

Análise da dor lombar através do processo de metilação em genes específicos. Revisão sistemática

Analysis of low back pain through the methylation process in specific genes. Systematic review

Layse Rafaela Moroti-Perugini¹, Isadora Fernandes Cônsolo¹, Valeria Aparecida Bello², Regina Célia Poli¹

DOI 10.5935/2595-0118.20230039-pt

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Os sintomas da dor lombar são algumas das queixas mais comuns. A epigenética representa um mecanismo pelo qual o meio pode modificar a expressão gênica sem que ocorra alterações da sequência primária de DNA. Isso pode ser visto em processos de metilação de DNA, modificação de histonas e reorganização de cromatina. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática sobre o processo de metilação de DNA relacionado à dor lombar.

CONTEÚDO: A revisão sistemática foi realizada com os dados coletados até março de 2023. A pesquisa foi realizada nas plataformas de busca de artigos: Scielo, Pubmed, Portal Regional da Biblioteca Virtual da Saúde e LILACS. Foram utilizadas palavras-chaves pré-definidas na língua portuguesa ou inglesa: - dor lombar ou *low back pain*, metilação de DNA ou *DNA methylation*, epigenômica ou *epigenetic*; sendo que todas as palavras escolhidas foram verificadas através dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e as palavras na língua inglesa foram verificadas no MeSH terms. A análise do risco de viés foi identificada. Nos oito artigos que preencheram os critérios de inclusão foram destacados 61 genes, sendo que apenas dois trabalhos apresentaram genes em comum, porém um deles em amostras animais. Cada gene analisado possui sua particularidade na realização de processos; portanto, apresentando diferenças na forma como poderá gerar a lombalgia. Todos os estudos incluídos nesta revisão tiveram o risco de viés avaliado.

CONCLUSÃO: Os genes identificados podem contribuir para a evolução de tratamentos e conhecimento científico. Porém, como o tema abordado é relativamente novo, mais estudos devem ser desenvolvidos.

Descritores: DNA, Dor lombar, Epigenômica, Metilação.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Low back pain is one of the most common complaints. Epigenetics represents a mechanism where the environment can modify gene expression without alterations in the primary DNA sequence. This can be seen in the process of DNA methylation, histone modification, and chromatin reorganization. The objective of this study was to conduct a systematic review on DNA methylation processes related to low back pain.

CONTENTS: Data were collected up to March 2023. The search was conducted on the following article search platforms: Scielo, Pubmed, Regional Portal of BVS, and LILACS. Pre-defined keywords were used in Portuguese or English: low back pain, DNA methylation, epigenomics, and epigenetics. All chosen words were verified through Health Sciences Descriptors (DeCS), and English words were verified in MeSH terms. Bias risk analysis was identified. 61 genes were highlighted in the 8 articles that met the inclusion criteria. Only 2 studies presented genes in common, but one of them was in animal samples. Each analyzed gene has its particularity in performing processes, thus presenting differences in how it could generate low back pain. All studies included in this review were assessed for risk of bias.

CONCLUSION: The identified genes contribute significantly to the development of treatments and scientific knowledge. However, as the topic addressed is relatively new, further studies should be developed.

Keywords: DNA, Epigenomics, Low back pain, Methylation.

INTRODUÇÃO

Os sintomas da dor lombar (DL) são algumas das queixas mais comuns e, também, a principal causa de incapacidade em todo o mundo; independentemente da faixa etária e da classe social¹⁻⁴. Apesar do grande número de pessoas acometidas, grande parte delas não consegue estabelecer com precisão a causa dos sintomas^{5,6}. Sabe-se que grande parte das doenças crônicas possuem influências genéticas e ambientais⁷⁻⁹. Dentro dos fatores ambientais, é visto que o estresse físico e psicológico tem sido associado à DL crônica¹⁰⁻¹².

Layse Rafaela Moroti-Perugini – <https://orcid.org/0000-0002-4270-4001>;
Isadora Fernandes Cônsolo – <https://orcid.org/0000-0001-5048-2106>;
Valeria Aparecida Bello – <https://orcid.org/0000-0001-7919-6218>;
Regina Célia Poli – <https://orcid.org/0000-0003-4631-4606>.

1. UNOPAR, Laboratório de Genética Molecular, Londrina, PR, Brasil.
2. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Faculdade de Medicina, Londrina, PR, Brasil.

Apresentado em 16 de janeiro de 2023.

Aceito para publicação em 11 de julho de 2023.

Conflito de interesses: não há - Fonte de fomento: CAPES - bolsa de estudo de doutorado.

DESTAQUES

- Diversos genes relacionados à lombalgia apresentam níveis diferentes de metilação do DNA;
- Há diferentes genes envolvidos na lombalgia entre homens e mulheres, assim como seu nível de metilação também é diferente segundo o gênero e prática de exercício físico;
- Não há ainda um biomarcador epigenético para a lombalgia, o que indica a necessidade de mais estudos para esclarecer o papel da epigenética na dor lombar.

Correspondência para:

Regina Célia Poli

E-mail: regina.frederico@platosedu.com.br

Apesar da etiologia da DL ser multifacetada e não ser totalmente esclarecida, a genética e, portanto, a hereditariedade, pode acarretar alterações anatômicas em um percentual de apenas 7-23% da população⁹. No entanto, os exames laboratoriais atuais não são capazes de explicar a cronicidade da doença, sendo necessárias as contribuições genéticas e a verificação da predisposição funcional à lombalgia⁹.

