

**FACULDADE DE MEDICINA DO ABC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARCELO FERRAZ DE CAMPOS

**ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO LIGAMENTO AMARELO E
DO DISCO INTERVERTEBRAL NAS DOENÇAS DEGENERATIVAS DA
COLUNA**

**SANTO ANDRÉ
2016**

**FACULDADE DE MEDICINA DO ABC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARCELO FERRAZ DE CAMPOS

**ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO LIGAMENTO AMARELO E
DO DISCO INTERVERTEBRAL NAS DOENÇAS DEGENERATIVAS DA
COLUNA**

**SANTO ANDRÉ
2016**

MARCELO FERRAZ DE CAMPOS

**Alterações da Matriz Extracelular do Ligamento Amarelo e do Disco
Intervertebral nas Doenças Degenerativas da Coluna**

Tese elaborada nas Disciplinas de Ortopedia e Bioquímica da Faculdade de Medicina do ABC, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, junto ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina do ABC, (recomendado pelo Conselho Técnico-Científico CAPES – Parecer 279.202/2003).

Área de Concentração: Medicina Celular e Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal

Orientador: Prof. Dr. Luciano Miller Reis Rodrigues

**SANTO ANDRÉ
2016**

C198a Campos, Marcelo Ferraz de

Alterações da matriz extracelular do ligamento amarelo e do disco intervertebral nas doenças degenerativas da coluna. / Marcelo Ferraz de Campos. -- Santo André, SP, 2016.

87 f.: il.color. 31 cm.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Comissão de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina do ABC.

Área de concentração: Medicina Celular e Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal

Orientador: Prof. Dr. Luciano Miler Reis Rodrigues

1. Degeneração do disco intervertebral.
2. Ligamento amarelo.
3. Estenose espinal.
4. Coluna vertebral.
5. Matrix extracelular.

CDD: 616.73

NLM: WE550

DEDICATÓRIA

*Ao Prof. Dr. Douglas Alberto Ferraz de Campos e a Profa.
María Aparecida Strático de Campos, meus pais, que
tenho como exemplo de orientadores.*

*A minha esposa Sílvia Cristina, fonte de inspiração na
minha vida, pela participação intensa e incentivo para a
realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Medicina do ABC**, instituição onde pude amadurecer e desenvolver o meu trabalho.

Ao **Prof. Dr. Adilson Casemiro**, Diretor da Faculdade de Medicina do ABC, pela oportunidade que me foi dada.

Ao **Prof. Dr. Luciano Miller Reis Rodrigues**, cuja amizade, confiança e orientação, tornaram possível a realização deste trabalho.

À **Prof. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal**, com carinho, pelos ensinamentos, paciência, incentivo e dedicação.

À **Prof. Dra. Thérèse Rachell Theodoro** e ao **Prof. Dr. Renan Pelluzzi Cavaleiro**, do laboratório de Biologia Molecular, pela inestimável colaboração na realização dos resultados de minhas pesquisas.

À **Dra. Renata Salatini**, pelo apoio, principalmente nos momentos mais difíceis, e pela dedicação na elaboração desse trabalho.

A todos os **Diretores da Associação Paulista de Medicina de São Bernardo do Campo** pelo apoio e incentivo recebido.

Ao **Dr. Sérgio Listik**, pela amizade e contribuição em minha formação.

Aos meus amigos **Dr. João Carlos de Campos Guerra**, **Dr. José Carlos Rodrigues Junior** e **Dr. João Eduardo Charles**, que participaram não somente no desenvolvimento desta tese, mas também da história da minha vida.

RESUMO

Introdução: Os discos intervertebrais e o ligamento amarelo são estruturas importantes para a estabilidade da coluna vertebral. O disco intervertebral é constituído de duas regiões anatómicas distintas, o núcleo pulposo, a camada mais interna, menos estruturada e rica em proteoglicanos, glicoproteínas e água, circundado pelo anel fibroso rico em fibrocartilagem. O ligamento amarelo, também denominado ligamento flavum, é formado essencialmente por proteínas fibrosas (fibras elásticas e colágenos) e encontra-se localizado posterior e lateralmente ao canal vertebral, conectando as lâminas vertebrais adjacentes. Dentre os fatores predisponentes do processo de degeneração discal e alterações do ligamento amarelo podemos destacar o envelhecimento, tabagismo, fatores genéticos e traumáticos. **Objetivo:** O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o perfil de componentes da matriz extracelular nas alterações do disco intervertebral e do ligamento amarelo da coluna lombar em doenças degenerativas. **Método:** O presente estudo é constituído por três manuscritos. O primeiro manuscrito avalia o perfil de glicosaminoglicanos do ligamento amarelo de amostras coletadas de pacientes com doenças degenerativas da coluna lombar. O segundo artigo (já publicado), analisa alterações moleculares que ocorrem no disco intervertebral durante a degeneração e avalia componentes da matriz extracelular (colágeno tipo I, metaloproteases-2, metaloprotease-9 e heparanases), também foram investigadas moléculas envolvidas com o processo inflamatório como Interleucina-6, interleucina-10, VEGF e caspase-3. O terceiro e último artigo (já publicado), investiga a expressão das metaloproteases e do TGF- β em pacientes com estenose do canal vertebral e hérnia discal lombar. **Resultados:** Os resultados demonstraram correlação direta entre aumento da expressão de condroitim sulfato e maior espessura do ligamento amarelo que ocorre durante o processo de degeneração. No segundo artigo foi possível observar alterações significativas de constituintes da matriz extracelular, bem como moléculas envolvidas com o processo inflamatório, havendo diferenças quando comparados 15 e 28 dias após indução da degeneração do disco intervertebral em ratos. O terceiro artigo evidencia apenas uma tendência ao aumento do TGF- β em pacientes acometidos por degeneração discal com idade mais avançada. **Considerações Finais:** Os resultados obtidos em todos os estudos evidenciam alterações moleculares significativas que podem elucidar mecanismos moleculares envolvidos com o processo degenerativo do disco e ligamento da coluna vertebral.

Palavras-chave: Degeneração do Disco Intervertebral, Ligamento Amarelo, Estenose Espinal, Coluna Vertebral, Matriz Extracelular.

ABSTRACT

Introduction: The intervertebral discs and yellow ligament are important structures for the stability of the spine. Intervertebral disc comprise two different anatomical regions, the nucleus pulposus, internal layer that is less organized, rich in proteoglycans, glycoproteins and water, surrounded by the annulus fibrosus, composed by fibrocartilage. The yellow ligament, also known as flavum ligament, consists of fibrous proteins (collagen and elastic fibers) and is located posterior and laterally to the vertebral spine, which connects adjacent vertebral laminae. Among predisposing factors involved in the disc degeneration process and alterations of the yellow ligament we can highlight age, smoking habit, genetic and traumatic factors. **Objective:** The objective of our study was to evaluate the profile of extracellular matrix components in the intervertebral disc and the flavum ligament in the spine degenerative process. **Method:** The study consists of three manuscripts. The first manuscript evaluates glycosaminoglycans profile observed in the flavum ligament collected from patients with spine degeneration. The second paper (already published), analyzes molecular changes that occur in the degeneration of the intervertebral disc and evaluates extracellular matrix compounds, such as collagen type I, metalloproteases-2 metalloprotease-9, heparanase, as well as molecules involved in the inflammation process, like interleukin-6, interleukin-10, VEGF and caspase-3. The third and final article (already published), investigates the expression of metalloproteinases and TGF- β in the spine stenosis and lumbar disc herniation. **Results:** The results demonstrated a direct correlation between increased expression of chondroitin sulfate and thickness of the flavum ligamentum. In the second article a significant alteration was observed in the extracellular matrix, as well as the molecules involved in the inflammatory process. However, no difference was observed comparing 15th and 28th days after intervertebral disc degeneration induction in rats. The third article shows a tendency of TGF- β enhancement in older patients affected by disc degeneration. **Final Thoughts:** The results obtained in all studies show significant molecular changes that may elucidate the molecular mechanisms involved in the degenerative process of the disc and flavum ligament.

Keywords: Intervertebral Disc Degeneration, Ligamentum Flavum, Spinal Stenosis, Spine, Extracellular Matrix.

LISTA DE ABREVIATURAS

LA	Ligamento Amarelo
AF	Anel Fibroso
NP	Núcleo Pulposo
MMP	Metaloproteases
PG	Proteoglicanos
GAG	Glicosaminoglicanos
AH	Ácido Hialurônico
HS	Heparam Sulfato
CS	Condroitim Sulfato
DS	Dermatam Sulfato
AHBP	Proteína de Ligação do Ácido Hialurônico
MMP2	Metaloprotease-2
MMP9	Metaloprotease-9
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral beta
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
IEdig	Índice de Expressão Digital
DO	Densidade Óptica
DOF	Densidade Óptica do Fundo
IE	Índice de Expressão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Degeneração dos Discos Intervertebrais	9
1.2 Ligamento Amarelo	10
1.3 Glicosaminoglicanos	12
1.4 Objetivo do trabalho	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3 MANUSCRITOS	17
3.1 Artigo 1: Alterações patológicas do ligamento amarelo nas doenças degenerativas da coluna lombar	17
3.2 Artigo 2: Estudos das alterações moleculares e estruturais na degeneração do disco intervertebral em modelo animal.....	29
3.3 Artigo 3: Expressão das metaloproteinases 2 e 9 da matriz e do TGF-B na hipertrofia do ligamento amarelo.....	55
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

O processo de degeneração da coluna vertebral é caracterizado por deterioração de determinadas estruturas. Durante o processo degenerativo, o tecido acometido pode ser substituído por tecido celular alterado, promovendo a diminuição ou até perda da função.

1.1 Degeneração dos Discos Intervertebrais

Os discos intervertebrais são estruturas fibrocartilaginosas localizadas entre as vértebras da coluna vertebral, são responsáveis pela absorção de cargas mecânicas e proporcionam a mobilidade para os movimentos de rotação e flexão, realizados pela coluna. (ROUGHLEY et al., 2006; PATTAPPA et al., 2012).

Os discos intervertebrais são constituídos de duas regiões anatômicas distintas, o núcleo pulposo é a camada mais interna, menos estruturada e rica em proteoglicanos, glicoproteínas, proteínas fibrosas e elásticas e água (WU et al., 2016). Envolvendo o núcleo pulposo encontra-se o anel fibroso, constituído por fibras de colágeno organizadas obliquamente. (ALINI et al., 2002).

O núcleo pulposo, apresenta além de fibras colágenas, metaloproteases (MMP), proteoglicanos (PG) e glicosaminoglicanos (GAG). Tais moléculas que formam a matriz extracelular estão relacionadas com funções diversas como proporcionar ancoragem entre célula-célula e célula-matriz extracelular, desencadear sinais que intensificam processos de proliferação e migração celular, além de participarem da organização tecidual e mecanismos de regeneração e desenvolvimento dos tecidos. (KRESSE; SCHÖNHERR, 2001; NOMIZU et al., 1995).

Durante o desenvolvimento e crescimento do indivíduo, os discos intervertebrais sofrem alterações morfológicas para Roughley (2004), que podem ocorrer de maneira fisiológica, com o desenvolvimento discal, desde a fase embrionária até o crescimento ósseo completo e incluem o processo de envelhecimento. Entretanto, na fase adulta tais alterações podem ser caracterizadas por alterações degenerativas não fisiológicas.

A estrutura dos discos intervertebrais de um adulto é predominantemente avascular, o que dificulta a nutrição e respostas nociceptivas, adequadas para proteção e manutenção da homeostase do disco. (ALINI et al., 2002; MOLINOS et al., 2015; SMITH et al., 2011).

A principal função dos discos intervertebrais são a absorção e dissipação de energia das cargas mecânicas recebidas, assim como a mobilidade da coluna. Porém, quando expostas a cargas mecânicas constantes e/ou acentuada ocorre a degeneração do disco. (MACLEAN et al., 2003). Esta degeneração, também pode ocorrer por consequência de alterações genéticas, envelhecimento, alterações na composição do disco ou por influência de fatores ambientais. (VASILIADIS et al., 2014; SMITH et al., 2011).

O processo de degeneração do disco intervertebral ocorre de maneira progressiva, envolvendo fatores bioquímicos, celulares, estruturais e funcionais. (SMITH et al., 2011).

