0,125	0,861±0,143	0,906±0,133	0,854±0,133	0,17
DMO ward (g/cm ²)	0,625±0,130	0,695±0,158	0,677±0,141	0,695±0,131	0,718±0,170	0,667±0,155	0,537

Onde: IA – Insuficientemente ativo; AT – ativos; IMC – índice de massa corporal; DMO – densidade mineral óssea

valor de p para interação entre atividade física e polimorfismo VDR

**Tt*-AT > *TT*-AT; *Tt*-IA

4.5.3. *BsmI*

A frequência do alelo *b* foi 0,681 e a do alelo *B* 0,319. Dentre os indivíduos analisados, 48,9% apresentavam o genótipo *bb*, 38,6% o *Bb* e 12,5% o *BB*. Os resultados com relação ao polimorfismo *BsmI* estão apresentados na tabela 05.

Os resultados da ANCOVA não mostraram diferenças entre os polimorfismos *BsmI* para a DMO no colo do fêmur [$f(2,184) = 1,129$, $p = 0,326$], triângulo de Ward [$f(2,184) = 0,943$, $p = 0,391$] e coluna lombar [$f(2,183) = 2,799$, $p = 0,064$]. Não houve interação significativa entre os polimorfismos e o nível de atividade física para o colo do fêmur [$f(2,184) = 0,115$, $p = 0,891$], coluna lombar [$f(2,183) = 0,195$, $p = 0,823$] e triângulo de Ward [$f(2,184) = 0,214$, $p = 0,808$].

Tabela 05: Características da amostra de acordo com o genótipo *BsmI* e o nível de atividade física

	IA			AT			P [#]
	<i>bb</i>	<i>Bb</i>	<i>BB</i>	<i>bb</i>	<i>Bb</i>	<i>BB</i>	
N	36	38	7	54	43	16	
Idade (anos)	66,11±4,29	67,00±5,20	64,29±3,64	67,21±5,47	65,72±5,06	67,43±4,48	0,225
Massa corporal (kg)	67,29±11,90	65,78±14,18	58,14±9,63	62,57±10,52	65,82±12,18	62,86±7,62	0,198
Estatura (cm)	152,54±5,97	150,39±5,87	150,71±3,99	150,89±5,94	154,74±7,21	150,43±5,57	0,005*
IMC (g/m ²)	28,92±4,84	28,90±4,87	25,52±3,50	27,46±4,15	27,35±3,94	27,77±3,05	0,234
% de gordura	39,93±6,44	40,17±6,45	35,20±7,46	37,69±5,72	37,72±6,16	37,56±5,26	0,227
DMO L2-L4 (g/cm ²)	0,940±0,160	0,978±0,180	0,930±0,175	0,964±0,200	1,036±0,171	0,955±0,142	0,823
DMO colo (g/cm ²)	0,869±0,117	0,874±0,143	0,811±0,140	0,869±0,125	0,888±0,160	0,855±0,101	0,891
DMO ward (g/cm ²)	0,674±0,140	0,692±0,153	0,631±0,150	0,679±0,145	0,706±0,188	0,686±0,098	0,808

Onde: IA – Insuficientemente ativo; AT – ativos; IMC – índice de massa corporal; DMO – densidade mineral óssea

valor de p para interação entre atividade física e polimorfismo VDR

* *Bb*-AT > *bb*-AT; *Bb*-IA

4.5.4. *Cdx-2*

Os resultados com relação ao polimorfismo *Cdx-2* estão apresentados na tabela 06. A frequência do alelo *Cdx-G* foi 0,652, e a do alelo *Cdx-A* foi 0,348. A distribuição dos genótipos foi: *Cdx-A/A* 41,6%; *Cdx-G/A* 45,8% e *Cdx-A/A* 12,6%.

Quando considerados independentemente do padrão de atividade física, não houve relação entre os polimorfismos *Cdx-2* e DMO no colo do fêmur [$f(2,190) = 0,630$, $p = 0,533$], triângulo de Ward [$f(2,190) = 0,055$, $p = 0,946$] e coluna lombar [$f(2,189) = 0,758$, $p = 0,470$].

A ANCOVA não mostrou interação significativa entre os polimorfismos *Cdx-2* e o nível de atividade física para DMO da coluna lombar [$f(2,189) = 0,354$, $p = 0,702$]. Entretanto, a interação entre os polimorfismos *Cdx-2* e o nível de atividade física foi significativa para triângulo de Ward [$f(2,190) = 3,068$, $p = 0,049$] e colo do fêmur [$f(2,190) = 3,411$, $p = 0,035$]. As comparações entre os níveis de atividade física revelaram que os portadores do genótipo *Cdx-G/G* no grupo AT possuíam maior DMO em relação a portadores do mesmo genótipo

classificados como IA. Tais diferenças não ocorreram nos portadores dos genótipos Cdx-G/A e Cdx-A/A.

Tabela 06: Características da amostra de acordo com o genótipo Cdx-2 e o nível de atividade física

	IA			AT			p#
	Cdx-G/G	Cdx-G/A	Cdx-A/A	Cdx-G/G	Cdx-G/A	Cdx-A/A	
N	28	37	10	51	50	14	
Idade (anos)	66,71±5,25	66,71±5,08	65,80±3,26	66,00±4,49	66,57±6,00	68,85±4,06	0,244
Massa corporal (kg)	63,21±9,62	65,88±13,38	68,80±15,80	63,11±11,43	66,48±9,72	57,62±9,87	0,11
Estatura (cm)	151,21±6,28	152,38±5,43	150,60±5,48	151,98±7,35	152,71±5,47	150,77±8,20	0,947
IMC (g/m ²)	27,61±3,60	28,32±5,18	30,14±5,81	27,24±4,01	28,48±3,68	25,28±3,27	0,09
% de gordura	40,09±6,33	37,81±7,02	41,30±8,32	37,41±5,43	39,15±5,44	34,77±7,28	0,051
DMO L2-L4 (g/cm ²)	0,912±0,173	0,980±0,165	1,008±0,214	0,977±0,152	0,998±0,206	0,997±0,212	0,702
DMO colo (g/cm ²)	0,831±0,097	0,892±0,124	0,863±0,181	0,891±0,137	0,868±0,125	0,831±0,160	0,035*
DMO ward (g/cm ²)	0,636±0,123	0,704±0,134	0,701±0,199	0,708±0,162	0,679±0,148	0,660±0,170	0,049*

Onde: IA – Insuficientemente ativo; AT – ativos; IMC – índice de massa corporal; DMO – densidade mineral óssea

valor de p para interação entre atividade física e polimorfismo VDR

* Cdx-G/G-AT > Cdx-G/G-IA

4.5.5. *FokI*

A frequência do alelo *F* foi de 0,652 e a do alelo *f* foi de 0,348. Com relação ao genótipo *FokI*, o polimorfismo *FF* estava presente em 41,6%, o *Ff* em 45,8% e o *ff* em 12,6% das participantes. Os resultados com relação ao polimorfismos *FokI* estão apresentados na tabela 07.

Os resultados da ANCOVA não mostraram relação entre os polimorfismos *FokI* e a DMO no colo do fêmur [$f(2,190) = 0,066$, $p = 0,936$], coluna lombar [$f(2,189) = 1,621$, $p = 0,201$] e triângulo de Ward [$f(2,190) = 0,516$, $p = 0,598$]

A interação entre os polimorfismos *FokI* e o nível de atividade física foi estatisticamente significativa para o colo do fêmur [$f(2,190) = 4,52$, $p = 0,012$] e triângulo de Ward [$f(2,190) = 6,612$, $p = 0,002$], mas não para coluna lombar [$f(2,189) = 0,202$, $p = 0,839$].

Comparações posteriores dentro dos polimorfismos *FokI* revelaram que portadores do genótipo *ff* classificados como AT apresentavam maior DMO no colo do fêmur e triângulo de

Ward em comparação com portadores do mesmo genótipo classificados como IA. Nos portadores dos genótipos *FF* e *Ff*, não houve diferença na DMO em nenhum dos locais avaliados entre indivíduos classificados como AT e IA.

As comparações realizadas dentro dos grupos AT e IA separadamente mostraram que não havia diferença na DMO do colo do fêmur e triângulo de Ward entre os genótipos *FokI* dentro do grupo IA. Entretanto, no grupo AT as diferenças foram significativas em ambos os sítios. Comparações posteriores mostraram que os portadores do genótipo *ff* possuíam maior DMO no colo do fêmur e triângulo de Ward em comparação com o genótipo *FF*. Os portadores do *Ff* apresentaram valores intermediários, sendo significativamente menores em comparação com o genótipo *ff* no triângulo de Ward.