Adicionalmente, sabe-se que a dor crônica é associada a mudanças a longo prazo na expressão de genes, que é um mecanismo controlado genética e epigeneticamente¹⁰. A epigenética representa a modulação na expressão gênica sem que ocorra alterações da sequência primária de DNA¹¹. Isso pode ser visto nos processos de metilação de DNA, modificação de histonas e reorganização de cromatina, assim como de microRNAs¹².

A metilação do DNA se destaca por estar envolvida na regulação e diferenciação celular, vistas como dois dos principais fatores que regulam as atividades gênicas¹³. Estudos prévios mostraram a relação de mudanças nos padrões de metilação do DNA em modelos animais e em pacientes com dor lombar crônica^{10,14,15,16}.

Além da identificação de predisposição genética, o conhecimento de mudanças epigenéticas envolvidas na dor lombar crônica inespecífica pode colaborar para a compreensão e desenvolvimento de novos tratamentos¹⁷.

Assim, este estudo buscou destacar, através de uma revisão sistemática, a expressão de genes modulados por diferentes padrões de metilação envolvidos na lombalgia.

CONTEÚDO

Crítérios de seleção dos artigos

Para a realização deste trabalho foram incluídos todos os artigos relacionados com DL e metilação de DNA encontrados; para que assim pudessem ser esclarecidas situações em que há DL, porém sem causa definida. Dessa forma, todos os artigos selecionados deveriam apresentar conceitos de epigenética sob o ponto de vista da metilação do DNA. Apresentando, portanto, metilação de genes específicos para a DL.

Os artigos foram selecionados independentemente do conceito de DL, de instrumentos de coleta, da data de publicação, do tamanho amostral e do gênero amostral. Foram excluídos os artigos que não apresentaram clareza nos seguintes requisitos: relação com o tema estabelecido, análise genética não relacionada ao processo de metilação ou especificação de genes.

Estratégia de busca

Foram consideradas as seguintes plataformas de busca de artigos: Scielo, PubMed, Portal Regional da BVS, LILACS. Foram utilizadas as seguintes palavras-chaves pré-definidas nas línguas portuguesa e inglesa: dor lombar ou *low back pain*, metilação de DNA ou *DNA methylation*, epigenômica ou *epigenetic*; sendo que todas as palavras escolhidas foram verificadas através dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e as palavras na língua inglesa foram verificadas no MeSHterms (Tabela 1). O período das buscas para a pesquisa foi até março de 2023. Os artigos e dados foram extraídos por dois revisores independentes (L.R.M.P. e R.C.P), utilizando as estratégias de busca e análise preestabelecidas.

Foi realizada uma revisão de literatura, na qual foram incluídos artigos de natureza quantitativa, conforme a metodologia do *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-analyses* (PRISMA). A construção da pergunta de pesquisa foi baseada no acrônimo PICO: *Patient/problem* (descrição do problema ou população), *Intervention* (intervenção proposta), *Control/comparison* (descrição da intervenção), *Outcome* (efeito da intervenção). Os artigos foram selecionados com base na leitura do título ou do resumo. Após selecionados os artigos que seriam inclusos nesta revisão, foram realizadas as leituras integrais e evidenciados os principais pontos dos trabalhos.

Risco de viés

Para que houvesse um melhor controle de qualidade e que as possíveis fontes de viés fossem identificadas precocemente, estabeleceu-se o uso do instrumento desenvolvido pelos autores¹⁸. Esse instrumento classifica o risco de viés como baixo, moderado ou alto de acordo com a validade interna e externa de cada estudo. Nesse instrumento são levados em consideração os seguintes critérios: 1 – representatividade da amostra do estudo em relação à população nacional, 2 – um sistema de amostragem que represente a população alvo, 3 – método de seleção da amostra, 4 – probabilidade de viés de não-resposta, 5 – forma de obtenção da resposta de interesse, 6 – definição do conceito de DL utilizado para a definição da amostra, 7 – confiabilidade e validade das ferramentas utilizadas, 8 – padronização do processo de coleta, 9 – período de prevalência de interesse apropriado, 10 – presença de erro de cálculo e/ou relato dos valores do numerador e denominador do parâmetro de interesse¹⁸.

A validade externa foi avaliada levando em consideração os 4 primeiros itens, enquanto os itens restantes avaliaram a validade interna de cada artigo. Por fim, cada artigo foi classificado de acordo com sua pontuação, sendo: 10-9 classificados como baixo risco e 8-7 classificados como risco moderado; pontuações mais baixas foram classificadas como alto risco¹⁸.

Extração e análise dos dados

As variáveis de interesse, como primeiro autor, data da publicação do artigo, tipo de estudo, tamanho amostral e resultado do estudo foram transferidas para uma planilha eletrônica (Excel), para melhor visualização e interpretação dos dados obtidos (Tabela 1).

Tabela 1. Estratégia de busca nas bases de dados

LILACS, Portal Regional da BVS	Scielo	<i>Low back pain AND DNA methylation; low back pain AND epigenetic; low back pain AND DNA methylation AND epigenetic</i> – pesquisa realizada também na língua portuguesa
Pubmed		<i>Low back pain AND DNA methylation; low back pain AND epigenetic; low back pain AND DNA methylation AND epigenetic</i>

RESULTADOS

A partir das buscas realizadas, foi encontrado um total de 92 artigos. Desses artigos, 43 foram extraídos do Portal Regional da BVS e 49 da plataforma Pubmed. As plataformas Scielo e LILACS, apesar de utilizarem diferentes formas de busca, não apresentaram nenhum artigo disponível relacionado a esta pesquisa.

