

Variação do gene fator de crescimento endotelial vascular como preditor de risco para a degeneração discal

Vascular endothelial growth factor gene variations as a risk predictor in disc degeneration

Aline Amaro¹, Ana Beatriz Guerra¹, Matheus Pippa Defino¹, Luiz Angelo Vieira¹,
Carla Peluso¹, Bianca Bianco¹, Luciano Miller Reis Rodrigues¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a frequência dos polimorfismos no gene fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), bem como identificar potencial haplótipo de risco entre as regiões polimórficas deste gene em pacientes com degeneração discal e em Grupo Controle. **Métodos:** Este estudo analisou 217 pacientes distribuídos nos Grupos Degeneração Discal e Grupo Controle. Foi coletado sangue periférico de todos os pacientes para a detecção dos polimorfismos do gene *VEGF* identificados por qPCR (rs699947, rs1570360, rs2010963, rs833061 e rs3025039). Todos os pacientes que apresentaram degeneração discal tiveram a confirmação por meio de ressonância magnética nuclear e avaliação do nível de degeneração do disco. **Resultados:** Todos os polimorfismos foram encontrados no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) na população estudada. A frequência genotípica para o Grupo Degeneração de Disco e do Grupo Controle foi rs699947 $p=0,475$, rs1570360 $p=0,862$, rs2010963 $p=0,823$, rs833061 $p=0,596$ e rs3025039 $p=0,230$. Para a análise do haplótipo, destacaram-se as composições CAGGC ($p=0,094$) e CCGGC ($p=0,054$). **Conclusão:** A correlação entre os polimorfismos do gene *VEGF* como preditor de risco para degeneração discal foi negativa na população estudada. No entanto, o *VEGF* possui grande região polimórfica, ativada por vários fatores catabólicos e metabólicos no processo de degeneração discal, que não está completamente elucidado.

Descritores: Polimorfismo genético; Fator A de crescimento do endotélio vascular/genética; Degeneração do disco intervertebral

ABSTRACT

Objective: To evaluate the frequency of polymorphisms in the vascular endothelial growth factor (*VEGF*) gene, as well as to identify a potential risk haplotype among the polymorphic regions in this gene in patients with disc degeneration and in the Control Group. **Methods:**

This study analyzed a total of 217 individuals distributed into the Disc Degeneration and Control Groups. Peripheral blood was collected from all patients to detect *VEGF* gene polymorphisms identified by qPCR (rs699947, rs1570360, rs2010963, rs833061 and rs3025039). All patients presenting disc degeneration had the confirmation by nuclear magnetic resonance test and were rated according to disc degeneration level. **Results:** All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$) in the studied population. The genotypic frequency for Disc Degeneration and Control Group were rs699947 $p=0.475$, rs1570360 $p=0.862$, rs2010963 $p=0.823$, rs833061 $p=0.596$ and rs3025039 $p=0.230$. In haplotype analysis, the compositions CAGGC ($p=0.094$) and CCGGC ($p=0.054$) stood out. **Conclusion:** The correlation between *VEGF* gene polymorphism as a risk predictor for disc degeneration was negative in the studied population. However, the *VEGF* gene has a large polymorphic region, and it is activated by various catabolic and metabolic factors in the disc degeneration process, which has not been fully elucidated.

Keywords: Polymorphism, genetic; Vascular endothelial growth factor A/genetics; Intervertebral disc degeneration

INTRODUÇÃO

A lombalgia é um dos problemas de saúde mais comuns na sociedade – entre 50 e 80% dos indivíduos relatam pelo menos um episódio durante a vida – e é causa frequente de faltas no trabalho e utilização de serviços de saúde.⁽¹⁾ Entre os processos patológicos que podem afetar o disco intervertebral, sua degeneração é considerada o principal fator causador de lombalgia e lumbosciatalgia.⁽²⁻⁵⁾ Tal degeneração ocorre primariamente como resultado do envelhecimento do disco