Tabela 07: Características da amostra de acordo com o genótipo *FokI* e o nível de atividade física

	IA			AT			p [#]
	<i>FF</i>	<i>Ff</i>	<i>ff</i>	<i>FF</i>	<i>Ff</i>	<i>ff</i>	
N	29	36	10	50	51	14	
Idade (anos)	66,56±3,66	66,71±5,30	66,11±6,49	66,64±5,84	66,40±4,77	67,73±4,08	0,925
Massa corporal (kg)	61,04±8,50	68,12±13,00	67,00±17,54	65,07±11,96	62,76±10,18	62,09±7,83	0,171
Estatura (cm)	151,04±5,36	152,18±5,37	151,78±8,12	153,29±5,64	150,87±7,35	152,00±7,16	0,314
IMC (g/m ²)	26,81±3,82	29,30±4,77	28,92±6,52	27,59±4,28	27,51±3,51	27,02±3,99	0,415
% de gordura	38,07±7,61	40,18±6,20	38,09±7,90	37,77±6,24	37,94±5,51	37,14±5,71	0,83
DMO L2-L4 (g/cm ²)	0,978±0,193	0,951±0,164	0,943±0,191	1,010±0,180	0,984±0,142	0,913±0,298	0,839
DMO colo (g/cm ²)	0,874±0,109	0,870±0,137	0,829±0,138	0,859±0,130	0,880±0,129	0,902±0,187	0,012*
DMO ward (g/cm ²)	0,696±0,130	0,678±0,152	0,641±0,149	0,665±0,141	0,693±0,150	0,768±0,225	0,002**

Onde: IA – Insuficientemente ativo; AT – ativos; IMC – índice de massa corporal; DMO – densidade mineral óssea.

valor de p para interação entre atividade física e polimorfismo VDR

* *ff*-AT > *ff*-IA; *FF*-AT e ***ff*-AT > *ff*-IA; *FF*-AT, *Ff*-AT

5. DISCUSSÃO

Desde o início dos estudos sobre a relação entre DMO e polimorfismos no gene VDR, tem sido comum o surgimento de controvérsias. Com relação aos polimorfismos na região não 3', os resultados positivos para os alelos *a*, *b* e *T* (MORRISON *et al.*, 1994; HOWARD *et al.*, 1995; GEUSENS *et al.*, 1997; KIEL *et al.*, 1997; VANDEVYVER *et al.*, 1997; GENNARI *et al.*, 1998; GOMEZ ALONSO *et al.*, 1998; KIEL *et al.*, 1997; LARAZZETI CASTRO *et al.*, 1997; FERRARI *et al.*, 1998; MCGUICAN *et al.*, 2002) foram contrapostos por resultados não significativos (LOONEY *et al.*, 1995; JORGENSEN *et al.*, 1996; GRAAFMANS *et al.*, 1997; ZMUDA *et al.*, 1997; TSURITANI *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2001; ZAJICKOVA *et al.*, 2002; WILLING *et al.*, 1998; QYN *et al.*, 2004) e por estudos com resultados contrários aos achados iniciais (HOUSTON *et al.*, 1996; UITTERLINDEN *et al.*, 1996; RUBIN *et al.*, 1999; BELL *et al.*, 2001; BLANCHET *et al.*, 2002; TOFTENG *et al.*, 2002).

O presente estudo não encontrou diferenças na DMO em nenhum dos sítios estudados entre os diferentes genótipos da região 3' (*BsmI*, *ApaI* e *TaqI*). Apesar de não confirmar os achados iniciais de Morrison *et al.* (1994) e de alguns estudos realizados em mulheres pós-menopausa (HOWARD *et al.*, 1995; GEUSENS *et al.*, 1997; KIEL *et al.*, 1997; VANDEVYVER *et al.*, 1997; GENNARI *et al.*, 1998; GOMEZ ALONSO *et al.*, 1998), os resultados estão de acordo com a maior parte da literatura revisada (LOONEY *et al.*, 1995; JORGENSEN *et al.*, 1996; GRAAFMANS *et al.*, 1997; ZMUDA *et al.*, 1997; TSURITANI *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2001; ZAJICKOVA *et al.*, 2002).

Os estudos sobre a interação entre polimorfismos na região não traduzida 3' e atividades físicas na determinação da DMO mostram resultados controversos. Em um estudo transversal,

Blanchet *et al.* (2002) investigaram a interação entre a prática de atividade física no tempo livre e os polimorfismos *BsmI* na modulação da DMO da coluna lombar e colo do fêmur em 575 mulheres no período pós-menopausa. De acordo com os resultados, mulheres ativas com o genótipo *bb* apresentavam menor DMO na coluna lombar em comparação com mulheres ativas portadoras dos genótipos *BB* e *Bb*. Em contraste ao estudo de Blanchet *et al.* (2002), Tsuritani *et al.* (1998) realizaram um estudo com 69 mulheres caucasianas no período pós-menopausa e verificaram que, após um ano de caminhadas, as mudanças na DMO da coluna lombar em comparação com o grupo controle foram significativamente diferentes apenas no genótipo *bb*.

Kitagawa *et al.* (2001) estudaram a inter-relação entre a realização habitual de atividade física e o polimorfismo no gene *VDR* na determinação da DMO do antebraço de 120 jovens japonesas (idade de 18 a 19 anos). Na comparação com a análise por *ApaI*, os autores verificaram que os efeitos da atividade física foram significativos no genótipo *aa*, mas não no genótipo *Aa*. Quando se analisou o polimorfismo por meio da *TaqI*, foi verificado que a atividade física exercia efeitos mais significativos na DMO em portadores do genótipo *TT*, em comparação com *Tt*.

O presente estudo, não encontrou interação entre nenhum dos genótipos da região não traduzida 3' e os níveis de atividade física na determinação da DMO, se aproximando dos trabalhos de Jarvinen *et al.* (1998) e Rabbon-Stitth *et al.* (2005). Jarvinen *et al.* (1998), não observaram diferenças significativas nos ganhos de DMO entre os genótipos *BsmI* em 35 mulheres caucasianas no período pré-menopausa submetidas a um programa de 18 meses de atividade física de alto impacto. De modo similar, Rabbon-Stith *et al.* (2005) não encontraram diferenças nas respostas da DMO entre os genótipos *BsmI*, ao avaliar idosos submetidos a treinamento de força ou exercícios aeróbios.

A ausência de efeito dos polimorfismos da região 3' é fisiologicamente justificável, pois, os diferentes genótipos não apresentam alterações funcionais. Os polimorfismos *BsmI* e *ApaI* se encontram em introns, portanto, as alterações genéticas não são transmitidas à proteína. Por outro lado, apesar de o polimorfismo *TaqI* ser localizado em uma região traduzida (exon 9), a troca da Timina por Cistina não altera o aminoácido a ser sintetizado, pois tanto os códons ATT quanto ATC são relativos à Isoleucina, portanto não há alteração estrutural na proteína sintetizada. É possível que os resultados significativos encontrados em estudos anteriores sejam devidos às interferências de outros fatores, como genes em desequilíbrio de ligação ou diferenças em fatores ambientais, como alimentação e tabagismo.

O presente estudo traz o primeiro relato conhecido da distribuição do polimorfismo Cdx-2 na população brasileira, a distribuição (Cdx-A/A 41,6%; Cdx-G/A 45,8% e Cdx-A/A 12,6%) está próxima à encontrada em mulheres japonesas por Morita *et al.* (2005), no entanto, se diferencia da distribuição relatada por Fang *et al.* (2003) em outras populações.

De acordo com os resultados do presente estudo, os polimorfismos Cdx-2 não influenciaram a DMO em nenhum dos sítios analisados, o que está de acordo com os estudos de Fang *et al.* (2003) e Morita *et al.* (2005) e contrário aos resultados de Arai *et al.* (2001). O estudo de Fang *et al.* (2003) envolveu 2.848 sujeitos de ambos os sexos e não encontrou diferenças na DMO entre os genótipos Cdx-2. Resultados similares foram reportados por Morita *et al.* (2005) ao avaliar 1.340 mulheres japonesas. Em um estudo anterior, Arai *et al.* (2001) encontraram maior DMO na coluna lombar para portadoras do genótipo Cdx-A/A apenas em mulheres no período pós-menopausa (n = 55), o que levou os autores a sugerirem que o polimorfismo Cdx-2 influenciaria os níveis de VDR somente em casos de deficiência de estrogênio. O presente estudo não tem como verificar esta hipótese por não ter analisado os níveis de estrogênio, no entanto, a

amostra foi composta apenas por mulheres no período pós-menopausa e os resultados foram ajustados pelo status de reposição hormonal, o que pode ter reduzido tal interação.

Com relação à atividade física, em um estudo com 1.652 mulheres japonesas no período pós-menopausa, Morita *et al.* (2005) verificaram que a interação entre o histórico de atividade física e a DMO (coluna lombar e colo do fêmur) foi significativa apenas em portadoras do genótipo Cdx-G/G. O presente estudo confirma estes achados na amostra estudada. As comparações entre os níveis de atividade física revelaram que os portadores do genótipo Cdx-G/G classificados como AT possuíam maior DMO no colo do fêmur e triângulo de Ward em comparação com portadores do mesmo genótipo classificados como IA. Tais diferenças não ocorreram em portadores dos genótipos Cdx-G/A e Cdx-A/A. Estes resultados sugerem que o genótipo Cdx-G/G esteja associado a melhores respostas da DMO à atividade física.

O resultado se mostra contrário à proposta inicial de Arai *et al.* (2001), o qual sugere maior atividade transcricional para o alelo Cdx-A. No entanto, mesmo que tal diferença funcional seja confirmada, é possível que ela não tenha relevância para o aumento da DMO, como será discutido adiante.