Com a realização da triagem, 54 artigos foram excluídos por duplicidade e um artigo foi excluído por estar bloqueado para leitura na íntegra. Após a análise dos títulos, sete artigos foram descartados por não estarem relacionados ao tema da pesquisa. Outros 11 artigos também não atenderam aos critérios de inclusão, sendo, portanto, excluídos após a análise do resumo. Por fim, 19 artigos foram selecionados para leitura na íntegra.

Dos 19 artigos selecionados, 8 abordaram o tema de metilação global, um apresentava apenas protocolos para desenvolvimento de pesquisa, um se baseava, unicamente, em outro artigo já incluído na revisão e um artigo utilizou exclusivamente uma plataforma de bioinformática para verificação de dados. Portanto, esses artigos foram excluídos deste estudo. A Figura 1 apresenta o processo de seleção dos artigos.

Entre os estudos selecionados, os artigos mais antigos foram publicados nos anos de 2016¹⁹ e 2019¹⁴. Dessa forma, foi observado que o tema abordado, além de ser atual, evidencia a evolução da genética, proporcionando esclarecimentos antes não abordados.

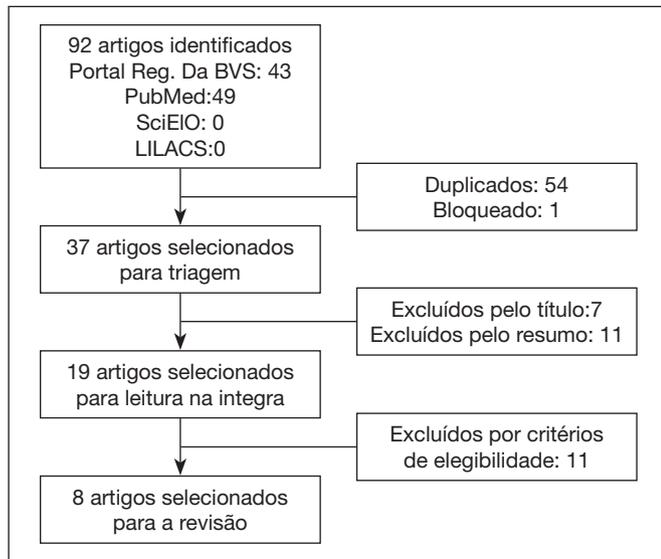


Figura 1. Seleção dos estudos

Dos oito artigos selecionados^{10,14,15,16,19-22} ao final das análises, foi incluído um artigo de revisão sistemática²², sendo que devido ao objetivo distinto do presente estudo e discrepância de dados houve a necessidade da análise de cada um de seus artigos; apenas foram verificados os trabalhos que preenchiam os critérios de seleção deste estudo; portanto, sendo necessário clareza na metodologia e identificação de genes específicos no processo de metilação relacionado à lombalgia. Além disso, foram excluídos os artigos que já constavam neste estudo; sendo necessária, apenas, a verificação de um artigo²³ oriundo da revisão. Por fim, a necessidade de análise de um único artigo fez com que a explanação de dados fosse apenas referente a esse e não à revisão como um todo.

Após a análise de todos os artigos incluídos neste trabalho, foi constatado que dois artigos^{14,16} utilizaram camundongos para sua investigação. Desses dois artigos, um realizou apenas análise através de camundongos¹⁶; enquanto o outro obteve uma amostra mista¹⁴, composta de camundongos e humanos. Um total de 75 animais foram utilizados, sendo todos machos e com ambientes controlados. Apenas esses estudos foram de análise longitudinal, além do estudo²⁰ que apontou escassez e dificuldade na obtenção de dados nessas circunstâncias.

Nos outros 6 estudos^{10,15,19,20,21,23}, foram coletadas amostras biológicas humanas para análise, através de sangue periférico, sangue total, ligamento amarelo e células do núcleo pulposo. Um total de 271 pessoas participou dos estudos, com uma idade média próxima a 51,7 anos, de ambos os gêneros. A identificação da dor lombar se deu através de autorrelato, análise de prontuário, aplicação de questionários e devido à necessidade cirúrgica. Em 2 dos artigos não foi esclarecida a forma de identificação da dor^{16,23}.

As informações a respeito de autores, ano de publicação, tipo de estudo, material biológico utilizado, tamanho amostral, idade média da amostra, análises genéticas utilizadas e identificação da lombalgia se encontram na tabela 2.

Todos os artigos apresentaram análise genética por metilação; assim como todos identificaram genes específicos. Os principais genes citados foram: CELSR1, MFGE8, NR2F2, GPAT2, WDR5, Clorf127, DYRK3, PAX5, HTRA3, MINK1, K1F11, COL4A3, MACC1, PIGC, ACSM5, HSPA6, LGALS8, FRMD4A, KLRC-

Tabela 2. Características gerais dos artigos selecionados

Autores	Tipo de estudo	Amostra biológica	Tamanho amostral (n)	Gênero	Idade (anos)	Análise genética	Identificação da dor lombar	Significância
Aroke et al. ¹⁵	Transversal	Sangue periférico humano	50	Ambos	52	Metilação de DNA através de bisulfito	Autorrelato, prontuários - <i>American Colleges of Physicians</i> e <i>American Pain Society, Brief Pain Inventory (BPI) - Short Form</i>	Sim
Cao et al. ²⁴	Transversal	Ligamento amarelo humano	10	Ambos	63,5	Kit de metilação de DNA EZ, cultura celular em meio DMEM	Exames e necessidades cirúrgicas	Sim
Grégoire, et al. ¹⁰	Transversal	Sangue periférico humano	75	Ambos	43,4	Metilação de DNA através de bisulfito	Autorrelato - <i>Canadian adaptation of the NIH Low Back Pain Taskforce</i>	Sim

Continua...