O acúmulo de resíduos extracelulares, gerado pela característica avascular do disco intervertebral, pode se agravar em virtude da absorção celular deficiente, acarretando acúmulo de resíduos o que gera mudanças estruturais na constituição da matriz extracelular do disco. Tais alterações se caracterizam como mudança do perfil e da quantidade de proteoglicanos, colágeno, enzimas e outras proteínas, gerando desorganização tecidual e desidratação do núcleo pulposo, com consequente redução da capacidade do disco de amortecer pressões mecânicas. (OKUDA et al., 2004).

Com o envelhecimento, a alteração da resposta celular acarreta uma cascata de eventos e modificações moleculares do disco intervertebral. Tais alterações podem evoluir para herniações. (SMITH et al., 2011). A hérnia discal pode acarretar extravasamento do núcleo pulposo para além das margens do anel discal que envolve o disco intervertebral, podendo promover compressão das raízes nervosas e/ou medula. (ADAMS; ROUGHLEY, 2006).

1.2 Ligamento Amarelo

Dentre as diversas estruturas envolvidas na estabilização da coluna vertebral está o ligamento amarelo ou ligamento *flavum*, que encontra-se

localizado posterior e lateralmente às lâminas vertebrais, conectando vértebras adjacentes. O ligamento amarelo está presente desde o eixo até o primeiro segmento do sacro. Cada ligamento amarelo possui origem na face anterior da lâmina da vértebra superior e inserção na face posterior da lâmina inferior, recobrando grande parte posterior e lateral do canal vertebral. (KAMITA et al., 2015).

Na perspectiva de Chen et al. (2014), o ligamento amarelo apresenta grande quantidade de fibras elásticas quando comparado às fibras colágenas, sendo que 70% da matriz extracelular é formada por fibras elásticas ricas em elastina e 30% fibras colágenas que possuem orientação em paralelo. (NACHEMSON; EVANS, 1968). A função primordial fisiológica do ligamento amarelo é a manutenção da estabilidade da coluna vertebral em postura ortostática.

O aumento da rigidez e a diminuição da elasticidade do ligamento amarelo pode, entre outras causas, estar relacionado com o processo de envelhecimento, onde há redução das fibras elásticas. (PARK et al., 2009).

A hipertrofia do ligamento amarelo gera um estreitamento do canal espinal, comprimindo os tecidos nervosos, causando sintomas radiculares, compressivos e inflamatórios. A hipertrofia do ligamento amarelo é considerada a causa mais comum de estenose do canal lombar. (OKUDA et al., 2004; SAIRYO et al., 2007).

Diferentes eventos podem desencadear a hipertrofia do ligamento amarelo, como o estresse biomecânico gerado pela mobilidade e amplitude de movimento da coluna, e também as alterações inflamatórias do disco intervertebral e dos tecidos contíguos, causando o espessamento e alteração estrutural do ligamento em pacientes com predisposição genética. (SHIGUEMATSU et al., 2012).

Em estudo publicado Kamita et al. (2015) realizaram a análise proteômica do ligamento amarelo sem aspectos degenerativos (saudável) e compararam com a análise realizada em ligamentos amarelos espessos, nesta análise o grupo identificou 1.288 tipos distintos de proteínas. Foi evidenciado em tal estudo que tecidos saudáveis apresentaram aproximadamente 1.100 proteínas distintas, enquanto os tecidos com sinais de degeneração do ligamento amarelo, o número

foi reduzido para aproximadamente 900 proteínas com diminuição significativa de componentes elásticos da matriz extracelular.

1.3 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAG) são polímeros lineares de açúcares constituídos por subunidades repetitivas de dissacarídeos. Esses polímeros podem apresentar sulfatação em diversas posições, caracterizando uma carga negativa de alta densidade, carga essa que é capaz de atrair cátions (predominantemente sódio), interagindo intensamente com moléculas de água, contribuindo assim para a hidratação do tecido (ADAMS; ROUGHLEY, 2006).

Os GAG, exceto o ácido hialurônico, encontram-se associados a um esqueleto proteico e formam macromoléculas denominadas proteoglicanos. Ainda, os proteoglicanos associam-se à rede de colágeno, formando uma malha que determina a estrutura funcional do tecido e mantém a hidratação no núcleo pulposo e no ligamento amarelo, determinando a integridade de tais tecidos. (ANTONIOU et al., 1996).

Os GAG proporcionam propriedades visco elásticas ao tecido do disco intervertebral e ligamento amarelo. (SIVAN et al., 2014). Com o envelhecimento as funções dos proteoglicanos ficam prejudicadas, por alterações na constituição estrutural das cadeias de GAG e perda de tais cadeias, comprometendo a capacidade de tais macromoléculas em manter o disco intervertebral hidratado o suficiente para receber cargas estressoras sem alteração estrutural. (ADAMS; ROUGHLEY, 2006; ANTONIOU et al., 1996).

É de conhecimento que as alterações na viscosidade do disco intervertebral e ligamento amarelo afetam diretamente sua função, gerando uma cascata de alterações bioquímicas, funcionais e mecânicas favorecendo a degeneração do disco⁴. Apesar de bem elucidada, alterações dos proteoglicanos no processo de degeneração discal e do ligamento amarelo, pouco se sabe sobre como tais alterações moleculares estão envolvidas no desenvolvimento de tal afecção.

1.4 Objetivo do trabalho

Avaliar as alterações moleculares de constituintes da matriz extracelular no processo de degeneração do disco intervertebral e do ligamento amarelo.

1. Analisar o perfil de glicosaminoglicanos no processo degenerativo do ligamento amarelo da coluna vertebral em humanos.
2. Investigar alterações de componentes da matriz extracelular, inflamação e apoptose na degeneração do disco intervertebral em modelo animal.
3. Correlacionar a expressão de componentes da matriz extracelular na hipertrofia do ligamento amarelo com a idade dos pacientes acometidos pela doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Com o envelhecimento algumas alterações ocorrem de forma fisiológica ou patológica, afetando a composição e morfologia dos discos e ligamentos intervertebrais.

A análise proteômica realizada por Kamita et al. (2015), revelou que existem diferenças expressivas na constituição de proteínas comparando-se tecidos sem alterações estruturais com tecidos degenerados.

Em um estudo publicado por Kim et al. (2015) associaram sintomas da estenose lombar com a morfologia do ligamento amarelo, foram avaliados 117 pacientes diagnosticados com estenose lombar. Valores maiores de área transversa e espessura do ligamento amarelo estão associados com valores mais elevados de incapacidade subjetiva.

A estenose de canal lombar pode atingir apenas um segmento ou diversos segmentos da coluna lombar, quando a estenose é sintomática e prejudica as atividades de vida diárias do paciente o tratamento cirúrgico é recomendado, Wen-Jing et al. (2015), sugerem que a cirurgia em duas fases, apesar da perda da função neurológica entre as fases, tem um resultado favorável com recuperação completa da função após o termino da segunda fase cirúrgica.

Em um estudo morfológico dos discos intervertebrais, Scott et al. (1994), encontraram diferenças nas composições dos discos fetais: comparado ao de adultos, o conteúdo de colágeno do núcleo pulposo dos fetos foi maior em discos cervicais do que em discos lombares, porém, o teor total do núcleo pulposo foi maior em discos lombares e mais baixo em discos cervicais. O conteúdo de colágeno do anel fibroso foi maior em adultos e crianças do que em neonatos e lactentes. Já o colágeno do núcleo pulposo aumentou com a idade em discos torácico e lombar, mas foi consistentemente alta em discos cervicais para todas as idades.

Furukawa et al. (2009) demonstraram em um estudo experimental com ratos, que a deficiência de biglicam, proteoglicano de condroitim e dermatam sulfato, ricos em resíduos de leucina estão relacionados com o processo de degradação do disco intervertebral com redução progressiva do núcleo pulposo, semelhante ao processo de envelhecimento.

Alini et al. (2002) descreveram a implantação de tecidos produzidos *in vitro*, para reposição do núcleo pulposo degradado, como uma forma alternativa de terapia.

A proteína Angptl2 promove a inflamação no tecido do ligamento amarelo por ativação de expressão de IL-6, induzindo a degeneração do ligamento amarelo e consequente hipertrofia. Quando correlacionadas a espessura do ligamento amarelo com a expressão de IL-6 foi encontrada uma relação positiva nos tecidos provenientes de estenoses além de alta expressão de IL-6 em fibroblastos, quando correlacionado com Angptl-2. (NAKAMURA, 2015).

As alterações causadas pela estenose têm origem em partes distintas do disco intervertebral, como no núcleo pulposo e anel fibroso, sendo assim, para compreensão da patologia em si é necessário o conhecimento dos componentes de cada estrutura.

Foi descrito que cadeias de condroitim sulfato presentes na cartilagem proporcionam numerosos domínios de ligações potenciais importantes para a célula interagir com a matriz extracelular, bem como associações específicas com citocinas, quimiosinas e fatores de crescimento, que regulam a diferenciação e proliferação celular durante o desenvolvimento do tecido. (CATERSON, 2012).

Os proteoglicanos desempenham papel diferente no processo de inflamação decorrente de alterações estruturais das cadeia de GAG que os constituem. (JUNEJA; VEILLETTE, 2013).

Segundo Pearce e Grimmer (1976), proteoglicanos presentes em disco intervertebral degenerado apresentam diferenças significativas na constituição das cadeias de condroitim sulfato e queratam sulfato, evidenciando mais uma vez a importância das cadeias de GAG para o desenvolvimento do processo de degeneração discal.

Em estudo realizado por Hardigam e Adams (1976) descreveram um procedimento para identificação de moléculas de proteoglicanos e ácido hialurônico da cartilagem. Neste estudo pioneiro o autor relata a presença de ácido hialurônico em baixa concentração e ressalta a importância de tal molécula na organização tecidual da cartilagem.

O agrecam é um dos principais componentes macromoleculares do disco intervertebral, sendo que a redução deste proteoglicano de condroitim sulfato e queratam sulfato representa um sinal precoce de degeneração discal.

A partir das necropsias realizadas em crianças e adultos, Roughley et al. (2006), pôde ser observado que com o envelhecimento a quantidade de proteoglicanos diminui significativamente no núcleo pulposo, em relação ao anel fibroso.

Boxberger et al. (2009), relataram que o aumento da carga mecânica em discos intervertebrais de ratos gera um aumento da rigidez dinâmica do disco, sendo que tais resultados estão relacionados com a quantidade de glicosaminoglicanos.

3 MANUSCRITOS

3.1 Artigo 1: Alterações patológicas do ligamento amarelo nas doenças degenerativas da coluna lombar

RESUMO

Em processos de degeneração da coluna lombar ocorre frequentemente aumento da espessura do ligamento amarelo. Entretanto, existe pouco conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos com o processo de hipertrofia do ligamento amarelo. Sabemos que fibras elásticas como colágeno, proteoglicanos e glicosaminoglicanos são constituintes importantes da matriz extracelular do ligamento amarelo. Tais moléculas são importantes para a estruturação e função de tal tecido. No presente estudo temos como objetivo avaliar a constituição dos glicosaminoglicanos do ligamento amarelo de pacientes com quadro degenerativo da coluna vertebral. Foram coletadas 30 amostras de ligamento amarelo obtidas por ressecção cirúrgica em pacientes com degeneração da coluna lombar, como hérnia discal e estenose do canal vertebral. A identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos foram realizadas por eletroforese em gel de agarose. Os resultados evidenciaram um aumento significativo de condroitim sulfato, apresentando correlação direta com o processo de hipertrofia do ligamento amarelo. Entretanto, não houve diferença do conteúdo de dermatam sulfato nos casos avaliados. Estudos recentes mostraram aumento da expressão de proteoglicanos de condroitim sulfato e dermatam sulfato no processo de espessamento do ligamento amarelo. A correlação direta observada em nosso estudo com aumento significativo e específico de condroitim sulfato, sugere que possivelmente alteração da constituição das cadeias de glicosaminoglicanos dos proteoglicanos do ligamento amarelo na hipertrofia, com predomínio de cadeias de condroitim sulfato. Tais dados indicam que provavelmente o condroitim sulfato possa estar relacionado com o processo de espessamento do ligamento amarelo.