A distribuição dos genótipos *FokI* na amostra estudada está próxima à encontrada em estudos anteriores em caucasianos e populações miscigenadas (GROSS *et al.*, 1996; ECCLESHALL *et al.*, 1998; AMES *et al.*, 1999; BANDRÉS *et al.*, 2005), e difere da encontrada em orientais, nos quais as proporções de *ff* normalmente são mais baixas (ARAI *et al.*, 1997; TAJIMA *et al.* 2000). Os resultados também são diferentes dos obtidos em negros, os quais possuem incidência mais baixa de *ff* (AMES *et al.*, 1999; HARRIS *et al.*, 1997).

Os estudos iniciais sobre o polimorfismo no códon de iniciação da tradução mostraram um favorecimento para o alelo *F* (GROSS *et al.*, 1996; ARAI *et al.*, 1997; HARRIS *et al.*, 1997;

AMES *et al.*, 1999; GENNARI *et al.*, 1999, TOFTENG *et al.*, 2002; ZAJICKOVA *et al.*, 2002), no entanto uma série de outros estudos não encontrou resultados significativos (ZMUDA *et al.*, 1997; ECCLESHALL *et al.*, 1998; FERRARI *et al.*, 1998; SOWERS *et al.*, 1999 ; NAKAMURA *et al.*, 2002; TAJIMA *et al.*, 2000; RABON-STITH *et al.*, 2005).

A ausência de diferenças na DMO entre os diferentes genótipos para a amostra estudada está de acordo com alguns estudos que avaliaram mulheres no período pós-menopausa (ZMUDA *et al.*, 1997; RAPURI *et al.*, 2004), mas em conflito com outros (GROSS *et al.*, 1996; GENNARI *et al.*, 1999, TOFTENG *et al.*, 2002; ZAJICKOVA *et al.*, 2002; ; BANDRÉS *et al.*, 2005).

No presente estudo, as análises do polimorfismo *FokI* e do padrão de atividade física revelaram que a DMO no colo do fêmur e triângulo de Ward dependem da interação dos dois fatores. Os resultados revelaram diferenças significativas entre os genótipos apenas no grupo AT, no qual o genótipo *ff* estava associado a maiores valores de DMO no colo do fêmur e triângulo de Ward. Adicionalmente, análises posteriores revelaram que a DMO no colo do fêmur e triângulo de Ward foram maiores no grupo AT em comparação com o grupo IA apenas em portadoras do genótipo *ff*.

Na literatura revisada, não foram observadas evidências conclusivas com relação ao efeito da interação entre polimorfismos *FokI* e prática de atividades físicas na DMO e metabolismo ósseo. Apesar de alguns autores sugeriram favorecimento para o alelo *F* (TAJIMA *et al.* 2000; NAKAMURA *et al.*, 2002; RABON-STITH *et al.*, 2005), uma análise detalhada dos estudos mostra que as sugestões iniciais devem ser analisadas com cautela.

Tajima *et al.* (2000) investigaram a interação entre o polimorfismo *FokI* e o treinamento resistido no metabolismo ósseo de jovens japoneses (idade entre 18 e 31 anos). A amostra foi dividida em três grupos: 1) portadores do genótipo *FF* praticando treinamento resistido (n = 10), 2) portadores do alelo *f* praticando treinamento resistido (7 *Ff* + 3 *ff*) e 3) grupo controle (8 *FF* e

6 *Ff*). A análise da interação entre polimorfismo *FokI* e exercícios não revelou diferenças nos marcadores de metabolismo ósseo entre os grupos, no entanto, os autores sugerem favorecimento do alelo *F* com base em uma tendência de maior excreção urinária de NTx para portadores do genótipo *FF*.

Posteriormente, Nakamura *et al.* (2002) compararam fenótipos ósseos de jovens japoneses atletas e sedentários em relação ao genótipo VDR. Devido à baixa incidência do genótipo *ff*, as comparações foram realizadas entre *FF* e *Ff*. No estudo foi constatada interação significativa entre o estado de treinamento e o polimorfismo *FokI* no conteúdo mineral ósseo e na massa óssea, com favorecimento do genótipo *FF* apenas em atletas. Entretanto, as análises de variância não detectaram interação entre o polimorfismo *FokI* e o estado de treinamento para determinação da DMO.

Os estudos de Tajima *et al.* (2000) e Nakamura *et al.* (2002), são limitados devido ao pequeno número de sujeitos na amostra, a idade reduzida dos participantes e baixa frequência do genótipo *ff*, o que não permitiu inserir esta variação nas análises. Além disso, os resultados não mostraram significância estatística para o metabolismo ósseo ou DMO. Algumas destas limitações foram parcialmente sanadas em um estudo posterior de Rabbon-Stith *et al.* (2005).

Para determinar a influência do genótipo VDR na resposta da DMO ao exercício, Rabbon-Stith *et al.* (2005) estudaram 123 homens e mulheres saudáveis (50-81 anos) antes e após 5-6 meses de treinamento resistido ou aeróbio. De acordo com os resultados, o polimorfismo *FokI* não foi significativamente associado às mudanças na DMO induzidas pelos exercícios. Os resultados mostraram que os heterozigotos *Ff* praticantes de treino resistido apresentavam tendência de maiores respostas na DMO do fêmur em comparação com os homozigotos *ff*, mas os valores não atingiram significância ($p = 0,058$). Adicionalmente, os resultados do estudo de Rabbon-Stith *et al.* (2005) não permitem a sugestão de um efeito alelo-dependente, pois, o

genótipo *FF* não mostrou favorecimento em relação ao *ff*. Ao analisar a DMO no triângulo de Ward, por exemplo, observa-se uma queda não significativa para o genótipo *FF*, enquanto que houve aumento não significativo para os grupos *Ff* e *ff*.

Deste modo, analisando os dados acima de maneira mais criteriosa sugere-se que não é possível afirmar de forma conclusiva a existência de uma influência positiva do alelo *F* na resposta da DMO à atividade física a partir da literatura revisada.

A causa das controvérsias entre os resultados do presente estudo com a sugestão de outros envolvendo atividades físicas pode estar associada às características da amostra. Os estudos de Tajima *et al.* (2000) e Nakamura *et al.* (2002) foram realizados com homens jovens, portanto, o estado hormonal pode ter influenciado os resultados. Nesse sentido, Laaksonen *et al.* (2004) verificaram que os polimorfismos *FokI* estão associados à DMO em adolescentes finlandeses do sexo masculino, mas não feminino, o que sugere uma interação com o hormônio sexual masculino.

A própria relevância funcional do polimorfismo *FokI* é fruto de controvérsia em estudos *in vitro*. Os achados iniciais de Arai *et al.* (1997) indicaram que o polimorfismo teria repercussão funcional, com melhores respostas fisiológicas para o alelo *F*, estes resultados foram confirmados por Colin *et al.* (2000) e Jurutka *et al.* (2000), no entanto, Gross *et al.* (1998) e Whitfield *et al.* (2001) não encontraram diferenças funcionais entre os alelos *F* e *f*.

Ainda com relação às conseqüências fisiológicas do polimorfismo *FokI*, estudos em humanos revelaram maior absorção de cálcio com a presença do genótipo *FF*, entretanto, a deposição de cálcio nos ossos não se apresentou diferente entre os genótipos (AMES *et al.*, 1999; ABRAMS *et al.*, 2005), levando à conclusão de que a atuação do VDR seria relacionada à absorção de cálcio no intestino e não necessariamente à sua mineralização. Esta conclusão também pode ser estendida ao polimorfismo *Cdx-2*, tendo em vista que as alterações seriam

específicas em um fator de ligação localizado no intestino. Estudos em animais sugerem que o VDR não é essencial ao metabolismo ósseo (LI *et al.*, 1998; AMLING *et al.*, 1999), o que traz a hipótese de que na sua ausência outras moléculas reguladoras são acionadas para manter a homeostase do esqueleto. Existem, inclusive, resultados controversos, como os obtidos recentemente por Sooy *et al.* (2005), os quais sugerem que o VDR é um inibidor da atividade dos osteoblastos e, portanto, pode ter um efeito negativo no metabolismo ósseo.

Outra hipótese para os resultados do presente estudo pode ser obtida de Salamone *et al.* (1996) e Kitagawa *et al.* (2001), os quais sugerem que a atividade física e o VDR atuem em sentido inverso, de modo que os genótipos relacionados à menor DMO estejam associados às melhores respostas à atividade física. A análise dos resultados do presente estudo mostra uma tendência nesse sentido para os polimorfismos Cdx-2 e *FokI*, como pode ser visto nas tabelas 06 e 07.

Diferenças étnicas também podem ter influenciado os resultados. De acordo com Massart (2005), ocorrem diferenças na sensibilidade à vitamina D entre diferentes etnias, sendo os orientais melhores respondedores, pois, este grupo apresenta alterações positivas na DMO com baixas doses de vitamina D. Como a maioria dos estudos que sugerem interação positiva alelo *F* e exercício (TAJIMA *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2002) e o estudo que sugere efeitos positivos do alelo Cdx-A na DMO (ARAI *et al.*, 2001) foram conduzidos em japoneses, há possibilidade das diferenças terem origens étnicas.