Tabela 2. Características gerais dos artigos selecionados – continuação

Autores	Tipo de estudo	Amostra biológica	Tamanho amostral (n)	Gênero	Idade (anos)	Análise genética	Identificação da dor lombar	Significância
Jiang et al. ²⁰	Longitudinal	Placa terminal cartilaginosa (CEP) ratos / humano - quando realizado cirurgia	15 camundongos 18 humanos	Masculino	6 semanas	Quantitative RT-PCR, Western blotting, metilação de DNA	Camundongos - grau de Pfirrmann - para verificação do impacto Humanos - amostra através de cirurgia na região lombar	Sim
Luo et al. ²⁵	Longitudinal	Amostras de discos lombares dos camundongos	60 camundongos	Masculino	2 meses	RT-qPCR, Western blot, citometria de fluxo, metilação, ELISA	Não houve - realizaram técnicas cirúrgicas exclusivamente para análise	Sim
Adhikari et al. ²⁰	Longitudinal	Sangue periférico humano	11	Ambos	34	Sequenciamento por bisulfito, Kit de metilação de DNA EZ, sequenciamento de RNA por sistema Illumina NextSeq 550	Autorrelato - brief 40-itens byTaskforce on Research Standards for cLBP; Brief Pain Inventory (BPI); Emotion Regulation Questionnaire (ERQ)	Não
Li et al. ²⁷	Transversal	Tecido do núcleo pulposo	95	Ambos	55	Intervertebral disc RNA-seq, RNA scope, RT-PCR, Western blot	Não houve - realizaram técnicas cirúrgicas, devido necessidade operatória	Sim
Sukenaga et al. ¹⁹	Transversal	Sangue total humano	12	Ambos	62,5	Illumina Human-Methylation450 BeadChip, kit de microarranjo SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2	DN4 (Douleur Neuropathique 4), SF-MPQ (Short-Form McGill Pain Questionnaire)	Sim

4-KLRK1, RAMP1, COL21A1, TACSTD2, RPH3AL, NINJ2, MR1, DTHD1, MYT1L, MYO1D, PTPRE, ACBD5, EDIL3, PGAM2, NUP35, NOTCH1, ZNF718, PLD6, Sox-9, EZH2, DNMT3B, TRPA1, COX2, YAP, PSMD1, PSMD12, PSMA3, PSMB6, PSMB10, KLRK1, KPNB1, LAPTM5, ICAM-3, RPL23A, ALKBH5 e TRPA1.

Apenas um estudo¹⁰ levou em consideração diferenças de gêneros para análise genética. Além da análise genética através da metilação de DNA, foram utilizados outros meios como cultura celular em meio DMEM, RT-PCR, *western blotting*, citometria de fluxo e ELISA.

Os principais genes encontrados, de acordo com cada artigo, se encontram na Tabela 3.

Na avaliação do risco de viés, os artigos analisados obtiveram uma pontuação entre 8 e 9; sendo que 2 artigos foram classificados como médio risco de viés devido à pontuação 8, e os artigos restantes classificados como baixo risco de viés.

Nos critérios iniciais da validade externa, como representação nacional da população alvo, todos os artigos apresentaram uma resposta negativa. Já no critério sistema da amostragem sendo uma representação verdadeira ou próxima da população alvo, apenas dois artigos foram inclusos. O único motivo específico foi devido às amostras serem de camundongos.

A Tabela 4 apresenta a avaliação dos riscos de viés de acordo com cada artigo incluído neste trabalho.

Tabela 3. Relação dos genes por autores

Autores	Genes
Aroke et al. ¹⁵	CELSR1, MFGE8, NR2F2, GPAT2, WDR5, Clof127, DYRK3, PAX5, HTRA3, MINK1, K1F11, NAV1, DAD1, FAM101B, TCF25, OLFM1, FBRS
Cao et al. ²¹	COL4A3, MACC1, PIGC, ACSM5, HSPA6
Grégoire et al. ¹⁰	Mulher - LGALS8, FRMD4A, KLRC4-KLRK1, RAMP1, COL21A1, TACSTD2, RPH3AL, NINJ2, MR1, DTHD1 Homem - MYT1L, MYO1D, PTPRE, ACBD5, EDIL3, PGAM2, NUP35, NOTCH1, ZNF718, PLD6
Jiang et al. ¹⁴	Sox-9, EZH2
Luo et al. ¹⁶	DNMT3B, TRPA1, COX2, YAP
Adhikari et al. ²⁰	PSMD1, PSMD12, PSMA3, PSMB6, PSMB10, KLRK1, KPNB1, LAPTM5, ICAM-3 e RPL23A
Li et al. ²³	ALKBH5, DNMT3B
Sukenaga et al. ¹⁹	TRPA1