INTRODUÇÃO

A proporção de pessoas idosas vai triplicar neste século, passando de dez por cento no ano 2000 para 32 por cento em 2100. No Brasil, uma nova pesquisa do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) indica que os idosos (pessoas com mais de 60 anos), já somam 23,5 milhões dos brasileiros, mais que o dobro do registrado em 1991, quando a faixa etária contabilizava 10,7 milhões de pessoas.

Com o envelhecimento da população, estão aumentando as estatísticas das doenças degenerativas do aparelho locomotor, em particular as alterações na coluna vertebral. Isto tem acrescido o custo do sistema de saúde, pois há aumento na demanda de tratamento dessas patologias, que estão associadas com diminuição da qualidade de vida.

A doença mais frequente na coluna vertebral é a estenose do canal lombar e está associada ao envelhecimento. A estenose lombar é definida como um estreitamento do canal vertebral na região, que normalmente se inicia após a quinta década de vida. As causas desse estreitamento são artrose facetária, abaulamento discal e principalmente hipertrofia do ligamento amarelo.

Os pacientes com estenose apresentam como sintomas, dor lombar associada à ciatalgia e, mais frequentemente, claudicação neurogênica. Esse estreitamento do canal vertebral pode ocorrer pelo processo de espondilodiscoartrose, que é definido como processo degenerativo do disco intervertebral, ligamento amarelo e facetas articulares.

Durante esse processo, ocorre hipertrofia do ligamento amarelo e abaulamento do disco intervertebral, ocasionando a diminuição do diâmetro do canal vertebral e comprimindo tanto a medula espinhal, quanto as raízes nervosas que derivam da medula. O ligamento amarelo é considerado um dos principais causadores da estenose do canal lombar e consequente sintomas radiculares compressivos e inflamatórios.

Cerca de 70% da matriz extracelular do ligamento amarelo é formada por fibras elásticas e 30% por fibras colágenas com orientação em paralelo (4). O ligamento amarelo se estende desde a segunda vértebra cervical até a primeira vértebra sacra, sendo responsável pela conexão de lâminas adjacentes. O ligamento amarelo recobre grande parte da porção posterior e lateral do canal

vertebral (5). O glicosaminoglicano mais comumente encontrado no ligamento amarelo é o condroitim sulfato, e em menor proporção o dermatam sulfato (3).

Com o envelhecimento, há diminuição das fibras elásticas, aumento das fibras colágenas, acarretando por consequência diminuição da elasticidade e aumento da rigidez do ligamento amarelo (3). Durante esse processo há desorganização das fibras do ligamento e pode ocorrer hipertrofia com calcificação, ossificação e condrometaplasia (2,6,7,8). Importante ressaltar que o aumento da rigidez do ligamento amarelo muitas vezes não está associado com a hipertrofia do mesmo, mas pode causar pregueamento desse ligamento, principalmente na posição ortostática. A hipertrofia do ligamento amarelo é a maior responsável pela redução do diâmetro do canal vertebral em idosos, que evolui com quadro clínico de claudicação neurogênica, cialgia e dor lombar.

Poucos estudos avaliam a evolução das alterações na estrutura do ligamento amarelo, principalmente no que se relaciona ao aumento de rigidez e hipertrofia decorrente do seu espessamento com a expressão de metaloproteases (9), mais precisamente em casos de estenose do canal vertebral e em pacientes mais jovens que apresentam outras doenças da coluna vertebral, como hérnia discal lombar.

É de fundamental importância para futuras medidas terapêuticas saber a origem da hipertrofia do ligamento amarelo, destacando se o aumento da espessura é decorrente do estresse biomecânico, provocado pela movimentação da coluna, ou se esse processo se inicia devido às alterações inflamatórias do disco intervertebral e em tecidos adjacentes que acabam predispondo a inflamação levando ao seu espessamento estrutural.

A investigação de moléculas que estejam diretamente relacionadas ao espessamento do ligamento amarelo poderá elucidar mecanismos moleculares envolvidos com o desenvolvimento de tal processo, além de servir como um possível marcador de diagnóstico ou prognóstico poderá auxiliar na prevenção de tal doença.

Diante de tais considerações o presente estudo tem como objetivo correlacionar o perfil de glicosaminoglicanos com a espessura do ligamento amarelo hipertrofiado.

MÉTODOS

Pacientes e Amostras

Foram coletadas amostras do ligamento amarelo (região profunda) de 30 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico, no segmento da coluna lombar, que apresentavam hérnia discal ou estenose do canal, no período entre agosto de 2013 a agosto de 2014, realizados nos hospitais Abreu Sodré em São Paulo (AACD) em São Paulo e Hospital Assunção – São Luiz Rede Dor, em São Bernardo do Campo. As coletas foram efetuadas pelo mesmo cirurgião durante o ato cirúrgico para descompressão radicular ou do canal vertebral.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Plataforma Brasil número 12564313.2.0000.0082. Todos os pacientes participantes deste estudo estiveram de acordo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram incluídos como critérios pacientes que apresentavam hérnia discal lombar protusa ou extrusa, localizada na região central ou lateral do canal vertebral, com mais de três meses de sintomatologia refratária ao tratamento conservador (clínico e reabilitação), sem cirurgia prévia no segmento acometido pela afecção na coluna lombar, além de pacientes que apresentavam estenose de canal lombar com quadro clínico de claudicação neurogênica, decorrente da compressão do canal vertebral e hipertrofia do ligamento amarelo no segmento da coluna lombar. Dentre os critérios de exclusão destacamos pacientes que apresentavam patologias da coluna vertebral associadas à hérnia discal e estenose de canal lombar, tais como cirurgias prévias, fraturas, tumor, doença inflamatória, assim como os pacientes que se recusaram a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Ressonância Magnética

Todos os pacientes foram examinados por ressonância magnética, com cortes axiais na sequência T1, nos segmentos acometidos de L3L4, L4L5 e L5S1. Um mesmo avaliador verificou o grau de espessamento do ligamento amarelo em todos os casos e com o mesmo programa de imagem RadiAnt do visualizador DICOM. A espessura do ligamento amarelo foi mensurada com régua eletrônica

com resolução de 0,1 mm, por meio de linha traçada transversalmente no segmento facetário, através da porção média do ligamento amarelo. Nos casos de espessura assimétrica bilateralmente, foi utilizado o valor mais espesso.

Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados dos tecidos

As amostras de tecido foram homogeneizadas e mantidas em acetona durante 24 horas. O tecido em pó seco obtido (100 mg) foi submetido à proteólise na presença de 2 mg de Maxatase (Biocon a Brasil Ind. Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) / 100 mg de tecido seco, em tampão 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. A proteólise foi realizada por 24 h, 55°C. Ácido tricloroacético (10% de concentração final) foi adicionado à mistura, mantida a 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante contendo os GAG foi obtido após a centrifugação (10 min, 3.500 x *g*, 4°C). Os glicosaminoglicanos sulfatados foram precipitados adicionando dois volumes de metanol (24 h, - 20°C). O precipitado foi recolhido por centrifugação 20 min, 3.500 x *g*, 4°C e dissolvido em água.

Quantificação e identificação dos glicosaminoglicanos sulfatados

Os glicosaminoglicanos sulfatados (HS, DS e CS), foram identificados e quantificados por eletroforese em gel de agarose em tampão 0,05 M 1,3-diaminopropano-acetato (PDA), pH 9,0. Após a eletroforese, 1 h, 100 V os GAG foram precipitados em gel de agarose a 0,1%, utilizando brometo de cetil-trimetilamônio (Cetavlon), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), durante 2 horas à temperatura ambiente. O gel foi seco e corado com azul de toluidina (0,1% em ácido acético: etanol: água (0,1: 5: 4,9). A quantificação dos GAG foi realizada por densitometria a 530 nm. Os padrões utilizados foram condroitim 4-sulfato de baleia a partir de cartilagem (Seikagaku Kogyo Co., Tóquio, Japão), dermatam sulfato (de pele de porco) e heparam sulfato (de pâncreas bovino). O erro do método de eletroforese foi da ordem de 5%. A identidade do condroitim sulfato e dermatam sulfato foi confirmada por degradação com liases específicas, condroitinase AC e ABC, respectivamente, (Seikagaku Kogyo Co.).

Análise Estatística

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável quantitativa foram organizados e descritos como média e desvio padrão. Para as variáveis

qualitativas foram utilizadas frequências absolutas e relativas. As distribuições foram definidas como paramétricas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação entre as médias de duas populações amostrais, foi utilizado o teste “t” de Student e para mais de dois grupos utilizou-se o teste de ANOVA com teste auxiliar de Bonferroni. Para a verificação da existência de correlação entre duas variáveis quantitativas foi aplicado o teste de correlação de Pearson. Em todas as análises foi utilizado o programa estatístico SPSS® versão 17.0 (SPSS® Inc; Illinois, USA) e em todas as comparações adotou-se nível de significância estatística inferior a 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Como descrito na metodologia a espessura do ligamento amarelo foi determinada por ressonância nuclear magnética. Na Figura 1 está indicada a região avaliada por análise de ressonância que define a espessura do ligamento amarelo.

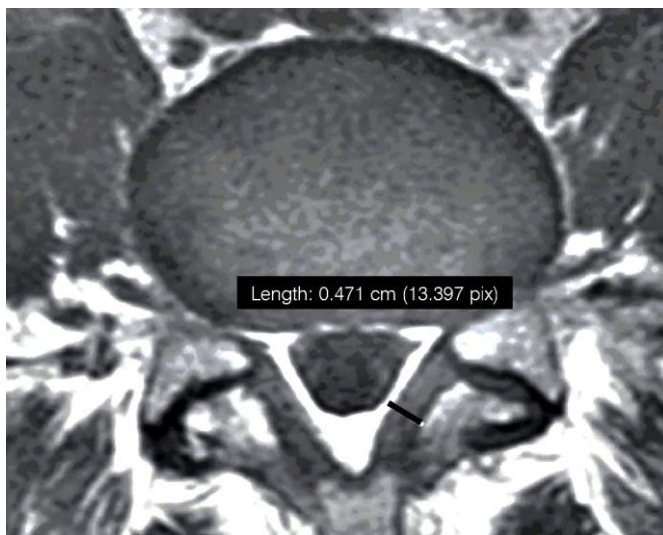


Figura 1. Imagem de ressonância magnética do disco intervertebral. Na imagem está indicada a região onde foi realizada a medida da espessura do ligamento amarelo.

Após a ressecção cirúrgica, as amostras coletadas foram subdivididas em três grupos, de acordo com a espessura do ligamento amarelo, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Subdivisão das amostras de ligamento amarelo de acordo com a espessura.

Número de Amostras	Espessura do Ligamento Amarelo (mm)
13	$\leq 2,9$
8	3,0 – 3,9
9	$\geq 4,0$

A digestão com as enzimas específicas, condroitinase AC e condroitinase ABC, confirmou a presença de condroitim sulfato e dermatam sulfato nas amostras de ligamento amarelo (Figura 2A). A Figura 2B demonstra diferença do perfil de condroitim sulfato e dermatam sulfato de acordo com a espessura do ligamento amarelo intervertebral.

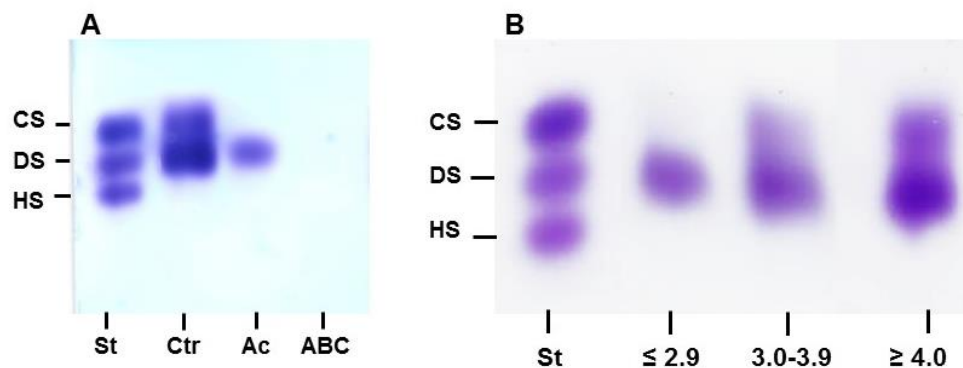


Figura 2. Perfil de glicosaminoglicanos sulfatados. Eletroforese em gel de agarose. **A**, Amostra de ligamento amarelo, após digestão com condroitinase AC (**AC**) e condroitinase ABC (**ABC**); **St**, padrão de condroitim sulfato (**CS**), dermatam sulfato (**DS**) e heparam sulfato (**HS**). **B**, padrão de CS, DS e HS (**St**); (≤ 2.9 , **3.0-3.9**; **4.0**) espessura do ligamento amarelo de três pacientes com degeneração de disco intervertebral, valores expressos em milímetros.