Adicionalmente, os resultados podem ter sido influenciados pela notória miscigenação da população brasileira. A análise baseada na cor da pele reportada pelo participante, para a população brasileira pode não predizer com precisão o nível de ancestralidade genômica individual. Portanto, as análises podem ter englobado traços de ancestralidade desconhecidos que interferem nos resultados. É recomendável que estudos posteriores usem marcadores de

ancestralidade para controlar os efeitos do arcabouço genético relacionado à descendência para avaliar os efeitos dos diferentes polimorfismos com mais precisão.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que nenhum dos polimorfismos estudados está associado à DMO em mulheres idosas brasileiras quando analisados independentemente do padrão de atividade física. A análise com relação ao padrão de atividade física mostrou interação entre os níveis de atividade físicas e os polimorfismos *FokI* e *Cdx-2*, trazendo a hipótese que os alelos *f* e *Cdx-A* estejam associados a melhores respostas de DMO no colo do fêmur e triângulo de Ward. No entanto, são necessárias pesquisas que abordem o papel do VDR no sistema de mecanotransdução para se compreender a interação entre gene e a atividade física com mais precisão. Deste modo, o presente estudo reforça a idéia que os polimorfismos no gene VDR podem ter um papel importante no mecanismo da adaptação do osso à atividade física, em vez de ser um determinante da DMO por si só.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS SA, GRIFFIN IJ, HAWTHORNE KM, CHEN Z, GUNN SK, WILDE M, DARLINGTON G, SHYPAILO RJ, ELLIS KJ. Vitamin D receptor FokI polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty. *Journal of Bone Mineral Research*. Vol.20 n°6 pp:945-53, 2005.

ALROY, I., T. L. TOWERS, AND L. P. FREEDMAN. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Molecular Cellular Biology*. Vol.15 n°10 pp: 5789–5799, 1995.

AMES SK, ELLIS KJ, GUNN SK, COPELAND KC, AND ABRAMS SA. Vitamin D receptor gene FokI polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children. *Journal of Bone Mineral Research* Vol.14 n°5 pp:740–746, 1999.

AMLING M, PRIEMEL M, HOLZMANN T, CHAPIN K, RUEGER JM, BARON R, DEMAY MB. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: Formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology*. Vol.140 pp:4982–4987, 1999.

ANDREOLI A, MONTELEONE M, VAN LOAN, M, PROMENZO L, TARANTINO U, DE LOZENDO, A. Effect of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol.33 n°4 pp:507-511, 2001.

ARAI H, MIYAMOTO K, TAKETANI Y, YAMAMOTO H, IEMORI Y, MORITA K, TONAI T, NISHISHO T, MORI S, TAKEDA E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.12 n°6 pp:915-921, 1997.

ARAI H, MIYAMOTO K, YOSHIDA M, YAMAMOTO H, TAKETANI Y, MORITA K, KUBOTA M, YOSHIDA S, IKEDA M, WATABE F, KANEMASA Y, TAKEDA E. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.16 n°7 pp:1256-1264, 2001.

ARDEN NK & SPECTOR TD. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.12 n°12 pp:2076-2081, 1997.

ARDEN NK, BAKER J, HOGG C, BAAN K, SPECTOR TD. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *Journal of Bone Mineral Research* Vol.11 n°4 pp:530–534, 1996

AUDÍ L, CARCÍA-RAMÍREZ M, CARRASCOSA A. Genetic determinants of bone mass. *Hormone Research*. Vol.51 n°3 pp:105-23, 1999.

BAKER AR, MCDONNELL DP, HUGHES M, CRISP TM, MANGELSDORF DJ, HAUSSLER MR, PIKE JW, SHINE J, O'MALLEY BW. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. Vol.85 n°10 pp:3294-8. 1988

BANDRES E, POMBO I, GONZALEZ-HUARRIZ M, REBOLLO A, LOPEZ G, GARCIA-FONCILLAS J. Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ERalpha, COL1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women. *Journal of Endocrinological Investigation*. Vol.28 n°4 pp:312-21, 2005.

BELL NH, MORRISON NA, NGUYEN TV, EISMAN J, HOLLIS BW. ApaI polymorphisms of the vitamin D receptor predict bone density of the lumbar spine and not racial difference in bone density in young men. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Vol.137 n°2 pp:133-40, 2001.

BLANCHET C, GIUGUERE Y, PRUD'HOMME D, DUMONT M, ROUSSEAU F, DODIN S. Association of physical activity and bone: influence of vitamin D receptor genotype. *Medicine and Science in Sports and Exercicse*. Vol.34 n.1 pp:24-31, 2002.

BLOCK JE. Interpreting studies of exercise and osteoporosis: a call for rigor. *Controlled Clinical Trials*. Vol.18 n°1 pp:54-7, 1997.

BOLU SE, ORKUNOGLU SUER FE, DENIZ F, UCKAYA G, IMIRZALIOGLU N, KUTLU M. The vitamin D receptor fokI start codon polymorphism and bone mineral density in male hypogonadotrophic hypogonadism. *Journal of Endocrinological Investigation*. Vol.28 n°9 pp:810-4, 2005.

BRAY MS. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. *Journal of Applied Physiology*. Vol.88 n°2 pp:787-792, 2000.

BROWN MA, HAUGHTON MA, GRANT SF, GUNNELL AS, HENDERSON NK & EISMAN JA. Genetic control of bone density and turnover: role of the collagen 1 alpha 1, estrogen receptor, and vitamin D receptor genes. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.16 n°4 pp:758-764, 2001

CARDON LR, GARNER C, BENNETT ST, MACKAY IJ, EDWARDS RM, CORNISH J, HEGDE M, MURRAY MA, REID IR, CUNDY T. Evidence for a major gene for bone mineral density in idiopathic osteoporotic families. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.15 n°6 pp:1132-1137, 2000.

CHANDLER JM, ZIMMERMAN SI, GIRMAN CJ, MARTIN AR, HAWKES W, HEBEL JR, SLOANE PD, HOLDER L, MAGAZINER J. Low bone mineral density and risk of fracture in white female nursing home residents. *JAMA*. Vol.284 n°8 pp:972-977, 2000.

CHOI YM, JUN JK, CHOE J, HWANG D, PARK SH, KU SY, KANG D, KIM JG, MOON SY, LEE JY. Association of the vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Journal of Human Genetics*. Vol.45 n°5 pp:280-283, 2000.

COLIN EM, WEEL AE, UITTERLINDEN AG, BUURMAN CJ, BIRKENHAGER JC, POLS HA, VAN LEEUWEN JP. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Clinical Endocrinology (Oxford)*. Vol.2 n°2 pp:211-6, 2000.

COLLINS-SCHRAMM HE, PHILLIPS CM, OPERARIO DJ, LEE JS, WEBER JL, HANSON RL, KNOWLER WC, COOPER R, LI H, SELDIN MF. Ethnic-difference markers for use in mapping by admixture linkage disequilibrium. *American Journal of Human Genetics*. Vol.70 n°3 pp:737-50, 2002.

COMPSTON JE. Sex steroids and bone. *Physiological Reviews*. Vol.81 n°1 pp:419-447, 2001.

COUPLAND CA, CLIFFE, SJ, BASSEY EJ, GRAINGE MJ, HOSKING DJ, CHILVERS CE. Habitual physical activity and bone mineral density in postmenopausal women in England. *International Journal of Epidemiology*. Vol.28 n°02, pp:241-246, 1999

CRAIG CL, MARSHALL AL, SJOSTROM M, BAUMAN AE, BOOTH ML, AINSWORTH BE, PRATT M, EKELUND U, YNGVE A, SALLIS JF, OJA P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol.35 n.8 pp:1381-1395, 2003.

CUMMINGS SR, BLACK DM, NEVITT MC, BROWNER W, CAULEY J, ENSRUD K, GENANT HK, PALERMO L, SCOTT J, VOGT TM. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. *Lancet*. Vol.341 n° 8837 pp:72-75, 1993

CUMMINGS SR. Risk factors for hip fractures in white women. *New England Journal of Medicine*. Vol.332 n°12 pp:767-73, 1995.

D'IPPOLITO G, SCHILLER PC, RICORDI C, ROOS BA, HOWARD GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.14 n°7 pp:1115-1122, 1999.

DAWSON-HUGHES B, HARRIS SS, FINNERAN S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.80 n°12 pp:3657-3661, 1995.

DE LAET CE, VAN HOUT BA, BURGER H, HOFMAN A, POLS HA. Bone density and risk of hip fracture in men and women: cross sectional analysis. *British Medical Journal*. Vol.315 n°7102 pp:221-225, 1997.

DEMAY MB, GERARDI JM, DELUCA HF, KRONENBERG HM. DNA sequences in the rat osteocalcin gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and confer responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. Vol.87 n°1 pp:369-373, 1990.

DEMAY MB, KIERNAN MS, DELUCA HF, KRONENBERG HM. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. Vol.89 n°17 pp:8097-101, 1992.

DENG HW, CHEN WM, CONWAY T, ZHOU Y, DAVIES KM, STEGMAN MR, DENG H, RECKER RR. Determination of bone mineral density of the hip and spine in human pedigrees by genetic and life-style factors. *Genetic Epidemiology*. Vol.19 pp:160-177, 2000.

DENG HW, LIVSHITS G, YAKOVENKO K, XU FH, CONWAY T, DAVIES KM, DENG H, RECKER RR. Evidence for a major gene for bone mineral density/content in human pedigrees identified via probands with extreme bone mineral density. *Annals of Human Genetic*. Vol.66 n°1 (Pt 1) pp:61-74, 2002a.