Tabela 4. Avaliação dos riscos de viés

Autores	Aroke et al. ¹⁵	Cao et al. ²¹	Grêgoire et al. ¹⁰	Jiang et al. ¹⁴	Luo et al. ²⁵	Adhikari et al. ²⁰¹	Li et al. ²⁷	Sukenaga et al. ¹⁹
A população-alvo do estudo era uma representação próxima da população nacional em relação às variáveis relevantes?	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
A estrutura de amostragem era uma representação verdadeira ou próxima da população-alvo?	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Foi usada alguma forma de seleção aleatória para selecionar a amostra OU foi realizado um censo?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
A probabilidade de viés de não resposta foi mínima?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Os dados foram coletados diretamente dos sujeitos (e não de um representante)?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Foi usada uma definição de caso aceitável no estudo?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
O instrumento de estudo que mediu o parâmetro de interesse demonstrou ter validade e confiabilidade?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
O mesmo modo de coleta de dados foi usado para todos os participantes?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
A duração do período de prevalência mais curto para o parâmetro de interesse foi adequada?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

DISCUSSÃO

Esta revisão avaliou a qualidade metodológica dos artigos a respeito do tema proposto já existentes, destacando a crescente evolução das análises genéticas de doenças presentes na vida cotidiana e possibilitando uma maior compreensão sobre a doença.

A epigenética assume a função de análise, procurando identificar possíveis genes que desencadeiam o quadro algico ou que possam alterar alguma função ou estrutura responsável pela manutenção, ou mesmo prevenção, do quadro.

Um estudo¹⁵ trouxe a possibilidade da lombalgia não específica relacionada à epigenética, levando em consideração as modificações que alteram a ossificação de condrócitos em osteoblastos. A metilação diferencial do gene que codifica a proteína matricial extracelular SPARC foi associada à gravidade da dor lombar. O estudo também analisou a degeneração do disco espinhal, a gravidade de dor, a expressão da proteína SPARC (proteína ácida secretada e rica em cisteína) e a metilação de DNA na região promotora de SPARCs, onde observaram que quando a metilação de DNA é aumentada ocorre a redução da expressão do gene.

Destacaram-se os genes CELSR1, K1F11, MINK1, NAV1, MFGE8, VISION1. Foi notado que os genes NAV1 e K1F11 desempenham um papel na migração neuronal e atuam na regulação microtubular e no crescimento axonal, respectivamente. Eles podem afetar o desenvolvimento e a transmissão dos nociceptores¹⁵ CELSR1 e MINK1, que atuam no crescimento celular e no sistema esquelético. Esses últimos, junto com os genes MFGE8, WDR5, PAX5 e DAD1, quando hipometilados são associados a processos de doenças imunológicas¹⁹. Além disso, foi ressaltado que os genes TBX21 e IFNG estão relacionados à condição de dor crônica. Já o TAC1 desempenha um papel na modulação da dor, gerando um estado de inflamação crônica. Portanto, é importante levar em consideração uma possível inflamação relacionada à integridade da matriz vertebral¹⁵.

Ainda a respeito das estruturas da região lombar, em um estudo²¹ foram consideradas algumas causas conhecidas para o desenvolvimen-

to da lombalgia, como estenose do canal vertebral, espondilolistese da coluna lombar, e hérnia de disco. Essas doenças foram relacionadas com as alterações do ligamento amarelo. A justificativa para a análise do ligamento amarelo se deu devido à sua fisiologia, pois é responsável pela mobilidade e proteção da medula espinhal, sendo composto por 80% de fibras elásticas e 20% de fibras colágenas.

Na referida análise destacaram-se os genes COL4A3, MACC1, HSPA6, PIGC e ACSM5. Todos os genes citados participam do processo de metabolismo de glicose e lipídios via PI3K (via relacionada ao colágeno), estando correlacionados positivamente à espessura do ligamento amarelo. Com exceção MACC1, que não apresentou diferença²¹.

Também foi notado que a hipermetilação do mediador DNMT1 (DNA metiltransferases tipo 1) no ACSM5 acarreta uma hipometilação no ACSM5; dessa forma, a regulação negativa inibe a proliferação de fibrose e promove apoptose de células do ligamento amarelo de pacientes com hipertrofia desse ligamento²¹.

Um outro ponto a ser discutido é o gênero amostral. Um estudo¹⁰, que foi o único a considerar uma possível diferença nesse perfil genético, objetivou correlacionar perfis de metilação de DNA em células T humanas, em casos de dor lombar. Em mulheres, foram identificadas 2496 posições metiladas diferencialmente (DmPs), enquanto em homens foram observadas 490 DmPs.

Os principais genes hipermetilados em mulheres no referido estudo foram: LGALS8, FRMD4A, KLRC4-KLRK1, RAMP1, COL21A, TACSTD2 e RPH3AL; nos homens destacaram-se MYT1L, MYO1D, NUP31 e NOTCH1. Entre os genes hipometilados em mulheres, destacaram-se: NINJ2, MRI1, DTHD1 e MRI1; e nos homens: ZNF718 e PLD6¹⁰.

Embora a lombalgia afete ambos os gêneros, o estudo em questão¹⁰ mostrou a existência de diferenças marcantes na metilação, sugerindo mecanismos fundamentalmente diferentes e a possibilidade de biomarcadores epigenéticos específicos do sexo e abordagens terapêuticas distintas; no entanto, a existência de apenas um artigo em que foi realizada essa correlação dificulta uma análise aprofundada e traz uma perspectiva a ser observada em futuros trabalhos.