Houve um aumento significativo na expressão de condroitim sulfato nas amostras de ligamento amarelo com maior espessamento (Figura 3), sugerindo que possivelmente tal glicosaminoglicano esteja relacionado com o processo de hipertrofia do ligamento amarelo em pacientes que apresentam degeneração do disco intervertebral.

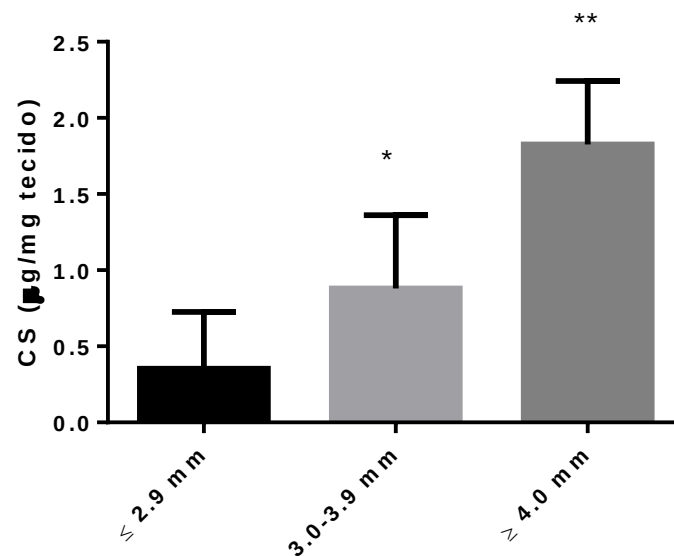


Figura 3. Expressão de condroitim sulfato de acordo com a espessura do ligamento amarelo. Os valores representam médias de triplicatas realizadas em ensaios de eletroforese em gel de agarose para quantificação de tal composto. ANOVA e teste auxiliar de Bonferroni, */** $p < 0.0001$.

Análises estatísticas evidenciaram que existe correlação direta entre a espessura do ligamento amarelo e a concentração de condroitim sulfato, evidenciando um valor de alta correlação, como mostra a Figura 4.

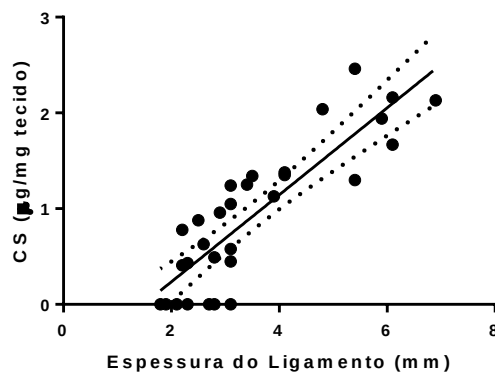


Figura 4. Correlação entre condroitim sulfato e espessura do ligamento amarelo. Teste de correlação de Pearson, $r = +0,865$, $p < 0.0001$.

Entretanto, não foi observado alteração na concentração de dermatam sulfato quando comparamos a espessura das diferentes amostras de ligamento amarelo (Figura 5).

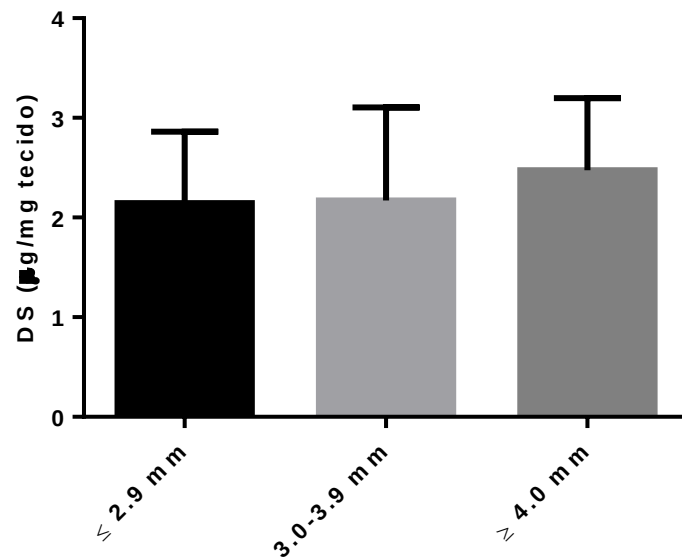


Figura 5. Expressão de dermatam sulfato em ligamento amarelo de diferentes espessuras. Os valores representam médias de triplicatas realizadas em ensaios de eletroforese em gel de agarose para quantificação de tal composto. ANOVA, $p = 0.549$.

Os dados sugerem que possivelmente os processos moleculares envolvidos com a evolução degenerativa na hipertrofia do ligamento amarelo são dependentes especificamente de condroitim sulfato, visto que não houve alteração significativa da expressão de dermatam sulfato.

A Figura 6 comprova pelo teste estatístico que não existe correlação estatística entre espessamento do ligamento amarelo e expressão de dermatam sulfato.

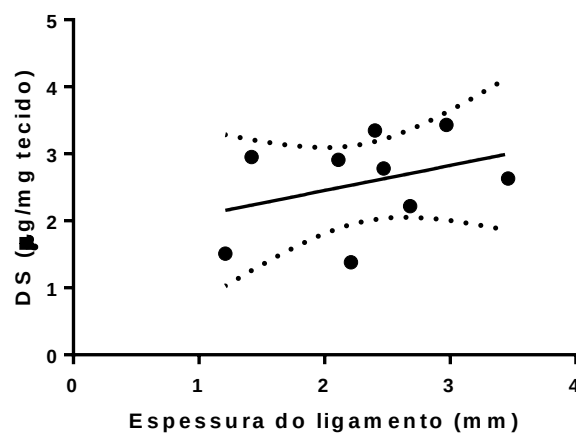


Figura 6. Correlação entre dermatam sulfato e espessura do ligamento amarelo. Teste de correlação de Pearson, $r = + 0,277$, $p = 0.139$.

DISCUSSÃO

O ligamento amarelo é um tecido conjuntivo que está presente desde a segunda vértebra cervical até a primeira vértebra sacral, e sua função está relacionada com a estabilidade da coluna vertebral durante a sua movimentação, além de manter uma superfície lisa sobre o saco dural, evitando sua aderência e compressão.

A patogênese do espessamento do ligamento amarelo ainda não foi elucidada, sendo que estudos de fisiopatologia destacam a instabilidade segmentar com um fator de risco para desenvolvimento do espessamento do ligamento amarelo.

No presente estudo, as amostras de ligamento amarelo com maior espessura, apresentaram aumento na expressão do condroitim sulfato.

Sairoyo (1) e colaboradores encontraram um aumento na expressão de RNA mensageiro do TGF- β na fase inicial da hipertrofia do ligamento amarelo. Apesar do TGF- β estar presente em todas as amostras analisadas, não houve correlação entre espessura do ligamento amarelo e expressão de TGF- β . Neste mesmo estudo houve uma correlação direta entre hipertrofia com a perda severa de fibras elásticas, indicando a ocorrência de fibrose.

Yabe e colaboradores também demonstraram diminuição das fibras elásticas e aumento da expressão de proteoglicanos de dermatam e condroitim sulfato como decorim, biglicam, fibromodulina, agrecam e versicam no processo de hipertrofia do ligamento amarelo. Os mesmos autores também observaram que tais alterações são mais significativas em ligamentos mais espessos (10).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os achados descritos por Yabe e colaboradores, evidenciando aumento significativo de condroitim sulfato nas amostras de ligamento amarelo mais espesso.

Cumprer ser destacado que o condroitim sulfato é um dos glicosaminoglicanos constituintes dos proteoglicanos decorim, biglicam, fibromodulina, agrecam e versicam.

Entretanto, o dermatam sulfato que também compõe cadeias de glicosaminoglicanos constituintes de tais proteoglicanos não apresentou alterações quantitativas significativas.

Desta forma podemos hipotetizar que a alteração de tais proteoglicanos na hipertrofia do ligamento amarelo está diretamente relacionada com aumento de condroitim sulfato e não dermatam sulfato.

Esse dado evidencia que a além de alteração da expressão de proteoglicanos de matriz extracelular no processo de espessamento do ligamento amarelo, existe também alteração estrutural das cadeias constituintes desses compostos.

Lembrando que as cadeias de glicosaminoglicanos dos proteoglicanos em geral determinam a especificidade e função como a organização de fibras elásticas do ligamento amarelo, podemos inferir que ocorrem alterações importantes na organização da matriz extracelular no processo de hipertrofia do ligamento amarelo.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo evidenciam que o aumento de condroitim sulfato relacionado diretamente com o aumento da espessura do ligamento amarelo, em pacientes com degeneração discal, possa indicar alterações estruturais de proteoglicanos que apresentam tal glicosaminoglicano, promovendo assim remodelamento da matriz extracelular de tal tecido.

REFERÊNCIAS

1. Sairyo K, Biyani A, Goel VK, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation- related scar tissue. Spine. 2007;32(11):E340-7.
2. Okuda T, Baba I,† Yoshinori Fujimoto, MD, PhD,* Nobuhiro Tanaka, MD, PhD,* Tadayoshi Sumida, MD,† Hideki Manabe, MD,† Yuzo Hayashi, MD, PhD,‡ and Mitsuo Ochi, MD, PhD* The Pathology of Ligamentum Flavum in Degenerative Lumbar Disease. SPINE Volume 29, Number 15, pp 1689–1697 ©2004,
3. Okada A, Harata S, Takeda Y, Nakamura T, Takagaki K, Endo M. Age-Related changes in proteoglycans of human ligament Flavum. Spine vol 18 numbber 15 pag 2261-2266
4. Nachemson AL, Evans JH (1968) Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament (ligamentum flavum). J Biomech 1:211–220

5. Yahia LH, Garzon S, Strykowski H, Rivard CH (1990) Ultra- structure of the human interspinous ligament and ligamentum flavum. *Spine* 15:262–268
6. Postacchini F, Gumina S, Cinotti G, et al. Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis. *Spine* 1994;8:917–22
7. Sairyo K, Biyani A, Goel VK, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: A multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic and biologic assessments. *Spine* 2005;30:2649 – 56
8. Yoshida M, Shima K, Taniguchi Y, et al. Hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. *Spine* 1992;17:1353– 60
9. Campos MF, Oliveira CP, Pinhal MAS, Rodrigues, LMR. Expressão das Metaloproteínas 2 e 9 da Matriz e do TGF-B na Hipertrofia do Ligamento Amarelo, Coluna/Columna 2014;13(3):206-209
10. Yabe Y, Hagiwara Y, Tsuchiya M et al. Decreased Elastic Fibers and Increased Proteoglycans in the Ligamentum Flavum of Patients with Lumbar Spinal Canal Stenosis. *Journal of Orthopaedic Research* 2015; (Epub ahead of print)

3.2 Artigo 2: Estudos das alterações moleculares e estruturais na degeneração do disco intervertebral em modelo animal

Studies of the molecular and structural changes in intervertebral disc degeneration in an animal model

Marcelo Ferraz de Campos², Cintia Pereira de Oliveira¹, Thérèse Rachell Theodoro¹, Leandro Luongo de Matos³, Ana Maria Mader⁴, Olga Maria de Toledo Correa⁵, Juliana Mora⁵, Maria Aparecida da Silva Pinhal¹, Luciano Miller Reis Rodrigues²

1. Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André, 3. Departamento de Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André, SP, Brasil.

4. Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André, SP, Brasil.