DENG HW, XU FH, HUANG QY, SHEN H, DENG H, CONWAY T, LIU YJ, LIU YZ, LI JL, ZHANG HT, DAVIES KM, RECKER RR. A whole-genome linkage scan suggests several genomic regions potentially containing quantitative trait Loci for osteoporosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.87 n°11 pp:5151-9, 2002b.

DEQUECKER J, NIJS J, VERSTRAETEN A, GEUSENS P, GEVERS G. Genetic determinants of bone mineral content at the spine and radius: a twin study. *Bone* Vol.8 n.4 pp:207–209, 1987.

DOUROUDIS K, TARASSI K, IONNIDIS G, GIANNAKOPOULOS F, MOUTSATSOU P, THALASSINOS N, PAPASTERIADES C. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women o Hellenic oringin. *Maturitas*. Vol.45 n°3 pp:191-197, 2003

DUNCAN RL, TURNER CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcified Tissue International*. Vol.57 n°5 pp:344-58, 1995.

DURRIN LK, HAILE RW, INGLES SA, COETZEE GA. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta*. Vol.1453 n°3 pp:311-20, 1999.

ECCLESHALL TR, GARNERO P, GROSS C, DELMAS PD, FELDMAN D. Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: the OFLY study. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.13 n°1 pp:31-35, 1998

ERBEN RG. Vitamin D analogs and bone. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interaction*. Vol.2 n°1 pp:59-69, 2001.

EVANS RA, MAREL GM, LANCASTER EK, KOS S, EVANS M, WONG SYP. Bone mass is low in relatives of osteoporotic patients. *Annals of Internal Medicine*. Vol.109 pp:870-873, 1988

FANG Y, VAN MEURS JBJ, BERGINK A, HOFMAN A, VAN DUJIN CM, VAN LEEUWEN JPTM, POLS HAP, UTTERLINDEN AG. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.18 n°9 pp:1632-1641, 2003.

FERRARI S, MANEN D, BONJOUR JP, SLOSMAN D, RIZZOLI R. Bone mineral mass and calcium and phosphate metabolism in young men: relationships with vitamin D receptor allelic polymorphisms. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.84 n°6 pp:2043-2048, 1999.

FERRARI S, RIZZOLI R, SLOSMAN D, BONJOUR JP. Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphisms? *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.13 n°3 pp:363-370, 1998.

FESKANICH D, WILLETT W, COLDITZ G. Walking and leisure-time activity and risk of hip fracture in postmenopausal women. *JAMA*. Vol.288 n°18 pp:2300-2306, 2002.

FLICKER L, HOPPER JL, RODGERS L, KAYMAKCI B, GREEN RM, WARK JD. Bone density determinants in elderly women: a twin study. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.10 n°11 pp:1607-1613, 1995.

GALLAGHER JC, RIGGS BL. Action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on calcium balance and bone turnover and its effect on vertebral fracture rate. *Metabolism*. Vol.39 n°4 (Supplementum 1) pp:30-4, 1990.

GENNARI L, BECHERINI L, MANSANI R, MASI L, FALCHETTI A, MORELLI A, COLLI, GONNELLI S, CEPOLLARO C, BRANDI ML. FokI polymorphism at translation initiation site of the vitamin d receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.14 n°8 pp:1379-1386, 1999

GENNARI L, BECHERINI L, MANSANI R, MASI L, MANSANI R, GONNELLI S, CEPOLLARO C, MARTINI S, MOTAGNANI A, LENTINI G, BECORPI AM, BRANDI ML. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.83 n°3 pp:939-944, 1998.

GEUSENS P, VANDEVYVER C, VANHOOF J, CASSIMAN JJ, BOONEN S, RAUS J. Quadriceps and grip strength are related to vitamin D receptor genotype in elderly nonobese women. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.12 n°12 pp:2082-2088, 1997.

GOMEZ ALONSO C, NAVES DIÁZ ML, DIÁZO-CORTE C, FERNANDEZ MARTIN JL, CANNATA ANDIA JB. Vitamin d receptor (VDR) gene polymorphisms: effects on bone mass,

bone loss and parathyroid regulation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. Vol.13 Supplementum 3 pp:73-77, 1998.

GRAAFMANS WC, LIPS P, OOMS ME, VAN LEEUWEN JPTM, POLS HAP, UITTERLINDEN AG. The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptor genotype. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.12 n°8 pp:1241–1245, 1997.

GROSS C, ECCLESHALL TR, MALLOY PJ, VILLA ML, MARCUS R, AND FELDMAN D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *Journal of Bone Mineral Research*. Vol.11 n°12 pp:1850–1855, 1996.

GROSS C, KRISHNAN AV, MALLOY PJ, ECCLESHALL TR, ZHAO XY, FELDMAN D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *Journal of Bone Mineral Research*. Vol.13 n°11 pp:1691-9, 1998.

GUEGUEN R, JOUANNY P, GUILLEMIN F, KUNTZ C, POUREL J, SIEST G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *Journal of Bone Mineral Research* Vol.10 n°12 pp:2017–2022, 1995

GUNNES M, BERG JP, HALSE J, LEHMANN EH. Lack of relationship between vitamin D receptor genotype and forearm bone gain in healthy children, adolescents, and young adults. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.82 n°3 pp:851-5, 1997.

GUYTON,AC & HALL, JE. *Textbook of Medical Physiology*.10ª edição. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000.

HALLAL PC, VICTORA CG, WELLS JC, LIMA RC. Physical inactivity: prevalence and associated variables in Brazilian adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol.35 n°11 pp:1894-900, 2003.

HANNAH SS, NORMAN AW. 1, 25(OH)₂ vitamin D₃-regulated expression of the eukaryotic genome. *Nutrition Reviews*. Vol.52 n°11 pp:376–382, 1994.

HARRIS SS, ECCLESHALL TR, GROSS C, DAWSON-HUGHES B, FELDMAN D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.12 n°7 pp:1043-1048, 1997

HAUSSLER, MR, WHITFIELD GK, HAUSSLER CA, HSIEH JC, THOMPSON PD, SELZNICK SH, ENCIANS DOMINGUEZ C, AND JURUTKA PW. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.13 n°3 pp:325-349, 1998

HOUSTON LA, GRANT SF, REID DM & RALSTON SH. Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population. *Bone*. Vol.18 n°3 pp:249–252, 1996.

HOWARD G, NGUYEN T, MORRISON N, WATANABE T, SAMBROOK P, EISMAN J, KELLY PJ. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.80 n°9 pp:2800-2805, 1995.

JARVINEN TLN, JARVINEN TAH, SIEVANEN H, HEINONEN A, TANNER M, HUANG X-H, NENONEA A, ISOLA JJ, JARVINEN M, KANNUS. Vitamin D receptor alleles and bone's response to physical activity. *Calcified Tissue International*. Vol.62 n°5 pp:413-417, 1998.

JILKA RL, WEINSTEIN RS, TAKAHASHI K, PARFITT AM, MANOLAGAS SC. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *Journal of Clinical Investigation*. Vol.97 n°7 pp:1732–1740, 1996

JOHNELL O, KANIS JA. An estimate of the worldwide prevalence, mortality and disability associated with hip fracture. *Osteoporosis International*. Vol.15 pp:897-902, 2004.

JONES G, STRUGNELLS SA, DELUCA HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews*. Vol.78 n°4 pp:1193-1231, 1998.

JORGENSEN HL, SCHOLLER J, SAND JC, BJURING M, HASSAGER C, CHRISTIANSEN C. Relation of common allelic variation at vitamin D receptor locus to bone mineral density and postmenopausal bone loss: cross sectional and longitudinal population study. *British Medical Journal*. Vol.313 n°7057 pp:586-90, 1996.

JURUTKA PW, REMUS LS, WHITFIELD GK, THOMPSON PD, HSIEH JC, ZITZER H, TAVAKKOLI P, GALLIGAN MA, DANG HT, HAUSSLER CA, HAUSSLER MR. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Molecular Endocrinology*. Vol.14 n°3 pp:401-20, 2000

KANIS JA, MC CLOSKEY EV. Evaluation of the risk of hip fracture. *Bone*. Vol.18 (Supplement) pp:127-32S, 1996.

KELLEY GA. Exercise and regional bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analytic review of randomized trials. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*. Vol.77 n°1 pp:76-87, 1998.

KHAN A, BILEZIKIAN J. Primary hyperparathyroidism: pathophysiology and impact on bone. *Canadian Medical Association Journal*. Vol.163 n°2 pp:184-7, 2000.

KIEL DP, MYERS RH, CUPPLES LA, KONG XF, ZHU XH, ORDOVAS J, SCHAEFER EJ, FELSON DT, RUSH D, WILSON PW, EISMAN JA, HOLICK MF. The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.12 n°7 pp:1049–1057, 1997.

KITAGAWA I, KITAGAWA Y, KAWASE Y, NAGAYA T, TOKUDOME S. Advanced onset of menarche and higher bone mineral density depending on vitamin D receptor gene polymorphism. *European Journal of Endocrinology*. Vol.139 n°5 pp:522-527, 1998.

KITAGAWA I, KITAGAWA Y, NAGAYA T, TOKUDOME S. Interplay of physical activity and vitamin D receptor gene polymorphism on bone mineral density. *Journal of Epidemiology*. Vol.11 n°5 pp:229-232, 2001.