¹ Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

Autor correspondente: Aline Amaro – Avenida Lauro Gomes, 2.000, Prédio CEPES, 2º andar – Vila Sacadura Cabral – CEP: 09060-870 – Santo André, SP, Brasil – Tel.: (11) 4993-5464
E-mail: aline.amaro.santos@hotmail.com

Data de submissão: 10/4/2017 – Data de aceite: 22/8/2017

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082017AO4053

intervertebral; porém, a degeneração discal também acomete pacientes jovens. Há hipóteses de que fatores genéticos e ambientais, bem como os fatores de risco sobrecarga de trabalho, tabagismo, sobrepeso, obesidade e sedentarismo⁽⁶⁾ contribuíam cada vez mais para o aparecimento de dor crônica associada à degeneração discal em indivíduos mais jovens.⁽⁷⁾

Anatomicamente, o disco intervertebral é formado por três principais estruturas: placas terminais cartilaginosas, núcleo pulposo central e ânulo fibroso, localizado na periferia do disco.^(8,9) O disco intervertebral lombar é o maior tecido avascular, e seu processo de nutrição ocorre principalmente pela vasculatura adjacente por meio da difusão das placas terminais vertebrais. Desta forma, há sugestões de que alterações no fluxo sanguíneo do disco intervertebral podem levar à degeneração discal.⁽¹⁰⁾ Além disto, pode ocorrer involução de vasos sanguíneos no disco degenerado pela placa terminal vertebral ou pelo ânulo fibroso.⁽¹¹⁾

Considerando-se que a angiogênese ocorre simultaneamente ao processo de degeneração discal, é possível presumir que genes a ela relacionados possam determinar o risco de desenvolvimento de degeneração discal.⁽¹¹⁾ Assim, polimorfismos em genes previamente implicados em angiogênese podem contribuir para a etiologia da degeneração do disco intervertebral.

Um dos mais importantes peptídeos relacionados à angiogênese é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), codificado pelo gene *VEGF* e altamente polimórfico, localizado no cromossomo 6p21.3, e que contém 14kb na região codificadora, com oito éxons e sete íntrons.⁽¹²⁾

O *VEGF* opera direta e seletivamente por meio dos receptores de VEGFR-1 e VEGFR-2, expressos predominantemente e, talvez, exclusivamente no endotélio vascular. A conexão do *VEGF* a estes receptores causa alterações no formato das células, divisão e migração celular, e influxo citoplasmático de cálcio, aumentando sua concentração em até quatro vezes. O aumento da permeabilidade venosa para as macromoléculas permite que as proteínas plasmáticas se espalhem por todo o espaço vascular, levando à coagulação do fibrinogênio e deposição de gel de fibrina, o que funciona como matriz provisória para o crescimento de novos vasos sanguíneos. A maior permeabilidade microvascular parece invariavelmente preceder e/ou suceder a angiogênese em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, o que faz o gene *VEGF* ser considerado um importante mediador da angiogênese.⁽¹²⁾

Considerando-se a influência do *VEGF* na formação de novos vasos, e a importância da nutrição dos discos

intervertebrais para sua vitalidade, levantamos a hipótese de uma possível relação entre os polimorfismos do gene *VEGF* e a degeneração discal.

OBJETIVO

Avaliar a frequência de polimorfismos e o haplótipo do gene fator de crescimento endotelial vascular [-2578C/A (rs699947), -1154G/A (rs1570360), +405G/C (rs2010963), -460T/C (rs833061) e +936C/T (rs3025039)] em pacientes com degeneração discal e no Grupo Controle.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal com 217 indivíduos selecionados e divididos em dois grupos: pacientes com lombalgia crônica (Grupo Caso) e indivíduos saudáveis (Grupo Controle). Os participantes foram analisados para investigar-se a presença de cinco polimorfismos do gene *VEGF* [-2578C/A (rs699947), -1154G/A (rs1570360), +405G/C (rs2010963), -460T/C (rs833061) e +936C/T (rs3025039)].