Uma outra linha de pesquisa foi abordada em um estudo²⁰ que buscou a identificação da metilação de genes específicos no processo de lombalgia em relação ao exercício físico. Nesse caso, foi observado que os genes PSMD1, PSMD12, PSMA3, PSMB6 e PSMB10 – na via NIK/NF- κ B – estavam hipometilados nas amostras pós-yoga. Os participantes relataram uma redução maior na dor após a execução dos exercícios. Transcritos antisense dos genes KLRK1, KPNB1, LAPTM5, ICAM-3 e RPL23A destacaram-se. KLRK1 é um ativador da citotoxicidade de células NK; da mesma forma, KPNB1 é um regulador chave da sinalização NF- κ B na dor neuropática periférica crônica. Já o LAPTM5 sobressai em relação à dor neuropática e a ICAM-3 e RPL23A. Também foram relatados como desregulados na inóvia de artrite reumatoide.

O NF- κ B pode ser ativado pela via canônica por meio de estímulos que incluem o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 e receptores do tipo *toll*, ou pela via não canônica através do NIK. A via NIK é ativada pelo fator ativador de células β , que é um receptor da família TNF, pelo receptor ativador do NF- κ B e pela linfotóxina. A ativação do NF- κ B é identificada em neurônios glutamatérgicos e pode proteger neurônios através da regulação das reações inflamatórias neuronais e do ambiente neuronal circundante.

As fibras nociceptivas A-delta e C são glutamatérgicas, fornecendo assim um caminho direto para influenciar o processamento da dor; portanto, elas possuem relação com a redução da sensibilidade à dor generalizada vista antes e depois da aplicação da yoga. Então, mesmo que a pesquisa em questão não tenha uma significância estatística por se tratar de um estudo piloto, é possível verificar diferentes genes atuando no processo algico e sua proximidade com o exercício físico. Dessa forma, é possível perceber que as modificações do meio, bem como a prática regular de exercícios, podem exercer influência sobre diferentes genes²⁰.

Alguns estudos necessitaram de um maior controle sobre as variáveis. Duas pesquisas^{14,16} utilizaram camundongos para realizarem suas análises. A vantagem da realização de pesquisas com animais se dá através da quantidade de informações disponíveis devido às práticas laboratoriais e cirúrgicas realizadas nesses grupos amostrais. Além disso, o material biológico fica disponível a critério do pesquisador e o ambiente de estudo pode ser controlado de forma minuciosa, facilitando ainda mais a coleta de informações fidedignas. Foi observado que isso aconteceu em ambos os trabalhos; porém, como a amostra era animal, mesmo que criada através de técnicas cirúrgicas não possuía proximidade com a população-alvo (quando analisados os critérios de vieses). Como foi visto em estudos anteriores, o gênero, bem como circunstâncias ambientais, prática de exercício, entre outros fatores podem afetar as metilações de genes específicos; portanto, seria necessário a avaliação e análise de amostras humanas para obter maiores esclarecimentos e orientar aplicações práticas.

No entanto, um dos estudos mencionados acima¹⁴ apresentou informações importantes ao relacionar a degeneração da placa terminal cartilaginosa (CEP) com uma das principais causas da degeneração do disco intervertebral. Como foi descrito, o Sox-9 é essencial para o desenvolvimento da cartilagem e é um fator de transcrição necessário para a condrogênese e em várias etapas do condrocito. Foi esclarecido, também, que o potenciador de histona metiltransferase do homólogo de zeste2 (EZH2) auxilia na regulação epigenética responsável pela inflamação, pela autoimunidade e por diversas malignidades.

O estudo em questão identificou os efeitos reguladores do EZH2 sobre a expressão de genes relacionados à degeneração e sobre o Sox-9 em condrocitos de placas terminais em camundongos. A superexpressão de Sox-9 pode reverter o efeito do EZH2 e a inibição de EZH2 diminui a degeneração da placa terminal da cartilagem e atenua a progressão da degeneração do disco intervertebral através da desmetilação de Sox-9¹⁴.

No mesmo estudo, além das amostras animais, também foram utilizados humanos para coleta de dados. Os pacientes investigados mostraram que o nível de EZH2 foi hiperativado em condrocitos de pacientes com osteoartrite, sendo induzido através da IL-1 β . Uma alta afinidade de EZH2 com o promotor Sox-9 foi observada em CEPs humanas degeneradas, e o silenciamento de EZH2 pode desencadear a desmetilação de H3K27me3 nas áreas promotoras de Sox-9, levando à alta expressão de Sox-9. No entanto, a superexpressão de EZH2 desativou o Sox-9, catalisando a metilação do H3K27me3 nas áreas promotoras de Sox-9. A inibição do EZH2 pode exercer seu papel protetor ao remover o H3K27me3 do promotor Sox-9¹⁴.

Uma pesquisa¹⁶ também realizou análises com amostras animais, porém sem análise posterior em humanos. O estudo investigou as células do núcleo pulposo (NP): agregano, colágeno tipo II e outros componentes da matriz extracelular (MEC), verificando que estes realizam a manutenção da integridade do disco intervertebral (DIV).

A referida análise levou em consideração que a DNA Metiltransferase 3 Beta (DNMT3B) pode metilar repetições centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas. Já a proteína DNMT3B executa diferentes papéis em doenças, dependendo do contexto. Um inibidor de DNMT3B intensifica a expressão do receptor transitório anquirina 1 (TRPA1) durante a diferenciação de eritroides e megacariócitos. Além disso, o TRPA1 é um canal de cátions encontrado na membrana plasmática de inúmeros tipos de células e é um possível identificador de dor inflamatória¹⁶.