KOLLER DL, ECONS MJ, MORIN PA, CHRISTIAN JC, HUI SL, PARRY P, CURRAN ME, RODRIGUEZ LA, CONNEALLY PM, JOSLYN G, PEACOCK M, JOHNSTON CC, FOROUD T. Genome screen for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.85 n°9 pp:3116-20, 2000.

KRALL EA, DAWSON-HUGHES B. Walking is related to bone density and rates of bone loss. *American Journal of Medicine*. Vol.96 n°1 pp:20-26, 1994.

KRALL EA; DAWSON-HUGHES B. Heritable and life-style factors determinants of bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.8 n°1 pp:1-9, 1993.

LAAKSONEN MM, KARKKAINEN MU, OUTILA TA, RITA HJ, LAMBERG-ALLARDT CJ. Vitamin D receptor gene start codon polymorphism (FokI) is associated with forearm bone mineral density and calcaneal ultrasound in Finnish adolescent boys but not in girls. *Journal of Bone Mineral Metabolism*. Vol.22 n°5 pp:479-485, 2004.

LACERDA, R. Osteoporosis – A growing health in Brasil. *Osteoporosis Action* vol.5 n°1, p:7, 2001.

LAZARETTI-CASTRO M, DUARTE DE OLIVEIRA MA, RUSSO EMK, VIEIRA JGH. Vitamin D receptor alleles and bone mineral density in a normal premenopausal Brazilian female population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol.30 n°8 pp:929-932, 1997.

LI YC, AMLING M, PIRRO AE, PRIEMEL M, MEUSE J, BARON R, DELLING G, DEMAY MB. Normalization of Mineral Ion Homeostasis by Dietary Means Prevents Hyperparathyroidism, Rickets, and Osteomalacia, But Not Alopecia in Vitamin D Receptor-Ablated Mice. *Endocrinology*. Vol.139 n°10 pp:4391-4396, 1998

LIU YZ, LIU YJ, RECKER RR, DENG HW. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *Journal of Endocrinology*. Vol.177 n°1 pp:147-196, 2003.

LIVSHITS G, DENG HW, NGUYEN TV, YAKOVENKO K, RECKER RR, EISMAN JA. Genetics of bone mineral density: evidence for a major pleiotropic effect from an intercontinental study. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.19 n°6 pp:914-923, 2004.

LIVSHITS G, KARASIK D, KOBLYANSKY E. Complex segregation analysis of the radiographic phalanges bone mineral density and their age-related changes. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.17 n°1 pp:152-61, 2002.

LIVSHITS G, KARASIK D, OTREMSKI I, KOBLYANSKY E. Genes play an important role in bone aging. *American Journal of Human Biology*. Vol.10 n°4 pp:421-429, 1998.

LIVSHITS G, KARASIK D, PAVLOVSKY O, KOBLYANSKY E. Segregation analysis reveals a major gene effect in compact and cancellous bone mineral density in 2 populations. *Human Biology*. Vol.71 n°2 pp:155-72, 1999.

LIVSHITS G, VAINDER M, PAVLOVSKY OM, AND KOBLYANSKY E Population biology of human aging: Ethnic and climatic variation of bone age scores. *Human Biology*. Vol.68 n°2 pp:293-314, 1996a.

LIVSHITS G, VAINDER M, PAVLOVSKY OM, AND KOBLYANSKY E. Population biology of human aging: Segregation analysis of bone aging characteristics. *Human Biology*. Vol.68 n°4 pp:540-554, 1996b.

LOONEY JE, YOON HK, FISCHER M, FARLEY SM, FARLEY JR, WERGEDAL JE, BAYLINK DJ. Lack of a high prevalence of the BB vitamin D receptor genotype in severely osteoporotic women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.80 n°7 pp:2158-62, 1995.

MANOLAGAS SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrinology Reviews*. Vol.21 n°2 pp:115-37, 2000.

MARQUES NETO, JF. *Campanha Nacional de Osteoporose*. São Paulo, Merc Sharp & Dohme, 2001.

MARSHALL D, JOHNNELL O, WEDEL H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *British Medical Journal*. Vol.312 n°7041 pp:1254-9, 1996.

MASSART F. Human races and pharmacogenomics of effective bone treatments. *Gynecological Endocrinology*. Vol.20 n°1 pp:36-44, 2005.

MATSUDO S, ARAÚJO T, MATSUDO V, ANDRADE D, ANDRADE E, OLIVEIRA LC, BRAGGION G. Questionário Internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde*. Vol.6 n.2 pp:05-18, 2001.

MATSUDO, SMM & MATSUDO, VKR. Osteoporose e atividade física. *Revista Brasileira de Ciência do Movimento*, Vol.05, nº3, pp 33-60, 1991.

MCGUIGAN FE, MURRAY L, GALLAGHER A, DAVEY-SMITH G, NEVILLE CE, VANT' HOF R, BOREHAM C, RALSTON SH. Genetic and environmental determinants of peak bone mass in young men and women. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.17 nº7 pp:1273-9, 2002.

MELTON LJ. Hip fractures: a worldwide problem today and tomorrow. *Bone*. Vol.14 (Supplement) pp:S1-8, 1993.

MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. Vol.16 p:1215, 1998.

MORITA A, IKI M, DOHI Y, IKEDA Y, KAGAMIMORI S, KAGAWA Y, YONESHIMA H. Effects of the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene and lifestyle factors on bone mineral density in a representative sample of Japanese women: the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study. *Calcified Tissue International*. Vol.77 nº6 pp:339-47, 2005.

MORRISON NA, YEOMAN R, KELLY PL, EISMAN JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. Vol.89 nº15 pp:6665-6669, 1992

MORRISON NA, QI JC, TOKITA A, KELLY PJ, CROFTS L, NGUYEN TV, SAMBROOK PN, AND EISMAN JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. Vol.367 nº6460 pp:284-287, 1994.

NAKAMURA O, ISHII T, ANDO Y, AMAGAI H, OTO M, IMAFUJI T, TOKUYAMA K. Potential role of Vitamin D receptor gene polymorphism in determining bone phenotype in young male athletes. *Journal of Applied Physiology*. Vol.283 nº12 pp:1973-1979, 2002.

NARBAITZ R, STUMPF WE, SAR M, HUANG S, DELUCA HF. Autoradiographic localization of target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in bones from fetal rats. *Calcified Tissue International*. Vol.35 nº2 pp:177-182, 1983.

NGUYEN TV, LIVSHITS G, CENTER JR, YAKOVENKO K, EISMAN JA. Genetic Determination of Bone Mineral Density: Evidence for a Major Gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.88 nº8 pp:3614 – 3620, 2003.

NIEMAN, DC. *Exercícios e Saúde*. São Paulo, Manole, 1999.

NIH. Osteoporosis, Prevention, Diagnosis and Therapy. *NIH Consensus Statement*. Vol.17, nº1, pp:1-45, 2000.

NÓBREGA ACL, FREITAS EV, OLIVEIRA MAB, LEITÃO MB, LAZZOLI JK, NAHAS RM, BAPTISTA CAS, DRUMMOND FA, REZENDO L, PEREIRA J, PINTO, RADOMINSKI RB, LEITE N, THIELE ES, HERNANDEZ AJ, ARAÚJO CGS, TEIXEIRA JAC, CARVALHO T, BORGES SF, DE ROSE EH. Posicionamento oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte e da Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia: Atividade física e saúde no idoso. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* Vol.5 n°6 pp:207-11, 1999.

OWAN I, BURR DB, TURNER CH, QIU J, TU Y, ONYIA JE, DUNCAN RL. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *American Journal of Physiology* Vol.273 n°3 Pt 1 pp:C810-C815, 1997.

OZISIK G, MERGEN H, OZATA M, UYANIK C, CAGLAYAN S, TURAN M, BOLU E, ILGIN S, ONER R, OZDEMIR IC, ONER C. Vitamin d-receptor gene polymorphisms and vertebral bone density in men with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. *Medical Science Monitor*. Vol.7 n°2 pp:233-7, 2001.

PARDINI, R.; MATSUDO, S.M.; ARAÚJO, T.; MATSUDO, V.; ANDRADE, E.; BRAGGION, G.; ANDRADE, D.; OLIVEIRA, L.; FIGUEIRA JR., A.; RASO, V. Validação do questionário internacional de nível de atividade física (IPAQ - versão 6): estudo piloto em adultos jovens brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. Vol.9 n.3 pp:45-51, 2001.

PARFITT AM, HAN ZH, PALNITKAR S, RAO DS, SHIH MS, NELSON D. Effects of ethnicity and age or menopause on osteoblast function, bone mineralization, and osteoid accumulation in iliac bone. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.12 n°11 pp:1864–1873, 1997.

PATE RR, PRATT M, BLAIR SN, HASKELL WL, MACERA CA, BOUCHARD C, BUCHNER D, ETTINGER W, HEATH GW, KING AC, KRISKA A, LEON AS, MARCUS BH, MORRIS J, PAFFENBERGER RS, PATRICK K, POLLOCK ML, RIPPE JM, SALLIS J, WILMORE JH. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *Journal of the American Medical Association*. Vol.273 n°5 pp:402-7, 1995.