Para o Grupo Caso, foram selecionados 110 pacientes com lombalgia crônica do Grupo de Especialidades Clínicas – Cirurgia de Coluna Vertebral do Hospital Estadual Mário Covas, coordenado pela disciplina Doenças do Sistema Locomotor, da Faculdade de Medicina do ABC, em Santo André (SP), Brasil. Os critérios de inclusão utilizados foram paciente com lombalgia crônica (há mais de 3 meses); idade inferior a 50 anos; ressonância magnética para confirmação de degeneração discal em pelo menos um disco, analisado principalmente no plano sagital em T2, incluindo os discos entre L4 e L5, e, L5 e S1. A degeneração discal foi classificada utilizando-se o sistema de classificação de Pfirrmann et al.,⁽¹³⁾ e o diagnóstico foi confirmado por dois radiologistas após teste de ressonância magnética nuclear. Foram adotados os seguintes critérios de exclusão: pacientes previamente submetidos a tratamento cirúrgico; com deformidades congênitas da coluna vertebral; e com hérnia de disco lombar.

Para o Grupo Controle, foram coletadas amostras de 107 indivíduos saudáveis sem deformidades da coluna vertebral ou história de lombalgia, atendidos no Ambulatório da Faculdade de Medicina do ABC. Os seguintes critérios de inclusão foram baseados em observações clínicas: ter entre 20 e 45 anos de idade; sem história de cirurgia da coluna; sem história de tratamento para hérnia de disco; sem história de hospitalização por lombalgia; sem uso de medicamentos para lombalgia por mais de 7 dias; e que não tivessem familiares com menos de 50 anos de idade com hérnia de disco ou tratamento clínico para lombalgia.

O recrutamento de todos os pacientes e a metodologia adotada foram realizados entre janeiro de 2015 e novembro de 2016. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC, sob protocolo 1.142.930, CAAE: 45904515.9.0000.0082.

Estudo do polimorfismo

Foram coletados 4mL de sangue periférico para a extração do DNA, de acordo com o protocolo de Lahiri e Nurnberger (1991) pelo método de *salting-out*. O DNA obtido foi quantificado e qualificado por espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000 e diluído até a concentração padrão de 25ng/μL.

Os polimorfismos C-2578A/rs699947, G-1154A/rs1570360, G+405C/rs2010963, T-460C/rs833061 e C+936T/rs3025039 (Tabela 1) foram identificados por reação em cadeia (PCR) em tempo real quantitativa. Os ensaios TaqMan foram adquiridos comercialmente da Life Technologies® (Foster City, CA, EUA). Os ensaios foram feitos com TaqMan Genotyping Master Mix, com 50ng de DNA por reação. As condições da PCR estavam de acordo com as recomendações do fabricante: desnaturação inicial a 95°C (15 minutos), seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C (15 segundos) e anelamento/extensão a 60°C (1 minuto).

Tabela 1. Polimorfismos do gene fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) e os respectivos ensaios TaqMan

Gene	Localização	Polimorfismo	rs	Ensaio TaqMan
<i>VEGF</i>	6: 43736389	C2578A	rs699947	C__8311602_10
	6: 43737830	G-1154A	rs1570360	C__1647379_10
	6: 43738350	G405C	rs2010963	C__8311614_10
	6: 43737486	T-460C	rs833061	C__1647381_10
	6: 43752536	C+936T	rs3025039	C__16198794_10

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do programa *Stata* 11.0. Foi utilizado o *Genetic Power Calculator*⁽¹⁴⁾ para estimar o poder estatístico dos resultados relacionados aos dados individuais de polimorfismo.

O teste χ^2 foi utilizado para comparar a frequência dos genótipos e alelos entre os grupos, e estimar o equilíbrio Hardy-Weinberg. A *odds ratio* (OR) foi calculada em relação à presença do genótipo de referência, por meio de um modelo de regressão logística. O nível de significância estabelecido foi de 0,05 ($\alpha < 0,05$). Além disso, a associação entre o genótipo combina-

do de polimorfismos do gene *VEGF* e o risco de degeneração discal também foi avaliada pelo estudo de haplótipos por meio do programa *Haploview*, versão 4.1 (<http://www.hapmap.org>).