5. Departamento de Morfologia e Fisiologia da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André, SP, Brasil.

2. Disciplina de Ortopedia da Faculdade de Medicina do ABC – Santo André, SP, Brasil.

RESUMO

Introdução: A degeneração do disco intervertebral tem sido apontada como a principal causa de dor lombar. A doença é um processo patológico responsável por causar mudanças estruturais e celulares na matriz extracelular do disco intervertebral, ocasionando desequilíbrio nas funções fisiológicas do disco intervertebral. **Objetivo:** Avaliar as alterações estruturais e moleculares do disco intervertebral durante o processo degenerativo do disco intervertebral em modelo animal. **Métodos:** Este estudo foi composto por 12 amostras de discos intervertebrais de ratos machos da linhagem Wistar, os animais foram submetidos à indução da degeneração do disco intervertebral utilizando agulha 20G, rotação

de 360°, aplicado por 30 segundos entre a 6^a / 7^a, 7^a / 8^a e 8^a / 9^a vértebras coccígeas representando os grupos degenerados (15 e 28 dias) e o grupo controle não sendo submetido à punção. Foram avaliados parâmetros histológicos, distribuição e expressão de moléculas constituintes da matriz extracelular durante o processo degenerativo do disco intervertebral, como metaloproteinases (MMP2 e MMP9), expressão gênica de isoformas da heparanase (HPSE1 e HPSE2), distribuição do fator angiogênico (VEGF), apoptose (caspase-3), inflamação (IL-6, IL-10), organização estrutural das fibras colágenas e distribuição de colágeno I. **Resultados:** Após 15 dias da indução da degeneração do disco intervertebral foram observadas diversas alterações significativas como redução na expressão de colágeno I, MMP2 e MMP9 e IL-10, também na expressão gênica das isoformas da heparanase, seguido de aumento dos níveis de tais moléculas aos 28 dias. Aumento significativo de IL-6, VEGF aos 15 dias após indução da degeneração discal, e significativo aumento de apoptose. **Conclusão:** Notamos que durante o processo degenerativo do disco intervertebral avaliado em modelo animal, alterações celulares e estruturais no disco como o surgimento de estruturas vasculares ocorreram principalmente aos 15 dias, caracterizado como fase aguda da doença, e aos 28 dias da indução, fase crônica, observamos o remodelamento do tecido sugerindo possivelmente processo de cicatrização da lesão.

Descritores: Degeneração do Disco Intervertebral. Ratos Wistar. Citocinas. Metaloproteinases da Matriz. Colágenos Fibrilares. Neovascularização Patológica.

ABSTRACT

Introduction: The intervertebral disc degeneration has been identified as the main cause of low back pain. The disease is a pathological process responsible for causing cellular and structural changes in the extracellular matrix of the intervertebral disc, causing imbalance in the physiological functions of the intervertebral disc. **Objective:** To evaluate the structural and molecular changes in the intervertebral disc degeneration process of the intervertebral disc in an animal model. **Methods:** This study consisted of 12 samples of intervertebral discs of

male Wistar rats, the animals were subjected to induction of intervertebral disc degeneration using needle 20G, 360 ° rotation, applied for 30 seconds between 6th / 7th, 7th / 8th and 8th / 9th / coccygeal vertebrae representing the degenerate groups (15 and 28 days) and the control group not being subjected to puncture. Histological parameters, distribution and expression of some extracellular matrix molecules were evaluated during the degenerative process of the intervertebral disc, such as metalloproteinases (MMP2 and MMP9), gene expression of heparanase isoforms (HPSE1 and HPSE2), distribution of the angiogenic factor (VEGF), Apoptosis (caspase-3), inflammation (IL-6, IL-10), structural organization and distribution of collagen fibers in collagen I. **Results:** After 15 days from the induction of intervertebral disc degeneration several significant changes were observed as a reduction in the expression collagen I, MMP2 and MMP9 and IL-10, also in gene expression of heparanase isoforms, followed by increased levels of these molecules at 28 days. A significant increase in IL-6, VEGF at 15 days after induction of disc degeneration and significant increase in apoptosis. **Conclusion:** We noted that during the degenerative process of the intervertebral disc measured in animal, cellular and structural changes to the disc as the appearance of vascular structures model occurred mainly at 15 days, characterized as acute illness and 28 days of induction, chronic phase, observed remodeling of the tissue possibly suggesting healing process of the injury.

Keywords: Intervertebral Disc Degeneration. Rats, Wistar. Cytokines. Matrix Metalloproteinases. Fibrillar Collagens. Neovascularization, Pathologic

INTRODUÇÃO

A degeneração do disco intervertebral é decorrente de uma deficiência estrutural progressiva. A doença é responsável por causar mudanças estruturais na matriz extracelular do disco intervertebral, degradando proteoglicanos e composição do colágeno, reduzindo teor de água no núcleo pulposo ocasionando redução na capacidade do disco de amortecimento durante as pressões mecânicas. As células do disco intervertebral também sofrem alterações e esse conjunto de fatores é responsável pelo desequilíbrio nas funções fisiológicas do

disco ocasionando intenso índice de dor e dificuldade na capacidade laborativa do indivíduo ⁽¹⁾. O processo degenerativo exerce papel importante na evolução crônica da dor, considerada após persistência por um período maior de três meses ^(2,3).

Vários fatores estão associados à doença como o estilo de vida sedentário, fatores genéticos, sócios econômicos e psicossociais, obesidade, diabetes, envelhecimento, tabagismo e posturas viciosas ^(4,5,2). Os tratamentos existentes introduzidos dependendo do grau da doença auxiliam no tratamento dos sintomas clínicos, mas não impedem a sua progressão ⁽⁶⁻⁸⁾.

A matriz extracelular do disco intervertebral é constituída principalmente de água, proteoglicanos e fibras colágenas, proporcionando ancoragem e desencadeamento de sinais para eventos de proliferação e migração celular, resultando em organização, regeneração e desenvolvimento de tecidos. Essa organização é decorrente da interação de diversos tipos moleculares como colágenos, metaloproteinases (MMP), proteoglicanos (PG) e glicosaminoglicanos (GAG) ⁽⁹⁻¹²⁾.

Os PG são macromoléculas constituídas de um esqueleto proteico associado covalentemente a cadeias lineares de açúcares, denominados glicosaminoglicanos (GAG), as quais associam-se à rede de colágeno formando uma malha com as moléculas de água do núcleo pulposo, mantendo sua integridade ⁽¹³⁾. Os GAG encontrados predominantemente no núcleo pulposo, são polissacarídeos lineares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas unidos por ligações glicosídicas, sendo sulfatados em várias posições por isso apresentam elevada densidade de cargas negativas ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾, facilitando a ligação com a água e proporcionando propriedades viscoelásticas ao tecido do disco ⁽¹⁷⁾.

O envelhecimento do disco intervertebral é um processo que ocorre naturalmente com o avanço da idade, contribuindo na redução do número de células no disco, senescência, perda de vascularização e calcificação das placas terminais. Na degeneração do disco intervertebral este processo natural parece estar mais evidente pela influência principalmente de fatores biomecânicos e bioquímicos, redução de nutrientes e estresse oxidativo elevando a taxa de apoptose. As caspases são proteases de cisteína e modulam a atividade

apoptótica, diretamente a caspase-3 está envolvida na mediação chave da apoptose^(18,19).

Durante a degeneração do disco podem surgir estruturas neurovasculares induzidas pelo processo inflamatório e fatores angiogênicos como o VEGF presentes no processo degenerativo, ocasionando fissuras anulares que penetram profundamente no disco intervertebral resultando em dor. Em discos normais, essa inervação é limitada pelas fibras dos nervos presentes nas camadas externas do AF^(4,19-21). As citocinas também participam de eventos na degradação da MEC, regulação do tecido conjuntivo além de influenciarem no crescimento interno de nervos e vasos⁽⁴⁾.

A IL-6 citocina antiinflamatória é liberada na corrente sanguínea em resposta a perturbações na homeostase como traumas, infecções agudas e doenças crônicas⁽²²⁾. Estudos mostram que níveis elevados de IL-6 ativam a osteoclastogênese (produção de osteoclastos, células envolvidas na reabsorção óssea) resultando em perda óssea e doenças degenerativas como artrite reumatóide⁽²³⁾. Citocinas pró-inflamatórias como a IL-10 também estão envolvidas em processos de degeneração do disco, mas em fases tardias são descritas como um potente inibidor de apresentação de antígeno e de citocinas antiinflamatórias^(24,25).

As MMP são enzimas envolvidas na degradação da matriz e desempenham importante papel na proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular⁽¹⁹⁾. Participam de eventos na matriz do disco como as MMP2 e MMP9 também estão envolvidas em processos de degradação do colágeno^(11,19).

Neste estudo avaliamos a expressão e distribuição de constituintes estruturais e moleculares do disco intervertebral durante o processo degenerativo utilizando modelo animal, com o objetivo de avaliar o comportamento de constituintes fundamentais durante a degeneração para melhor entendimento da fisiopatologia da doença, contribuindo para futuras melhorias nas abordagens terapêuticas como tentativa de intervir ou prevenir a progressão da doença.

OBJETIVOS

Avaliar as alterações estruturais e a expressão de moléculas envolvidas no processo degenerativo do disco intervertebral, em modelo animal, durante a fase aguda e crônica da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

MODELO ANIMAL

Para o modelo animal de degeneração do disco intervertebral foram utilizados 12 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina do ABC, com 12 semanas de idade (maturidade esquelética completa), pesando entre 300 e 350 gramas. Os ratos foram separados em 03 grupos; 02 animais não foram submetidos à indução da degeneração e eutanasiados aos 28 dias representando o grupo controle, o segundo grupo de 05 animais foi eutanasiados 15 dias após a indução do processo de degeneração do disco intervertebral e o terceiro grupo de 05 animais foi eutanasiados após 28 dias da indução da degeneração. Estudos mostram que para cada 13,7 dias de vida do rato corresponde a 1 ano de vida de humanos e o tempo de vida dos ratos é de aproximadamente 3 anos ⁽²⁶⁾. Os animais permaneceram aos cuidados do biotério da faculdade após a indução da degeneração até o momento da eutanásia.

Para a indução da degeneração do disco intervertebral foi realizada antisepsia na cauda com solução de álcool iodado, os animais foram anestesiados com associação de ketamina (88 mg/kg) e xilazina 2% (12 mg/kg) por via intraperitoneal. O plano anestésico profundo foi confirmado pela ausência de reflexo da córnea e pela ausência de reação à dor profunda dada pela compressão dos interdígitos das patas. Os níveis entre a sexta e a sétima, sétima e oitava e oitava e a nona vértebras coccígeas foram identificadas por palpação. A indução da degeneração foi realizada por punção percutânea com uma agulha de 20G. A agulha foi introduzida até o núcleo pulposso, girada 360° e mantida na mesma posição por 30 segundos, conforme trabalho de Zhang e colaboradores ⁽²⁷⁾. Após confirmação do plano profundo anestésico, foram colhidos 5 mL de sangue arterial proveniente da aorta abdominal, por acesso transabdominal, causando a eutanásia por choque hipovolêmico. Após a eutanásia, os segmentos das caudas com os discos para estudo foram extraídos por bisturi lâmina nº 15.

Os discos intervertebrais retirados entre a sexta e a sétima vértebra coccígea foram armazenados em acetona para análise do perfil de GAG, entre a sétima e oitava vértebra, os discos foram armazenados em RNA Rolder para estudo de expressão gênica e entre a oitava e a nona vértebra coccígea os discos foram armazenados em formaldeído (10%) para avaliação da expressão proteica. Os discos intervertebrais foram encaminhados para o laboratório de Biologia Molecular. Em trabalho anterior de nosso grupo, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis das vértebras coccígeas dos discos degenerados ⁽²⁸⁾.

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina do ABC, processo 003/2011. Cumpre ser observado que o modelo utilizado de degeneração discal em ratos reproduz as alterações morfológicas e bioquímicas similares às aquelas observadas nos processos degenerativos dos discos intervertebrais humanos ⁽²⁹⁾.

ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS

Cortes de tecido do disco intervertebral (3 µm de espessura), embebidos em parafina e fixados em formalina foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise dos parâmetros histomorfométricos. As duas regiões do disco, AF e NP, foram analisadas utilizando uma avaliação quantitativa de dez campos (400X), como determinado por Matos e colaboradores, ³⁰ 2006. Os parâmetros analisados foram área e perímetro celulares e nucleares, densidades ópticas e volume.