PERUSSE L, RANKINEN T, RAURAMAA R, RIVERA MA, WOLFARTH B, BOUCHARD C. The human gene map for performance and health related phenotypes: the 2002 update. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol.35 n°8 pp:1248-1264, 2003

POCOCK NA, EISMAN JA, HOPPER JL, YEATES MG, SAMBROOK PN, EBERL S. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *Journal of Clinical Investigation*. Vol.80 n°3 pp:706-10, 1987.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. Vol.155 n° 2 pp:945-59, 2000.

PUNTILA E, KROGER H, LAKKA T, TUPPURAINEN M, JURVELIN J, HONKANEN R. Leisure-time physical activity and rate of bone loss among peri- and postmenopausal women: a longitudinal study. *Bone*. Vol.29 n°5 pp:442-6, 2001.

QIN YJ, ZHANG ZL, HUANG QR, HE JM, HU YQ, ZHAO Q, LU JH, LI M, LIU YJ. Association of vitamin d receptor and estrogen receptor- α gene polymorphism with peak bone mass and bone size in Chinese women. *Acta Pharmacol Sin*. Vol.25 n°4 pp:462-8, 2004.

RABON-STITH KM, HAGBERG JM, PHARES DA, KOSTEK MC, DELMONICO MJ, ROTH SM, FERREL RE, CONWAY JM, RYAN AS, HURLEY BF. Vitamin D receptor FokI genotype influences bone mineral density response to strength training, but not aerobic training. *Experimental Physiology*. Vol.90 n°4 pp:653-661, 2005.

RALSTON SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.87 n°6 pp:2460-6, 2002.

RAMOS LR A explosão demográfica da terceira idade no Brasil: uma questão de saúde pública. *Gerontologia*. Vol.1 n°1 pp:3-8, 1993.

RANKINEN T, PERUSSE L, RAURAMAA R, RIVERA MA, WOLFARTH B, BOUCHARD C. The human gene map for performance and health related phenotypes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol.33 n°6 pp:855-867, 2001.

RANKINEN T, PERUSSE L, RAURAMAA R, RIVERA MA, WOLFARTH B, BOUCHARD C. The human gene map for performance and health related phenotypes: the 2001 update. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol.34 n°8 pp:1219-1233, 2002

RAPURI PB, GALLAGHER JC, KNEZETIC JA, KINYAMU HK, RYSCHON KL. Association between Vitamin D receptor polymorphisms and the rate of bone loss in elderly women-importance of adjusting for dietary and lifestyle factors. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology* Vol.89-90 n°1-5 pp:503-506, 2004.

REICHEL H, KOEFFLER HP, NORMAN AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *New England Journal of Medicine*. Vol.320 n°15 pp:980-991, 1989.

ROODMAN GD. Advances in bone biology: The osteoclast. *Endocrine Reviews*. Vol.17 n°4 pp:308-332, 1996.

RUBIN, LA, HAWKER GA, PELTEKOVA VD, FIELDING LJ, RIDOUT R, AND COLE DEC. Determinants of peak bone mass: clinical and genetic analyses in a young female Canadian cohort. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.14 n°4 pp:633-643, 1999

SAINZ J, VAN TORNOUT JM, LORO ML, SAYRE J, ROE TF, GILSANZ V. Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. *New England Journal of Medicine*. Vol.337 n°2 pp:77-82, 1997.

SALAMONE LM, GLYNN NW, BLACK DM, FERRELL RE, PALERMO L, EPSTEIN RS, KULLER LH, CAULEY JA. Determinants of premenopausal bone mineral density: the interplay of genetic and lifestyle factors. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.11 n°10 pp:1557-65, 1996.

SEELEY DG, BROWNER WS, NEVITT MC, GENANT HK, SCOTT JC, CUMMINGS SR. For the study of osteoporotic fractures research group. Which fractures are associated with low appendicular bone mass in elderly women? *American Journal of Internal Medicine*. Vol.115 n°11 pp:837-842, 1991.

SEEMAN E, TSALAMANDRIS C, FORMICA C, HOPPER JL, MCKAY J. Reduced femoral neck bone density in the daughters of women with hip fractures: the role of low peak bone density in the pathogenesis of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* . Vol.9 n°5 pp:739-43, 1994.

SHRIVER MD, PARRA EJ, DIOS S, BONILLA C, NORTON H, JOVEL C, PFAFF C, JONESC, MASSAC A, CAMERON N, BARON A, JACKSON T, ARGYROPOULOS G, JIN L, HOGGART CJ, MCKEIGUE PM, KITTLES RA. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Human Genetics*. Vol.112 n°4 pp:387-99, 2003.

SLEMENDA CW, CHRISTIAN JC, WILLIAMS CJ, NORTON JA, JOHNSTON CC JR.. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *Journal of Bone and Mineral Research* Vol.6 n°6 pp:561–567, 1991.

SMITH DM, NACE WE, KANG KW, CHRISTIAN JC, JOHNSTON CC. Genetic factors in determining bone mass. *Journal of Clinical Investigation*. Vol.52 n°11 pp:2800-8, 1973.

SOOY K, SABBAGH Y, DEMAY MB. Osteoblasts lacking the vitamin D receptor display enhanced osteogenic potential in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol.94 n°1 pp:81-7, 2005.

SOWERS MR, BOEHNKE M, JANNAUSCH ML, CRUTCHFIELD M, CORTON G, BURNS TL. Familiality and partitioning the variability of femoral bone mineral density in woman of child-bearing age. *Calcified Tissue International* Vol.50 n°2 pp:110–114, 1992.

SOWERS MS, WILLING M, BURNS T, DESCHENES S, HOLLIS B, CRUTCHFIELD M, JANNAUSCH M. Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.14 n°8 pp:1411-1419, 1999.

SPECTOR TD, KEEN RW, ARDEN NK, MORRISON NA, MAJOR PJ, NGUYEN TV, KELLY PJ, BAKER JR, SAMBROOK PN, LANCHBURY, EISMAN JA. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mineral density in postmenopausal women: a twin study in Britain. *British Medical Journal*. Vol.310 n°6991 pp:1357-1360, 1995.

SYVÄNEN A-C. From gel to chips: “minisequencing” primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation*. Vol.13 n°1 pp:1-10, 1999.

SZEJNFELD VL. Composição e organização do osso. In: SZEJNFELD VL. ***Osteoporose: diagnóstico e tratamento***. São Paulo, Sarvier, 2000, pp:3-19.

TAJIMA O, ASHIZAWA N, ISHII T, AMAGAI H, MASHIMO T, LIU LJ, SAITOH S, TOKUYAMA K, SUZUKI M. Interaction of the effects between vitamin D receptor polymorphism and exercise training on bone metabolism. ***Journal of Applied Physiology***. Vol.88 n° pp1271-1276, 2000.

TAO C, YU T, GARNETT S, BRIODY J, KNIGHT J, WOODHEAD H, COWELL CT. Vitamin D receptor alleles predict growth and bone density in girls. ***Archives of Diseases in Childhood***. Vol.79 n°6 pp:488-93, 1998.

TOFTENG CL, JENSEN JE, ABRAHAMSEN B, ODUM L, BROTH C. Two polymorphisms in the vitamin D receptor gene--association with bone mass and 5-year change in bone mass with or without hormone-replacement therapy in postmenopausal women: the Danish Osteoporosis Prevention Study. ***Journal of Bone and Mineral Research***. Vol.17 n°8 pp:1535-44, 2002.

TOKITA A, MATSUMOTO H, MORRISON NA, TAWA T, MIURA Y, FUKAMAUCHI K, MITSUHASHI N, IRIMOTO M, YAMAMORI S, MIURA M, WATANABE T, KUWABARA Y, YABUTA K, EISMAN JA. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. ***Journal of Bone and Mineral Research***. Vol.11 n°7 pp:1003-9, 1996.

TURNER CH, OWAN I, TAKANO Y. Mechanotransduction in bone: role of strain rate. ***American Journal of Physiology***. Vol.269 n°3(Pt 1) pp:E438-42, 1995.

TURNER CH, FORWOOD MR, OTTER MW. Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? ***FASEB Journal***. Vol.8 n°11 pp:875-8, 1994.

TSURITANI I, BROOKE-WAVELL KS, MASTANA SS, JONES PR, HARDMAN AE, YAMADA Y. Does vitamin D receptor polymorphism influence the response of bone to brisk walking in postmenopausal women? ***Hormone Research***. Vol.50 n°6 pp:315-9, 1998.

UITTERLINDEN AG, POLS HA, BURGER H, HUANG Q, VAN DAELE PL, VAN DUIJN CM, HOFMAN A, BIRKENHAGER JC, VAN LEEUWEN JP. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. ***Journal of Bone and Mineral Research***. Vol.11 n°9 pp:1241-8, 1996.

UITTERLINDEN AG, POLS HAP, VAN DAELE PLA *et al.*. Vitamin D receptor genotype is associated with bone mineral density. (resumo em ingles). ***Calcified Tissue International***. Vol.56 pp:474, 1995.