O TRPA1 exerce efeitos anti-inflamatórios e protetores, e também pode promover o desenvolvimento de modificações degenerativas da cartilagem e dores articulares na osteoartrite, quando a expressão de um potencial mediador, a ciclooxigenase 2 (COX-2), é suprimida¹⁶.

A COX-2 é induzida por citocinas pró-inflamatórias e também é um elo chave no desencadeamento de respostas inflamatórias subsequentes. Sabe-se que a hipóxia aumenta a expressão de COX2 em células-tronco mesenquimais, e então ativa a proteína associada Yes (YAP) em células de carcinoma hepatoma e leva ao aumento da proliferação celular. A desregulação da YAP está envolvida na doença do disco intervertebral (DDIV) e no envelhecimento celular. Assim, o DNMT3B pode regular o eixo TRPA1/COX2/YAP para aliviar a DDIV¹⁶. Foi observado que a indução da expressão de DNMT3B aumentou a proliferação e reduziu a apoptose de células NP, a degradação da MEC e a inflamação. DNMT3B, TRPA1 metilado e TRPA1/COX2/YAP mediarão o efeito protetor de DNMT3B em células NP. Nos camundongos com alterações nos discos intervertebrais, a superexpressão de DNMT3B pode aliviar o número e a estrutura das células NP. Assim, os achados indicaram que DNMT3B/TRPA1/COX2/YAP pode ser um novo alvo terapêutico para determinadas alterações nos discos intervertebrais¹⁶.

Isso é condizente com os resultados de um estudo²³ que trabalhou com tecidos do NP de origem humana e que fez considerações importantes a respeito da senescência nessas células, sugerindo que

há um aumento da expressão de ALKBH5 por meio de KDM4A, que reduz a trimetilação de lisina 9 da histona H3 no promotor de ALKBH5, o que aumenta a expressão de ALKBH5. O aumento de ALKBH5, por sua vez, reduz a metilação de m6A do mRNA de DNMT3B, aumentando sua expressão e estabilidade.

A inibição da DNMT3B pode abolir parcialmente a metilação do promotor de E4F1 e restabelecer a expressão de E4F1. De maneira significativa, quando a expressão de E4F1 foi diminuída em células do NP por siRNA, essas células se tornaram senescentes, enquanto a superexpressão de E4F1 em células do NP pode reverter a senescência induzida por TNF α e a expressão forçada de E4F1 pode abolir parcialmente os efeitos pró-senescência de ALKBH5 e DNMT3B. Esses resultados revelam um papel crítico na modificação m6A do mRNA da DNMT3B na senescência de células do NP e na degeneração do disco intervertebral²³.

Um estudo¹⁹ destacou a importância da metilação do TRPA1, gene também mencionado por outra pesquisa¹⁶, em relação à epigenética da dor crônica. O primeiro estudo mostrou uma correlação significativa entre o aumento do nível de metilação do gene TRPA1 em células sanguíneas e o aumento dos escores DN4 (*Douleur Neuropathique 4*), que representam a diversidade de sintomas de dor neuropática. Além disso, foi descrita uma correlação significativa entre a redução da expressão de TRPA1 e o aumento dos escores DN4. O gene TRPA1 foi então associado a um papel fundamental no desenvolvimento da dor crônica em humanos e está relacionado a mudanças funcionais nas interações neuroimunes. Tais análises vão ao encontro dos achados da pesquisa¹⁶ que apontou o gene como um possível marcador de dor inflamatória.

Apesar de a lombalgia ser uma das queixas mais comuns em todo o mundo¹, foram encontrados poucos estudos dentro da epigenética identificando genes específicos na metilação. Assim, pode-se constatar a necessidade de estudos nessa área, contribuindo para o aprimoramento e esclarecimento a respeito do tema.

Além disso, os resultados encontrados apresentaram heterogeneidade no modo de coleta dos dados, tipo de material biológico analisado, objetivo e resultados do estudo, impossibilitando qualquer agrupamento significativo dos dados.

Outro ponto a ser levado em consideração é a etnia da população, além de um critério mais rigoroso em relação a idade, gênero, terapia medicamentosa utilizada, atividade física, entre outras variáveis; uma vez que se entende que a epigenética pode sofrer influência de diversos fatores e o não controle dessas variáveis poderia influenciar no resultado obtido, justificando também os diferentes genes encontrados^{7,8}.

Em relação aos critérios de validade externa, nenhum dos estudos trouxe um tamanho amostral significativo em relação a população alvo. No entanto, como a pesquisa aborda um tema relativamente novo, os genes identificados podem contribuir para a evolução de tratamentos e do conhecimento científico, mostrando a necessidade de mais estudos acerca deste tema.

CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu demonstrando a necessidade de mais estudos a respeito do tema, expondo considerações em relação ao tamanho amostral e controle de variáveis e recomendando, fortemente, que estudos robustos e com baixos níveis de viés sejam executados.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Layse Rafaela Moroti-Perugini

Coleta de Dados, Investigação, Metodologia, Redação - Preparação do Original

Isadora Fernandes Cônsolo

Coleta de Dados

Valeria Aparecida Bello

Conceitualização, Supervisão, Visualização

Regina Célia Poli

Aquisição de Financiamento, Redação - Revisão e Edição, Supervisão, Visualização

REFERÊNCIAS

- Hoy D, Bain C, Williams G, March L, Brooks P, Blyth F, Woolf A, Vos T, Buchbinder R. A systematic review of the global prevalence of low back pain. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):2028-37.
- Kamper SJ, Henschke N, Hestbaek L, Dunn KM, Williams CM. Musculoskeletal pain in children and adolescents. *Braz J Phys Ther*. 2016;20(3):285-84.
- Hartvigsen J, Christensen K, Frederiksen H. Back pain remains a common symptom in old age: a population-based study of 4486 Danish twins aged 70-102. *Eur Spine J*. 2003;12(5):528-34.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1545-602.
- Hoy DG, Smith E, Cross M, Sanchez-Riera L, Blyth FM, Buchbinder R, Woolf AD, Driscoll T, Brooks P, March LM. Reflecting on the global burden of musculoskeletal conditions: lessons learnt from the global burden of disease 2010 study and the next steps forward. *Ann Rheum Dis*. 2015;;74(1):4-7.
- Maniadakis N, Gray A. The economic burden of back pain in the UK. *Pain*. 2000;84(1): 95-103.
- Moix J, Kovacs FM, Martin A, Plana MN, Royela A. Catastrophizing, state anxiety, anger, and depressive symptoms do not correlate with disability when variations of trait anxiety are taken into account. A study of chronic low back pain patients treated in Spanish pain units. *Pain Med*. 2011;12(7):1008-17.
- Battié MC, Videman T, Levalhti E, Gill K, Kaprio J. Heritability of low back pain and the role of disc degeneration. *Pain*. 2007;131(3):272-80.
- Suntsov V, Jovanovic F, Knezevic E, Candido KD, Knezevic NN. Can implementation of genetics and pharmacogenomics improve treatment of chronic low back pain? *Pharmaceutics*. 2020;12(9):894.
- Grégoire S, Cheishvili D, Salmon-Divon M, Dymov S, Topham L, Calderon V, Shir Y, Szyf M, Stone LS. Epigenetic signature of chronic low back pain in human T cells. *Pain Rep*. 2021;3;6(4):e960.
- Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Env Health Persp*. 2006;114(3):A160-7.
- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):358-69.
- Compere SJ, Palmiter RD. DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell*. 1981;25(1):233-40.
- Jiang C, Guo Q, Jin Y, Xu JJ, Sun ZM, Zhu DC, Lin JH, Tian NF, Sun LJ, Zhang XL, Wu YS. Inhibition of EZH2 ameliorates cartilage endplate degeneration and attenuates the progression of intervertebral disc degeneration via demethylation of Sox-9. *EBioMedicine*. 2019;48:619-29.
- Aroke EN, Overstreet DS, Penn TM, Crossman DK, Jackson P, Tollefsbol TO, Quinn TL, Yi N, Goodin BR. Identification of DNA methylation associated enrichment pathways in adults with non-specific chronic low back pain. *Mol Pain*. 2020;16:1744806920972889.
- Luo Z, Ma Y, Di T, Ma B, Li H, An J, Wang Y, Zhang H. DNMT3B decreases extracellular matrix degradation and alleviates intervertebral disc degeneration through TRPA1 methylation to inhibit the COX2/YAP axis. *Aging*. 2021;;13(16):20258-76.
- Suri P, Boyko EJ, Smith NL, Jarvik JG, Williams FM, Jarvik GP, Goldberg J. Modifiable risk factors for chronic back pain: insights using the co-twin control design. *Spine J*. 2017;17(1):4-14.
- Hoy D, Brooks P, Woolf A, Blyth F, March L, Bain C, Baker P, Smith E, Buchbinder R. Assessing risk of bias in prevalence studies: modification of an existing tool and evidence of interrater agreement. *J Clin Epidemiol*. 2012;65(9):934-9.
- Sukenaga N, Ikeda-Miyagawa Y, Tanada D, Tunetoh T, Nakano S, Inui T, Satoh K, Okutani H, Noguchi K, Hirose M. Correlation between DNA methylation of TRPA1 and chronic pain states in human whole blood cells. *Pain Med*. 2016;17(10):1906-10.
- Adhikari B, Starkweather A, Xu W, Acabchuk RI, Ramesh D, Eze B, Yang Y, Yang Gs, Walker J, Laubenbacher R, Park CL. A feasibility study on yoga's mechanism of action

- for chronic low back pain: psychological and neurophysiological changes, including global gene expression and DNA methylation, following a yoga intervention for chronic low back pain. *Pilot Feasibility Stud.* 2022;8(1):142.
21. Cao Y, Zhan Y, Qiu S, Chen Z, Gong K, Ni S, Duan Y. Integrative analysis of genome-wide DNA methylation and single-nucleotide polymorphism identified ACSM5 as a suppressor of lumbar ligamentum flavum hypertrophy. *Arthritis Res Ther.* 2021;23(1):251.
 22. Ruffilli A, Neri S, Manzetti M, Barile F, Viroli G, Traversari M, Assirelli E, Vita F, Geraci G, Faldini C. Epigenetic factors related to low back pain: a systematic review of the current literature. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):1854.
 23. Li G, Luo R, Zhang W, He S, Wang B, Liang H, Song Y, Ke W, Shi Y, Feng X, Zhao K, Wu X, Zhang Y, Wang K, Yang C. M6A hypomethylation of DNMT3B regulated by ALKBH5 promotes intervertebral disc degeneration via E4F1 deficiency. *Clin Transl Med.* 2022;12(3):e765.