IMUNOHISTOQUÍMICA

Áreas representativas de degeneração do disco intervertebral foram escolhidas com base na coloração dos cortes de tecido por hematoxilina-eosina. Cortes com 3 µm de espessura, embebidos em parafina e fixados em formalina, foram desparafinizados e rehidratados. A recuperação do antígeno foi realizada pelo aquecimento das lâminas a 100 °C por 30 minutos em um tampão citrato 10 mmol/L, pH 6,0. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% por 35 minutos. Os cortes foram, então, incubados *overnight* a 4°C com os anticorpos primários: anti-MMP-2 (H-76), anti-MMP-9 (H-129), anti-interleucina-6 (1) 130326 e anti-interleucina-10 (H-160) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anti-caspase-3 (3015-100) (BioVision,

USA) anti-colágeno I (C 2456) (Sigma, USA) e anti-VEGF-A (18077) (Biorbyt, Inglaterra). Finalmente, as lâminas foram incubadas com um complexo de estreptavidina marcado com peroxidase (LSAB[®], DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos. Os cortes foram revelados, utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por 1 minuto e foram contra-corados com hematoxilina. Algumas amostras foram incubadas com tampão fosfato 1 M na ausência do anticorpo primário, como controles negativos. A presença de coloração marrom foi considerada evidência de expressão positiva das respectivas moléculas na célula.

QUANTIFICAÇÃO DIGITAL

As lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de luz TS100 Nikon Eclipse[®] para identificar as áreas que melhor representaram a imunomarcacão das moléculas analisadas (hot spots). Em cada caso, a quantificação da imunomarcacão foi realizada por um método de análise digital por computador. As fotomicrografias de 640x480 pixels foram obtidas de campos consecutivos não-coincidentes em aumento de 400X com uma câmera digital 4300 Nikon Coolpix[®] ajustada para os mesmos parâmetros. As imagens obtidas foram analisadas pelo sistema de processamento e análise de imagens ImageLab[®] (Softium Informática[®], São Paulo, Brasil), ajustado para a escala micrométrica (µm).

ÍNDICE DE PRODUTIVIDADE (IP)

Em cada caso, pelo menos 1.000 células foram contadas pelo ImageLab[®], e o observador as classificou como células positivas ou negativas. Por isso, a porcentagem de células marcadas foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$IP = \frac{\text{número de células marcadas}}{\text{total de células contadas}} \times 100 \quad [\%]$$

INTENSIDADE DE EXPRESSÃO (ItE)

O ImageLab[®] foi utilizado para quantificar a intensidade da cor marrom que resultou da imunomarcacão. Para cada caso, as mesmas fotomicrografias que foram usadas para determinar o IP foram consideradas. Doze regiões

citoplasmáticas de diferentes células randomicamente marcadas foram acessadas com o *same-sized square* (uma ferramenta do sistema ImageLab®). A média de densidade óptica (DO) destas áreas foi automaticamente calculada e representa a média das composições das cores vermelha, verde e azul (VVA) por área de citoplasma analisada; a DO foi expressa em unidades ópticas por micrômetro quadrado (ou/ μm^2). O mesmo procedimento foi aplicado para obter a densidade óptica do fundo (DOF) de uma área sem tecido ou espaço vascular para cada fotomicrografia. Para isso, uma única área foi suficiente, porque o fundo é homogêneo em cada imagem. A cor branca absoluta, que corresponde à densidade óptica máxima (320.7 ou/ μm^2) é composta de uma mistura completa de vermelho, verde e azul, enquanto a cor preta representa a ausência dessas cores. Portanto, os valores de densidade óptica calculados pelo programa compreenderam uma escala decrescente, na qual os valores mais altos corresponderam às cores que foram claramente visíveis. A equação mostrada a seguir foi utilizada para calcular a intensidade digital de expressão (ItE) em cada caso. Seus valores compreenderam uma escala crescente que é igualada pela DOF proporcional à densidade óptica do branco absoluto.

$$\text{ItE} = 320.7 - \frac{320.7 \times \sum \text{DO}}{\sum \text{DOF}} \quad [\text{ou}/\mu\text{m}^2]$$

ÍNDICE DE EXPRESSÃO (IE)

O índice de expressão digital (IE_{dig}) foi obtido pela multiplicação da porcentagem de células marcadas (PCM) pela intensidade de imunomarcação digital (IT_{dig}) para cada caso, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IE} = \frac{\text{IP} \times \text{ItE}}{100} \quad [\text{ou}/\mu\text{m}^2]$$

COLORAÇÃO DE PICROSÍRIUS E HEMATOXILINA-EOSINA

Cortes de tecido do disco intervertebral (3 μm de espessura) fixados previamente em formol tamponado 6 a 24 horas e incubados em parafina foram desparafinizados e reidratados. O tecido foi submetido à coloração do Picrosírius Red por 60 minutos, lavados e corados fortemente com hematoxilina-eosina. O Picrosírius cora em vermelho pelo Sírius Red a proteína colágeno presente em fibras colágenas, fibras reticulares, cartilagens e membranas basilares (ou

basais); o DNA e RNA (núcleo) coram em azul pela hematoxilina e o citoplasma das células epiteliais e musculares cora em róseo ou amarelo pelo ácido pícrico. Os tecidos foram lavados em água, desidratados, diafanizados e montados com entelan e lamínula. As análises das imagens foram através de luz normal e luz polarizada para estudo das fibras colágenas.

EXTRAÇÃO DE RNA E OBTENÇÃO DO cDNA

A extração do RNA total das amostras foi realizada utilizando o reagente Trizol[®] (Ambion by Life Technologies[™], CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi feita no aparelho NanoVue Plus (GE Healthcare, Alemanha). A transcrição reversa foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa ImPromII[™] (Promega Co., WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante para obtenção do DNA complementar (cDNA).

ANÁLISE DA EXPRESSÃO POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A partir do cDNA obtido na reação da transcriptase reversa, descrito anteriormente, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos a partir de estudos e busca no GenBank, para a amplificação das isoformas da heparanase (HPSE1, HPSE2). A expressão do mRNA foi representada em relação à média geométrica da expressão de gene endógeno constitutivo sendo a enzima Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), determinando assim os valores de ($-\Delta Ct$). A expressão de genes alvo foi analisada utilizando os *primers* para as isoformas da heparanase (HPSE1, HPSE2), sequências descritas na Tabela 1. Os ensaios foram realizados em triplicata. Todos os *primers* foram produzidos por (Applied Biosystems, CA, USA). A amplificação foi realizada utilizando-se o reagente Maxima[®] SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems, CA, USA), de acordo com o seguinte protocolo modificado 1,5 μ M de cada *primer*, 1 μ g cDNA, 0,025 μ L da solução de ROX 50 μ M diluída 10X e 6 μ L do SYBR Green 2X. A mistura foi submetida a um termociclador para amplificação em tempo real (7500 Real Time PCR Cycler[®]) (Applied Biosystems, CA, USA), com ciclagem de 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos (95°C, 15 segundos; 60°C, 60 segundos). A temperatura da curva de melt foi determinada para cada par de *primers*.

Tabela 1. Sequências de Oligonucleotídeos Iniciadores para Ratos

mRNA	Forward	Reverse
GAPDH	5'TCTAGAGACAGCCGCATCTTCTTG3'	5'GTCCGATACGGCCAAATCCGTTCA3'
HPSE1	5'AGAAGTCGTGATGAGGCAGGTGTT3'	5'TTGGGTGATAGACGTTTCGTGCAGT3'
HPSE2	5'TTCTAGTGCCCTGAGCCTGTTGAA3'	5'TCCCAACTGACTGCCATTTACTGC3'

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística quantitativa foi realizada utilizando o programa GrandPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA), para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre as variáveis quantitativas, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com teste auxiliar de Dunn nas comparações de subgrupos. Para análise paramétrica, o teste Qui-quadrado foi utilizado para avaliar as variáveis qualitativas utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL). Em todas as análises foi adotado nível de significância estatística de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Cortes das 12 amostras de discos intervertebrais dos ratos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por patologista, para avaliação dos parâmetros histológicos. As alterações no disco intervertebral se concentraram, em sua maioria, na região cartilaginosa (central). Durante o processo degenerativo em modelo animal foram observadas alterações celulares significativas, presença de 60% de apoptose na degeneração do disco intervertebral aos 15 dias em nível leve e nível moderado em 100% dos animais aos 28 dias em relação ao controle.

Foram observadas em todos os tecidos aos 15 dias de degeneração e em 80% dos tecidos aos 28 dias, leve presença de regeneração. Diferenças significativas também foram observadas na matriz extracelular do disco, presença de 60% de calcificação intensa aos 15 dias e aos 28 dias também 60%, mas em nível moderado. No processo inflamatório 60% dos tecidos apresentaram nível moderado aos 15 dias e aos 28 dias de degeneração 80% deles apresentaram nível leve. Embora observamos mudanças em alguns processos da matriz extracelular, não foram encontradas diferenças significativas nas alterações dos tecidos como fratura e fissura, degeneração mixóide e eosinófila. No processo

de neovascularização do disco, observamos notável presença de neovasos durante o processo de degeneração do disco intervertebral ausentes no controle, embora os resultados não sejam estatisticamente significantes. Resultados das alterações celulares e da matriz extracelular no disco intervertebral são apresentados na Tabela 2.

A organização estrutural dos feixes conjuntivos do AF dos discos intervertebrais de ratos durante o processo degenerativo foi avaliada através da coloração de pricosírius red e análise sob luz normal e polarizada.

No grupo controle observamos que as fibras colágenas do AF apresentam um padrão de organização, feixes apenas longitudinais orientados em uma única direção. As fibras apresentam-se espessadas e densamente empacotadas (Figura 1A e B). Aos 15 dias de degeneração do disco intervertebral observamos mudança estruturais nas fibras, presença de feixes longitudinais e transversais sem um padrão de organização e não tão espessadas em relação ao controle (Figura 1C e D). Aos 28 dias de degeneração, notamos elevado grau de desorganização dos feixes, presença de fibrilas representadas em coloração verde sob luz polarizada e associação de novas fibras colágenas representadas em vermelho, como mostra a Figura 1E e F.

Foram realizadas reações de imunohistoquímica das amostras para avaliação da expressão proteica de diversas moléculas envolvidas no processo de remodelamento da matriz extracelular, durante o processo degenerativo.

Análise da expressão do colágeno I, proteína fibrosa abundante no disco intervertebral, revelou redução aos 15 dias de indução da degeneração do disco intervertebral e aumento significativo aos 28 dias em relação ao grupo degenerado. Resultados apresentados em Figura 2 e os níveis de expressão confirmados pela quantificação digital das imagens mostrados na Figura 3.

As proteases envolvidas nos processos de degradação do disco intervertebral (MMP2 e MMP9), demonstraram redução na expressão proteica aos 15 dias de degeneração discal. Enquanto, foi observado aumento significativo de MMP2 aos 28 dias após degeneração. Podemos observar que os resultados obtidos das reações de imunohistoquímica foram correspondentes aos obtidos por quantificação digital das imagens como mostram as Figuras 2 e 3.

As Figuras 4 e 5, mostram respectivamente as reações de imunohistoquímica para avaliação do processo inflamatório do disco

intervertebral. Foi observado aumento da expressão de IL-6 durante o processo degenerativo e diminuição da IL-10.

Na análise da expressão do VEGF, fator de crescimento endotelial vascular, envolvido em processos angiogênicos, notamos aumento significativo na degeneração aguda, aos 15 dias após degeneração discal, em relação ao grupo controle como mostra a Figura 6. A quantificação digital confirmou os resultados obtidos por imunohistoquímica (Figura 7).

Em nosso trabalho observamos que os índices de expressão da caspase-3, protease envolvida diretamente com mecanismos de apoptose celular, aumentaram significativamente durante o processo degenerativo do disco intervertebral em relação ao grupo controle não acometido pela doença (Figuras 6 e 7).

A análise da expressão do RNA mensageiro (mRNA) das isoformas da heparanase realizada por RT-PCR em tempo real, demonstrou que os discos intervertebrais degenerados de ratos apresentaram redução significativa na expressão de HPSE1 e HPSE2 após a indução do processo degenerativo, comparativamente com o grupo controle, como mostra a Figura 8.