RESULTADOS

As características da amostra estão demonstradas na tabela 2.

Tabela 2. Características dos pacientes

Características	Degeneração discal	Controle
Idade	39,2±7,58	32,3±7,17
Sexo, n (%)		
Masculino	53 (48)	22 (21)
Feminino	57 (52)	85 (79)
Etnia, n (%)		
Branco	62 (56)	69 (65)
Negro	32 (29)	26 (24)
Sem resposta	16 (15)	12 (11)

A análise dos polimorfismos do gene *VEGF* foi feita em todos os participantes do estudo. Podem ser observadas a frequência dos alelos e a frequência polimórfica para rs699947, rs1570360, rs2010963, rs833061 e rs3025039 na tabela 3. O poder calculado do tamanho da amostra do teste foi <0,50 (0,05) para o Grupo Degeneração Discal, considerando-se os polimorfismos estudados.

Não foram observadas diferenças significativas nos polimorfismos do gene *VEGF* estudados. Ademais, descrevemos o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e todos os polimorfismos estavam em equilíbrio na população estudada. Os mesmos dados foram aplicados na análise dos haplótipos para estimar se havia correlação entre os polimorfismos estudados (Tabela 4).

Os resultados da haplotipagem identificaram dois blocos de haplótipos que envolviam todos os polimorfismos estudados. O primeiro, CAGGC, apresentava correlação com a presença de degeneração discal ($p=0,094$), ao passo que o CCGGC mostrou-se mais presente no Grupo Controle ($p=0,054$).

DISCUSSÃO

O presente estudo não encontrou correlação entre os polimorfismos de *VEGF* e a degeneração discal em indivíduos brasileiros. Todavia, observamos correlação entre o haplótipo CAGGC e a degeneração discal, além de uma maior presença do haplótipo CCGGC no Grupo

Tabela 3. Frequência de polimorfismos do gene fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) na população com degeneração discal intervertebral e na população controle

<i>VEGF</i> SNP	População Estudada	Genótipos			Alelos		Valor de p	OR (IC95%)	HWE
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)			
rs3025039	Controle	CC	CT	TT	C	T	0,230	1,49 (0,83-2,65)	0,875
		81 (73,7)	26 (23,6)	3 (2,7)	188 (85,5)	32 (15,4)			
+936C/T	Casos	85 (79,4)	22 (20,6)	0 (0)	192 (89,7)	22 (10,3)			0,495
rs833061	Controle	CC	CT	TT	C	T	0,596	0,88 (0,60-1,30)	0,752
		19 (17,3)	58 (52,7)	33 (30)	96 (43,6)	124 (56,4)			
-460C/T	Casos	13 (12,2)	61 (57,0)	33 (30,8)	87 (40,7)	127 (59,3)			0,171
rs699947	Controle	CC	CA	AA	C	A	0,475	0,76 (0,52-1,13)	0,924
		17 (15,5)	55 (50,0)	38 (34,5)	89 (40,5)	131 (59,5)			
-2578C/A	Casos	9 (8,4)	55 (51,4)	43 (40,2)	73 (34,1)	141 (65,9)			0,332
rs1570360	Controle	GG	GA	AA	G	A	0,862	1,07 (0,68-1,67)	0,321
		67 (60,9)	34 (30,9)	9 (8,2)	168 (76,4)	52 (23,6)			
-1154G/A	Casos	64 (59,8)	38 (35,5)	5 (4,7)	166 (77,6)	48 (22,4)			0,977
rs2010963	Controle	GG	GC	CC	G	C	0,823	1,07 (0,71-1,60)	0,817
		49 (44,5)	51 (46,4)	10 (9,1)	149 (67,7)	71 (32,3)			
+405G/C	Casos	50 (46,8)	48 (44,8)	9 (8,4)	148 (69,2)	66 (30,8)			0,867

SNP: single nucleotide polymorphism; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium.