USDHHS - U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. ***Physical Activity and Health: A Report of the Surgeon General***. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and

Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 1996

VAN CROMPHAUT SJ, DEWERCHIN M, HOENDEROP JG, STOCKMANS I, VAN HERCK E, KATO S, BINDELS RJ, COLLEN D, CARMELIET P, BOUILLON R, CARMELIET G. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. Vol.98 n°23 pp:13324-9, 2001

VAN DEN OORD EJCG, MACGREGOR AJ, SNIEDER H, SPECTOR TD. Modelling with measured genotypes: effects of vitamin D receptor gene, age, and latent genetic and environmental factors on bone mineral density. *Behavior Genetics*. Vol.34 n°2 pp:197-206, 2004.

VANDEVYVER C, WYLIN T, CASSIMAN JJ, RAUS J, GEUSENS P. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.12 n°2 pp:241-7, 1997.

VUILLEMIN A, GUILLEMIN F, JOUANNY P, DENNIS G, JEANDEL C. Differential influence of physical activity on lumbar spine and femoral neck bone mineral density in the elderly population. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. Vol.56A n°6 pp:B248-B253, 2001.

WEINSTEIN RS, UNDERWOOD JL, HUTSON MS, DELUCA HF. Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rats infused with calcium and phosphorus. *American Journal of Physiology*. Vol.246 n°6 pp:E499-E505, 1984.

WESTERLIND KC, WRONSKI TJ, RITMAN EL, LUO ZP, AN KN, BELL NH, TURNER RT. Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol.94 n°8 pp:4199-204, 1997.

WILLING M, SOWERS M, ARON D, CLARK MK, BURNS T, BUNTEN C, CRUTCHFIELD M, D'AGOSTINO D, JANNAUSCH M. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.13 n°4 pp:695-705, 1998.

WHITFIELD GK, REMUS LS, JURUTKA PW, ZITZER H, OZA AK, DANG HT, HAUSSLER CA, GALLIGAN MA, THATCHER ML, ENCINAS DOMINGUEZ C, HAUSSLER MR. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol.177 n°1-2 pp:145-59, 2001.

WOLFARTH B, BRAY MS, HAGBERG JM, PERUSSE L, RAURAMAA R, RIVERA MA, ROTH SM, RANKINEN T, BOUCHARD C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol.37 n°6:881-903, 2005.

YAMAMOTO H, MIYAMAMOTO KI, LI B, TAKETANI Y, KITANO M, INOUE Y, MORITA K, PIKE JW, TAKEDA E. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.14 n°2 pp:240-247, 1999.

ZAJICKOVA K, ZOFKOVA I, BAHBOUH R, KREPELOVA A. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: FokI genotype is related to postmenopausal bone mass. *Physiological Research*. Vol.51 n°5 pp:501-509, 2002.

ZMUDA JM, CAULEY JA, DANIELSON ME, WOLF RL, FERREL RE. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone turnover, and rates of bone loss in older African-american women. *Journal of Bone an Mineral Research*. Vol.12 n°9 pp:1446-1452, 1997.

Anexo A

Questionário padrão

Muito obrigado por participar de nosso estudo. Por favor, preencha a ficha abaixo para podermos conhecê-la melhor.

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Cidade/Estado de nascimento: _____

Em que país você nasceu?

Em que país seus pais nasceram?

Em que país seus avós nasceram?

Você fuma?

() Não () Sim. Há quanto tempo? _____

Qual a cor de sua pele?

() Branca () Negra
() Amarela (oriental) () Vermelho (indígena)

Você faz terapia de reposição hormonal

() Não () Sim. Há quanto tempo? _____

Marque um "X" caso você tenha alguma das patologias abaixo

() Hipertensão () Diabetes () Osteoporose
() Outros: _____

Você está tomando algum medicamento?

() Não () Sim. Qual (is)? _____

Obrigado!

Anexo B



QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA -

Nome: _____
 Data: ____/____/____ Idade : ____ Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez:

1a Em quantos dias da última semana você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

Anexo C

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA – UCB

Nome: _____

1. ESCLARECIMENTO DAS AVALIAÇÕES

Você estará participando de um grupo experimental de estudo com o objetivo de verificar a associação de variações genéticas, com a densidade mineral óssea, força muscular e massa muscular. Para tanto, você será submetido(a) a algumas avaliações. Você poderá a qualquer momento desligar-se da presente pesquisa sem nenhum constrangimento. Para que você possa decidir sobre sua participação, descrevemos a seguir os testes:

1.1. Avaliação da composição corporal:

Serão avaliadas a densidade mineral óssea e massa muscular através do DXA. Durante o DXA você permanecerá deitada em uma mesa, por volta de 30 minutos, enquanto seu corpo será percorrido por um scanner a uma distância de aproximadamente 60 centímetros. Ainda que seja um aparelho similar ao de raio X, a quantidade de radiação a que a pessoa é exposta equivale a 1/20 de uma radiografia dental. Este método é seguro para crianças, adolescentes e adultos.

Além da composição corporal medida pelo DXA, os dados antropométricos avaliados serão a estatura (altura) e peso corporal.

O pesquisador principal, assim que possível entrará em contato para entregar o resultado destes exames, que estarão junto a secretária do projeto “Geração de Ouro”.

1.2. Avaliação genética

A avaliação será feita através de uma amostra sanguínea retirada da veia situada em seu antebraço. Todos os equipamentos utilizados serão esterilizados e/ou descartáveis e a coleta será realizada por um técnico devidamente treinado. Este procedimento é comumente adotado em pesquisas deste gênero e, de uma forma geral, é bem tolerado pelos voluntários.

2. RISCOS E DESCONFORTOS POSSÍVEIS

Durante a realização dos testes, poderão surgir alguns desconfortos. No caso específico da coleta de sangue, semelhante a uma coleta laboratorial rotineira, será necessário realizar a inserção de uma agulha no antebraço, o que pode trazer algum tipo de desconforto. O procedimento é relativamente simples e bem aceito por indivíduos de todas as idades, e, em adição, todo esforço será feito para minimizar estes desconfortos.

3. BENEFÍCIOS ESPERADOS

Os participantes deste projeto serão informados sobre seu status atual de massa muscular e densidade mineral óssea, avaliados em equipamentos internacionalmente reconhecidos como instrumentos válidos e precisos. Em adição, serão fornecidas informações sobre as características genéticas atuais e aconselhamento de condutas adequadas a perfil obtido nos resultados.

O benefício possível dessa pesquisa diz respeito à busca pela identificação de uma variável genética que seja fator de risco para o desenvolvimento de sarcopenia e/ou osteoporose. Caso seja observada essa variação, futuramente, será possível identificar indivíduos propensos a desenvolver as citadas patologias, o que possibilitará a intervenção apropriada de forma precoce, consequentemente, minimizando os efeitos deletérios desses quadros indesejáveis. Pesquisas dessa natureza certamente beneficiarão as futuras gerações de idosos.

4. RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR E DA INSTITUIÇÃO

O pesquisador responsável suspenderá a pesquisa imediatamente ao perceber algum risco ou dano à saúde do participante, mesmo riscos não previstos neste termo de consentimento. O pesquisador assumirá a responsabilidade de dar assistência integral e indenização às complicações e danos decorrentes dos riscos. Caso constatada a superioridade de um método em estudo sobre outro, o pesquisador será responsável por oferecer a todos os sujeitos os benefícios do melhor regime.

5. RESPONSABILIDADE DAS PARTICIPANTES

Estar presente no local dos testes nos dias e horários marcados. Informar ao professor pesquisador qualquer desconforto que por acaso venha a perceber.

6. RESULTADOS OBTIDOS

As informações obtidas neste experimento, por meio dos resultados de todos os testes, poderão ser utilizadas como dados de pesquisa científica, podendo ser publicados e divulgados, sendo resguardada a identidade das participantes.

LIBERDADE DE CONSENTIMENTO

A sua permissão para participar desta pesquisa é voluntária. Você estará livre para negá-la ou para em qualquer momento desistir da mesma se assim desejar.

Declaro ter lido este termo de consentimento e compreendido os procedimentos nele descritos. Informo também que todas as minhas dúvidas foram respondidas de forma clara e de fácil compreensão. Estou de acordo em participar da referida pesquisa.

Assinatura – RG Participante

Assinatura – RG Testemunha

Anexo D

Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Católica de Brasília - UCB

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Brasília, 25 de outubro de 2004

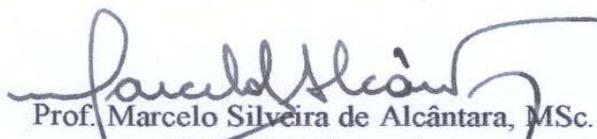
Ofício CEP/UCB N° 072/2004

Prezado senhor,

É com satisfação que informamos formalmente a V. Sa. que o projeto “Polimorfismo do gene receptor da vitamina D (VDR) em idosos brasileiros e associação com massa muscular, força e densidade mineral óssea” foi aprovado por este CEP em sua 33ª Reunião, realizada em 20 de outubro do corrente ano, podendo, portanto, ter a sua fase de coleta de dados iniciada. Informamos ainda que no prazo máximo de 1 (um) ano a contar desta data deverá ser enviado a este CEP um relatório sucinto sobre o andamento da presente pesquisa.

Esperando poder servi-lo em outra ocasião, apresentamos nossos votos de estima e consideração.

Atenciosamente,



Prof. Marcelo Silveira de Alcântara, MSc.
Secretário Executivo
Comitê de Ética em Pesquisa - UCB

Ilmo Sr.
Ricardo Jacó de Oliveira
Brasília – DF
NESTA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)