Estudos das alterações moleculares e fisiopatológicas que ocorrem durante o processo da degeneração do disco intervertebral são fundamentais para elucidação dos processos moleculares envolvidos na degeneração discal. Tais resultados contribuem para estudos futuros que buscam marcadores de diagnóstico, prognóstico e terapias alvo para a doença que afeta mundialmente grande parte da população.

Ainda, os resultados obtidos durante o processo de degeneração do disco intervertebral realizado em modelo animal demonstraram alterações significativas tanto dos constituintes estruturais como na expressão de moléculas que participam do remodelamento da matriz extracelular.

Tabela 2. Avaliação dos parâmetros histológicos obtidos durante o processo de degeneração em disco intervertebral de Ratos Wistar.

Parâmetros Histológicos		Controle (n=2)	Degeneração 15 dias (n=5)	Degeneração 28 dias (n=5)	P
Alterações celulares	Apoptose				
	(0)	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	*0,002
	(+)	0 (0.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	
	(++)	0 (0.0)	2 (40.0)	5 (100.0)	
	(+++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	Regeneração				
	(0)	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	*0,010
	(+)	0 (0.0)	5 (100.0)	4 (80.0)	
	(++)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	
	(+++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Alterações da Matriz Extracelular	Fratura/Fissura				
	(0)	2 (100.0)	3 (60.0)	5 (100.0)	0,186
	(+)	0 (0.0)	2 (40.0)	0 (0.0)	
	(++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	(+++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	Calcificação				
	(0)	2 (100.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	*0,022
	(+)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (40.0)	
	(++)	0 (0.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	
	(+++)	0 (0.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	
	Degeneração Mixóide				
	(0)	1 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0,065
	(+)	1 (50.0)	5 (100.0)	5 (100.0)	
	(++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	(+++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	Degeneração Eosinófilica				
	(0)	2 (100.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	0,125
	(+)	0 (0.0)	2 (40.0)	2 (40.0)	
	(++)	0 (0.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	
	(+++)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	
	Infiltrado Inflamatório				
	(0)	2 (100.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	*0,025
	(+)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (80.0)	
	(++)	0 (0.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	
	(+++)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	
	Neovascularização				
	(0)	2 (100.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	0,380
	(+)	0 (0.0)	1 (20.0)	2 (40.0)	
	(++)	0 (0.0)	2 (40.0)	2 (40.0)	
	(+++)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	

Graduação das alterações: 0, Ausente; (+), Leve; (++) Moderado; (+++), Intenso.

Porcentagem (%), * Significância Estatística (Teste Qui-Quadrado)

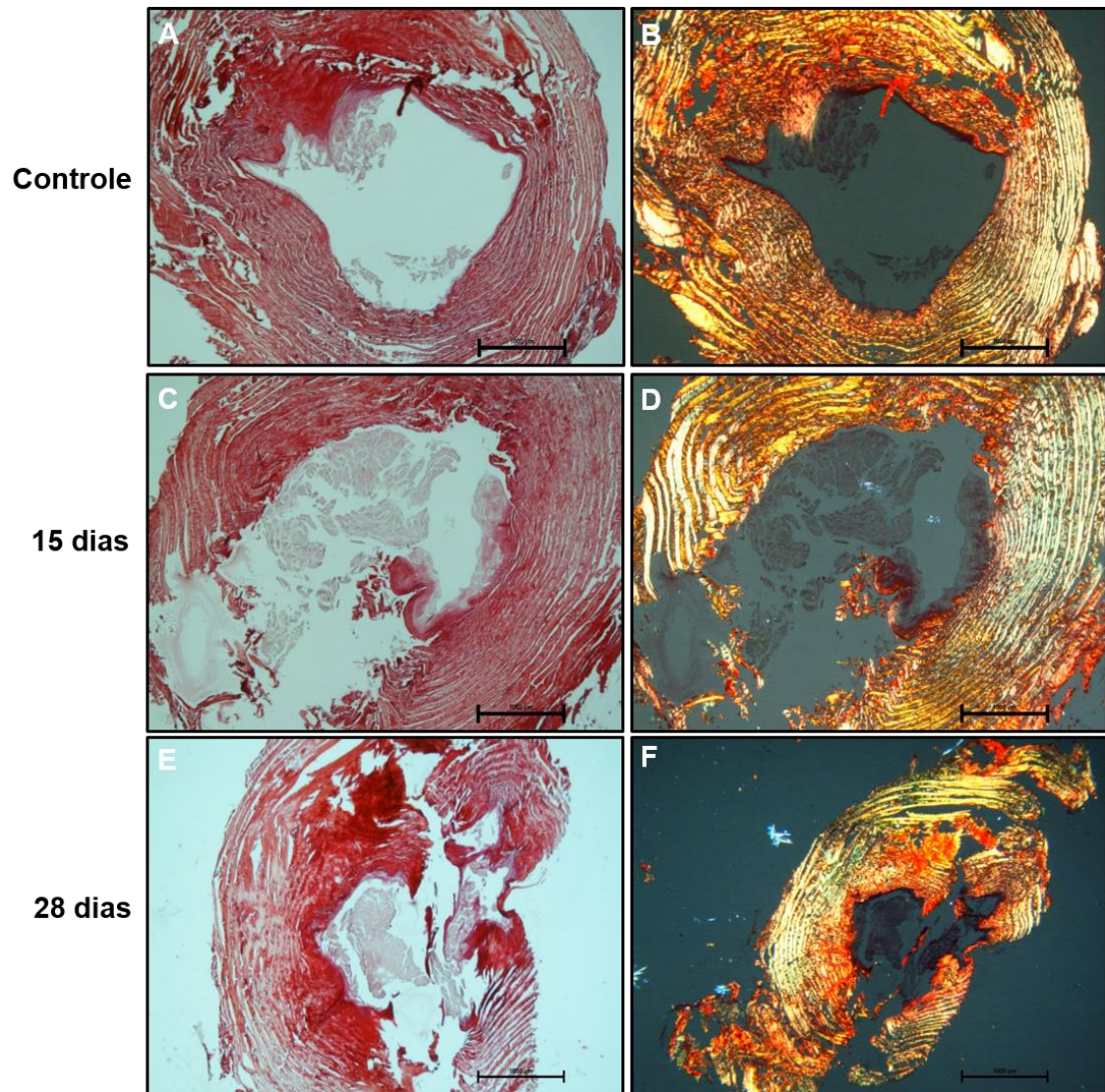


Figura 1. Avaliação da organização estrutural e orientação dos feixes conjuntivos do AF através da coloração de picrosírius red, análise sob luz normal e polarizada durante o processo degenerativo. A, análise sob luz normal da coloração de picrosírius e **B,** análise sob luz polarizada, do disco intervertebral controle, demonstrando um padrão de organização das fibras colágenas com feixes apenas longitudinais e orientados em uma única direção, aspecto espesso e fibras densamente empacotadas. **C,** análise sob luz normal da coloração de picrosírius e **D,** análise sob luz polarizada, em discos intervertebrais aos 15 dias de degeneração, demonstrou presença de feixes longitudinais e transversais sem um padrão de organização e com fibras não tão espessas em relação ao controle. **E,** análise sob luz normal da coloração de picrosírius e **F,** análise sob luz polarizada, evidente em elevado grau de degeneração (28 dias) a desorganização dos feixes, associação de fibras (vermelho) e presença de fibrilas (verde).

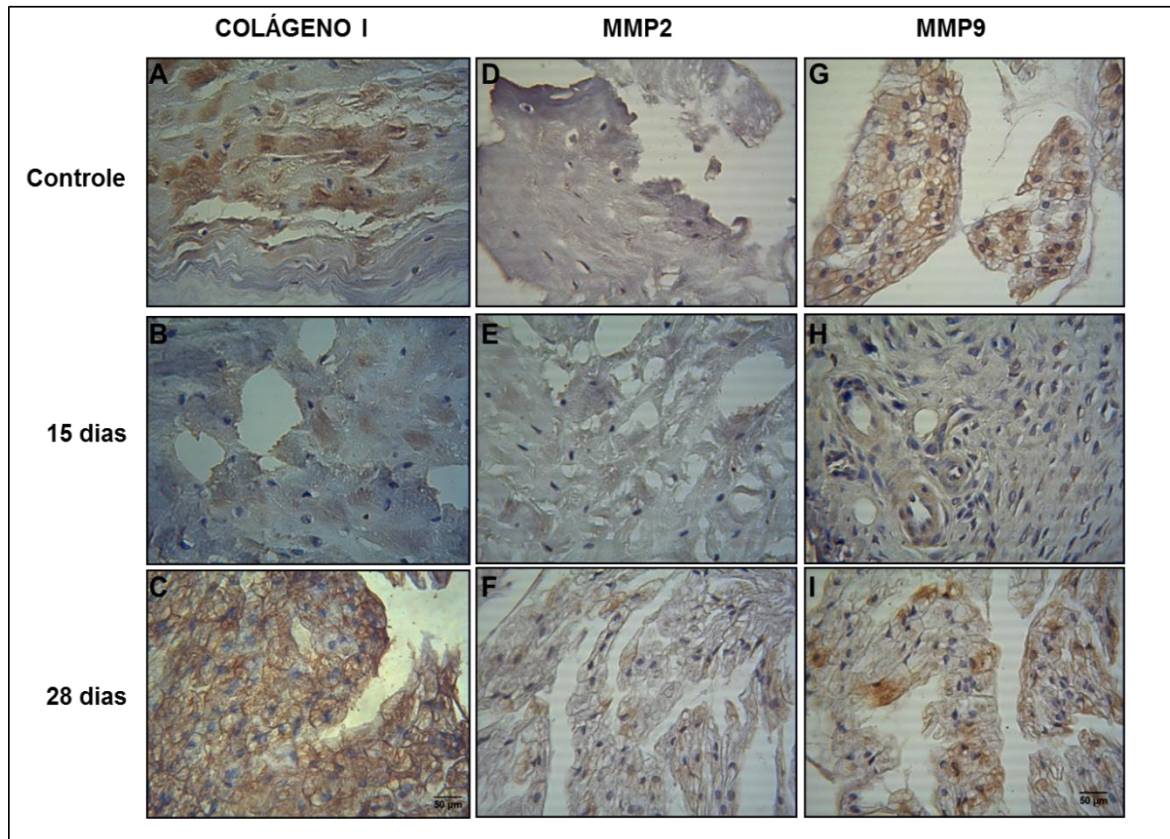


Figura 2. Imunohistoquímica do disco intervertebral de ratos durante o processo degenerativo (15 e 28 dias) e controle (sem degeneração) para análise de expressão de colágeno I, metaloproteinase-2 (MMP2) e metaloproteinase-9 (MMP9). A, B e C, tecidos marcados com anticorpo primário colágeno I (C 2456); D, E e F, tecidos marcados com anticorpo primário MMP2 (H-76); G, H e I, tecidos marcados com anticorpo primário MMP9 (H-129). As reações foram realizadas seguindo metodologia descrita detalhadamente em Métodos.

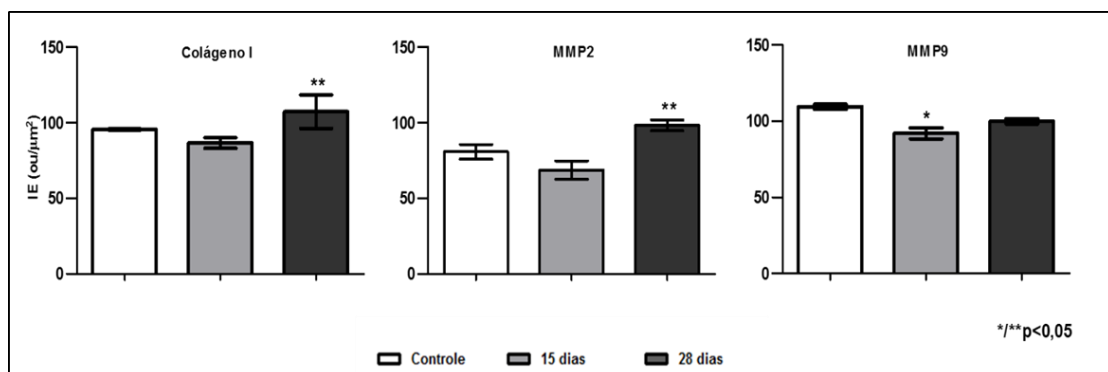


Figura 3. Expressão de colágeno I e metaloproteinases (MMP2 e MMP9) em discos intervertebrais de ratos durante o processo degenerativo (15 e 28 dias) e controle (sem degeneração) por imunohistoquímica. Os valores indicam o índice de expressão (IE) obtido por quantificação digital após as reações de imunohistoquímica, utilizando os anticorpos específicos: colágeno I C 2456, MMP2 (H-76) e MMP9 (H-129). Os valores expressam a média e desvio padrão de todas as amostras analisadas. Análises estatísticas foram realizadas, utilizando o Kruskal-Wallis Test com o teste auxiliar de Dunn's Multiple Comparison Test. * $P < 0,05$ na comparação dos grupos degenerados em relação ao grupo controle e ** $P < 0,05$ na comparação entre os grupos degenerados.