Tabela 4. Análise dos haplótipos dos polimorfismos rs8330661, rs699947, rs1570360, rs2010963 e rs3025039 do gene fator de crescimento endotelial vascular em pacientes com degeneração discal e em indivíduos do Grupo Controle

Haplótipo*	Degeneração discal (%)	Controles (%)	Valor de p
TCGCC	26,7	26,3	0,923
TCGGC	21,7	27,9	0,136
CAAGC	19,3	19,3	0,995
CAGGC	14,7	9,5	0,094
TCGCT	5,4	4,0	0,474
CCGGC	2,4	6,1	0,054
CAAGT	3,9	3,1	0,649
CAGGT	2,5	1,7	0,584
TCGGT	2,0	1,1	0,450

* Haplótipo dos polimorfismos rs8330661(T/C), rs699947 (C/A), rs1570360 (G/A), rs2010963 (G/C) e rs3025039 (C/T).

Controle. O disco intervertebral é um tecido avascular, mas os vasos adjacentes fornecem os nutrientes adequados e removem os resíduos metabólicos, e estes processos são importantes para manter o disco saudável.

Nos estágios da angiogênese, diversos fatores contribuem para este processo: citocinas (polipeptídeos), enzimas, componentes da matriz extracelular e moléculas de superfície. Há dois fatores que estimulam primariamente o crescimento do endotélio vascular – VEGF e FGF-2. David et al.,⁽¹⁵⁾ confirmaram, por meio de exames imuno-histoquímicos, a presença deste polipeptídeo do VEGF em hérnias de disco intervertebrais e/ou em degenerações discais. Porém, ainda não está claro como a expressão do VEGF neste tecido é alterada em hérnias de disco e na degeneração discal.⁽¹⁶⁾

Alguns autores^(17,18) já associaram a expressão do *VEGF* ao tecido discal degenerado. Lee et al.,⁽¹⁷⁾ concluíram que seria necessária a ativação da interleucina (IL) 1 β durante a degeneração discal, para permitir a expressão de *VEGF*, NGF e BDNF, resultando na angiogênese. Porém, Lu et al.,⁽¹⁸⁾ encontraram um índice positivo da expressão do *VEGF* de 73,42% (116/156) na degeneração discal. Nos casos em que o tecido do disco intervertebral estava normal, não havia expressão positiva de *VEGF*. Além disto, tal expressão mostra-se maior em discos com infiltração vascular, do que em discos sem esta infiltração.

Um dos mecanismos que poderia justificar este fato seria a presença de polimorfismos no gene *VEGF*, o que alteraria sua expressão. A alteração no gene, causada por polimorfismos, e sua expressão já foram demonstradas em estudos clínicos. Para os polimorfismos -2578A e -1154A do *VEGF*, há uma diminuição da expressão do *VEGF*; porém, *VEGF*-634G > C SNP foi correlacionado a uma diminuição da capacidade de produzir *VEGF*.^(10,19,20)

Awata et al.,⁽²¹⁾ propuseram que o alelo *VEGF* -634C está associado ao aumento de níveis de transcrição de *VEGF*, ao passo que Lambrechts et al.,⁽²²⁾ relataram que o *VEGF*-634G está associado a uma menor expressão de *VEGF*. Porém, nenhum biomarcador de *VEGF* foi totalmente associado à lombalgia e a seus mecanismos.⁽²³⁾

Han et al.,⁽²⁴⁾ observaram que a frequência da combinação dos genótipos *VEGF*-2578CA + AA/-634CC mostra-se mais alta em pacientes com degeneração dis-

cal. Ademais, consideram que o alelo *VEGF*-634C pode ser importante na suscetibilidade ao desenvolvimento da degeneração. Este foi um dos primeiros estudos feitos com a população coreana correlacionando o gene *VEGF* à degeneração discal.⁽²⁵⁾

Neste trabalho, foram estudados os polimorfismos rs699947, rs1570360, rs2010963, rs833061 e rs3025039, e não foram observadas diferenças significativas nestes polimorfismos em relação à degeneração discal. A frequência dos polimorfismos, mesmo entre os alelos, não diferiu entre os Grupos Caso e Controle. No entanto, para a análise dos haplótipos, observamos tendência de significância para o haplótipo CCGGC, e os pacientes com esta combinação apresentavam maior proteção contra o desenvolvimento de degeneração discal. Estudos relacionando a degeneração discal e polimorfismos no gene *VEGF* são raros na literatura, sendo o presente trabalho muito relevante para a comunidade acadêmica.

Esta divergência entre os resultados mostra que diferentes mecanismos podem ativar a transcrição genética do *VEGF*. Binch et al.,⁽¹⁶⁾ estudaram a expressão de citocinas e descreveram as respostas mediadas por elas, mostrando efeitos mínimos na degeneração discal. Porém, células do núcleo pulposo podem regular o crescimento de células endoteliais em um processo de degeneração discal por meio de vias catabólicas, levando à lomboscotalgia.⁽²⁶⁾ Por outro lado, não se sabe exatamente em qual estágio da degeneração discal o processo de neovascularização é ativado, mas fatores como tabagismo, sobrepeso e prática de exercício também podem influenciar no processo de angiogênese.⁽¹⁵⁾

Polimorfismos são fatores importantes para o entendimento da diferença entre expressões genéticas, como em tecidos normais ou patológicos, mas atualmente são pouco observados na prática clínica. Neste estudo com a população brasileira, não foram encontradas associações entre os polimorfismos do *VEGF* e a degeneração discal. No entanto, considerando-se que muitos polimorfismos podem ter um efeito de adição, a análise dos haplótipos ainda pode ser explorada, aumentando-se o tamanho da amostra.

O tamanho da amostra de nosso estudo pode representar grande limitação. Porém, o pequeno número de pacientes estudados é resultado do critério de seleção, já que todos os pacientes incluídos neste estudo apresentavam apenas degeneração discal, sem história de cirurgia, e com idade menor que 47 anos. Por outro lado, as amostras apresentavam-se dentro do equilíbrio Hardy-Weinberg, permitindo as análises de genótipos e haplótipos. Outra limitação do estudo pode ser atribuí-

da ao fato de que os exames de ressonância magnética não foram avaliados no Grupo Controle; porém, o critério de exclusão utilizado foi bastante rígido.

O presente estudo ainda apresenta diversos pontos fortes. O campo genético foi identificado como promissor, aumentando as chances de melhor entendimento sobre cada condição que pode afetar a saúde de um indivíduo. A lombalgia é, muitas vezes, subdiagnosticada, sendo tratados apenas os sintomas. O compartilhamento de novas ferramentas para o diagnóstico, o tratamento e a prevenção de doenças é imprescindível para o entendimento de problemas de saúde.

CONCLUSÃO

A presença de polimorfismos do gene *VEGF* como preditor de risco para degeneração discal foi negativa na população estudada. Porém o gene *VEGF* tem grande região polimórfica, sendo ativado por diversos fatores catabólicos e metabólicos no processo de degeneração discal, mas este processo ainda não está totalmente claro.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (nº. 13/00902-4).

REFERÊNCIAS

1. Andersson GB. Epidemiology of low back pain. Acta Orthop Scand Suppl. 1998;281:28-31.
2. Luoma K, Riihimäki H, Luukonen R, Raininko R, Viikari-Juntura E, Lamminen A. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. Spine (Phila Pa 1976). 2000;25(4):487-92.
3. Gunzburg R, Fraser RD, Fraser GA. Lumbar intervertebral disc prolapse in teenage twins. A case report and review of the literature. J Bone Joint Surgery Br. 1990;72(5):914-6. Review.
4. Richardson JK, Chung T, Schultz JS, Hurvitz E. A familial predisposition toward lumbar disc injury. Spine (Phila Pa 1976). 1997;22(13):1487-92; discussion 1493.
5. Simmons ED Jr, Guntupalli M, Kowalski JM, Braun F, Seidel T. Familial predisposition for degenerative disc disease: A case-control study. Spine (Phila Pa 1976). 1996;21(13):1527-9.
6. Battié MB, Videman T, Levälähti E, Gill K, Kaprio J. Genetic and environmental effects on disc degeneration by phenotype and spinal level: a multivariate twin study. Spine (Phila Pa 1976). 2008;33(25):2801-8.
7. Bishwajit G, Tang S, Yaya S, Feng Z. Participation in physical activity and back pain among an elderly population in South Asia. J Pain Res. 2017;10:905-13. eCollection 2017.
8. Bernick S, Cailliet R. Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae. Spine (Phila Pa 1976). 1982;7(2):97-102.
9. Maroudas A, Stockwell RA, Nachemson A, Urban J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. J Anat. 1975;120(Pt 1):113-30.

10. Niinimäki J, Korkiakoski A, Parviainen O, Haapea M, Kuisma M, Ojala RO, et al. Association of lumbar artery narrowing, degenerative changes in disc and endplate and apparent diffusion in disc on postcontrast enhancement of lumbar intervertebral disc. *MAGMA*. 2009;22(2):101-9.
11. Moore RJ. The vertebral endplate: disc degeneration, disc regeneration. *Eur Spine J*. 2006;15 Suppl 3:S333-7. Review.
12. Haro H, Kato T, Komori H, Osada M, Shinomiya K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) -induced angiogenesis in herniated disc resorption. *J Orthop Res*. 2002;20(3):409-15.
13. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(17):1873-8.
14. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*. 2003;19(1):149-50.
15. David G, Ciurea AV, Iencean SM, Mohan A. Angiogenesis in the degeneration of the lumbar intervertebral disc. *J Med Life*. 2010;3(2):154-61.
16. Binch LA, Cole AA, Breakwell LM, Michael AR, Chiverton N, Cross AK, et al. Expression and regulation of neurotrophic and angiogenic factors during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(5):416.
17. Lee JM, Song JY, Baek M, Jung HY, Kang H, Han IB, et al. Interleukin-1 β induces angiogenesis and innervation in human intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res*. 2011;29(2):265-9.
18. Lu XY, Ding XH, Zhong LJ, Xia H, Chen XD, Huang H. Expression and significance of VEGF and p53 in degenerate intervertebral disc tissue. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(1):79-81.
19. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000;12(8):1232-5.
20. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(5):1635-9.
21. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, et al. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333(3):679-85.
22. Lambrechts D, Devriendt K, Driscoll DA, Goldmuntz E, Gewillig M, Vlietinck R, et al. Low expression VEGF haplotype increases the risk for tetralogy of Fallot: a family based association study. *J Med Genet*. 2005;42(6):519-22.
23. Weber KT, Satoh S, Alipui DO, Virojanapa J, Levine M, Sison C, et al. Exploratory study for identifying systemic biomarkers that correlate with pain response in patients with intervertebral disc disorders. *Immunol Res*. 2015;63(1-3):170-80.
24. Han IB, Ropper AE, Teng YD, Shin DA, Jeon YJ, Park HM, et al. Association between VEGF and eNOS gene polymorphisms and lumbar disc degeneration in a young Korean population. *Genet Mol Res*. 2013;12(3):2294-305.
25. Martirosyan NL, Patel AA, Carotenuto A, Kalani MY, Belykh E, Walker CT, et al. Genetic alterations in intervertebral disc disease. *Front Surg*. 2016;21(3):59. eCollection 2016. Review.
26. de Campos MF, de Oliveira CP, Neff CB, Correa OM, Pinhal MA, Rodrigues LM. Studies of molecular changes in intervertebral disc degeneration in animal model. *Acta Ortop Bras*. 2016;24(1):16-21.