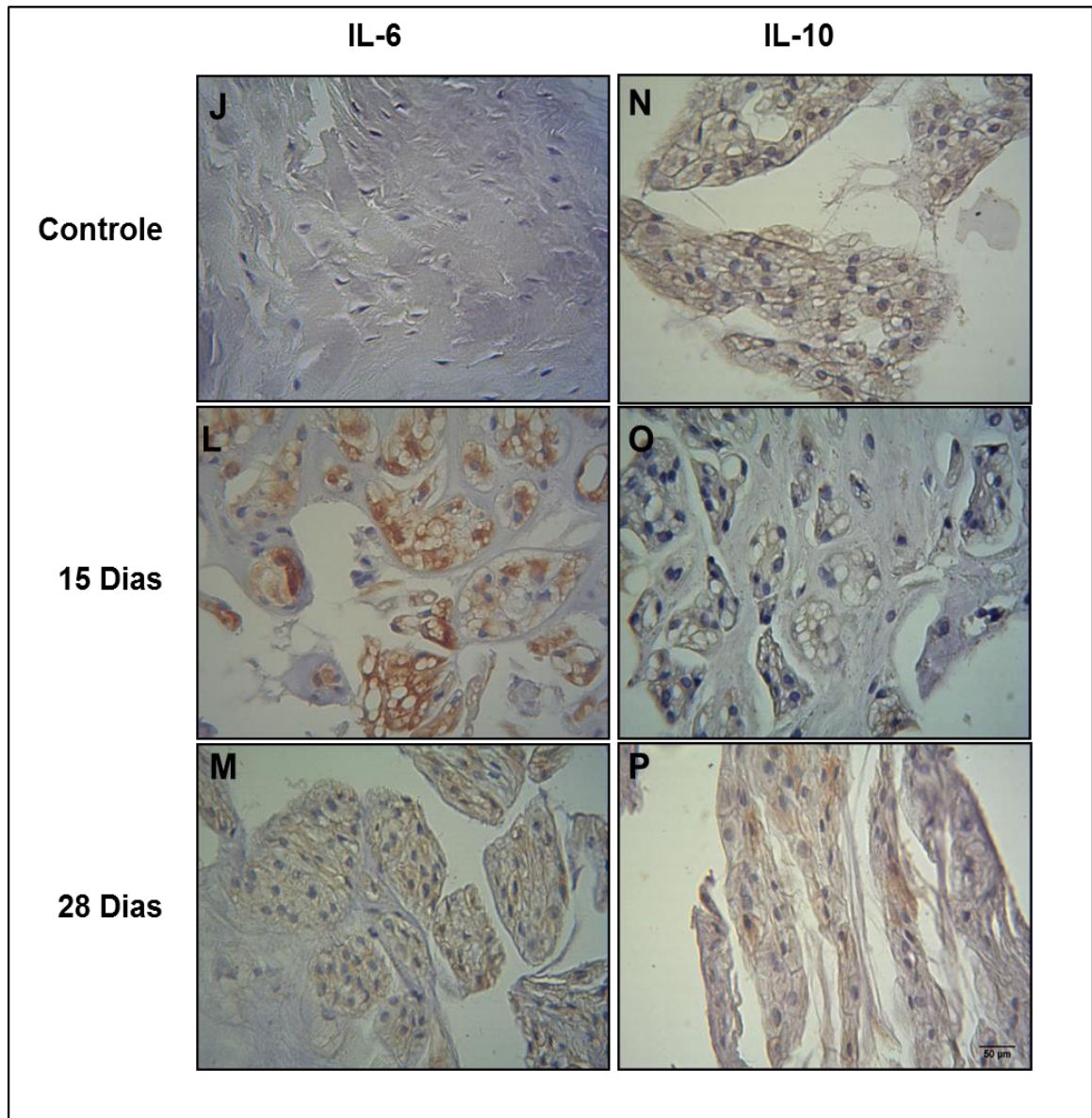


Figura 4. Reações de imunohistoquímica em disco intervertebral de ratos durante o processo degenerativo (15 e 28 dias) e controle (sem degeneração) para análise da expressão de interleucinas. J, L e M, tecidos marcados com anticorpo primário interleucina-6 (1) 130326; N, O e P, tecidos marcados com anticorpo primário interleucina-10 (H-160). As reações foram realizadas seguindo metodologia descrita detalhadamente em Métodos.

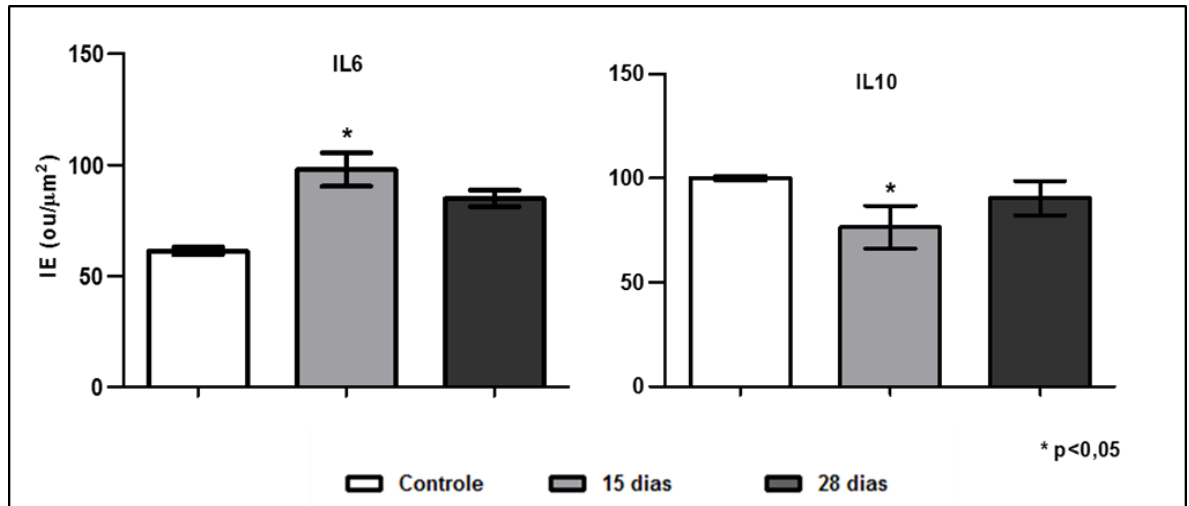


Figura 5. Expressão de interleucinas em discos intervertebrais de ratos durante o processo degenerativo (15 e 28 dias) e controle (sem degeneração) por imunohistoquímica. Os valores indicam o índice de expressão (IE) obtido por quantificação digital após as reações de imunohistoquímica, utilizando os anticorpos específicos: interleucina-6 (1) 130326 e interleucina-10 (H-160). Os valores expressam a média e desvio padrão de todas as amostras analisadas. Análises estatísticas foram realizadas, utilizando o Kruskal-Wallis Test com o teste auxiliar de Dunn's Multiple Comparison Test. * P < 0,05 na comparação dos grupos degenerados em relação ao grupo controle.

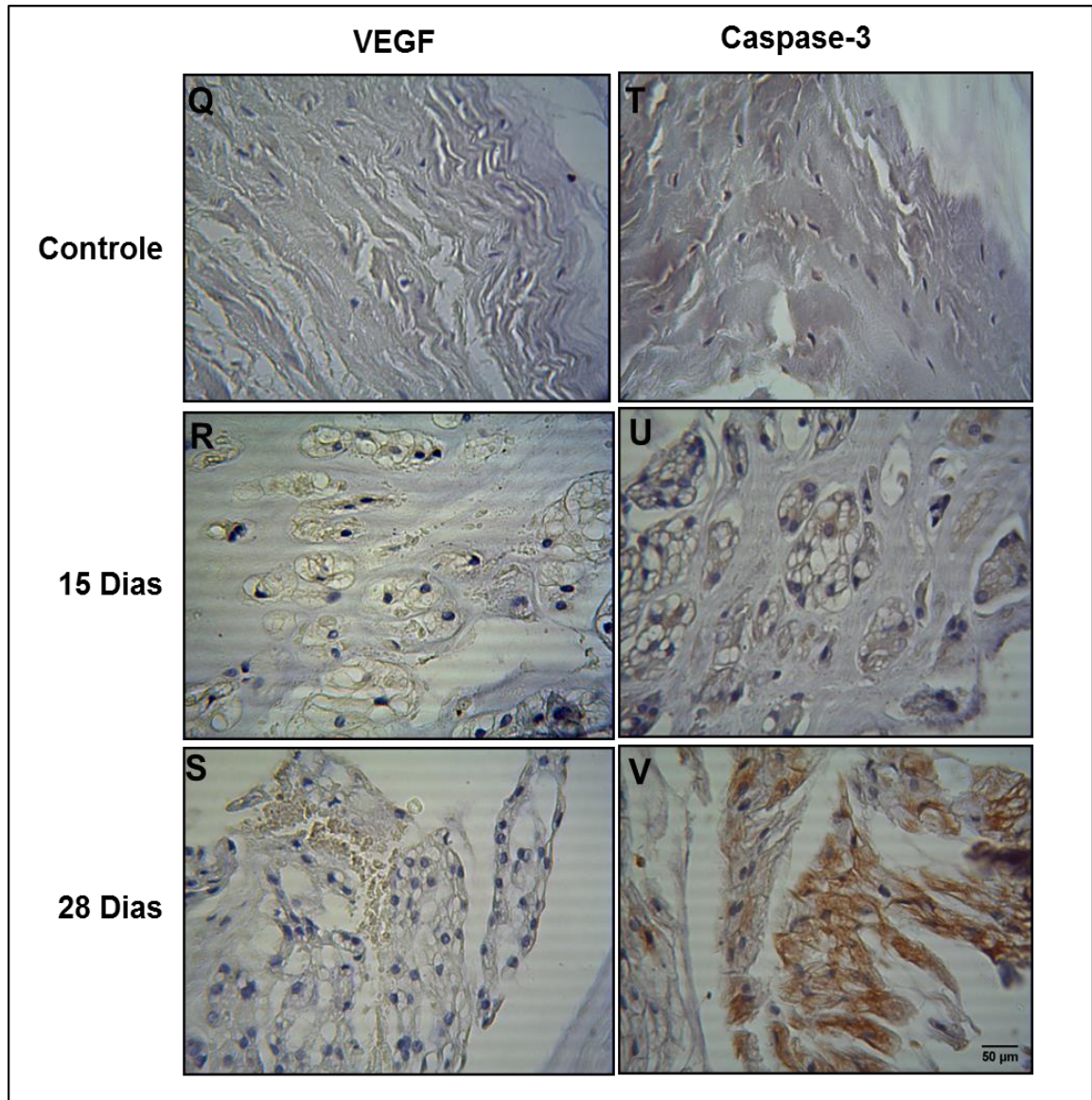


Figura 6. Reações de imunohistoquímica em disco intervertebral de ratos durante o processo degenerativo (15 e 28 dias) e controle (sem degeneração) para análise de expressão de VEGF e Caspase-3. Q, R e S, tecidos marcados com anticorpo primário VEGF-A (18077); T, U e V tecidos marcados com anticorpo primário caspase-3 (3015-100). As reações foram realizadas seguindo metodologia descrita detalhadamente em Métodos.

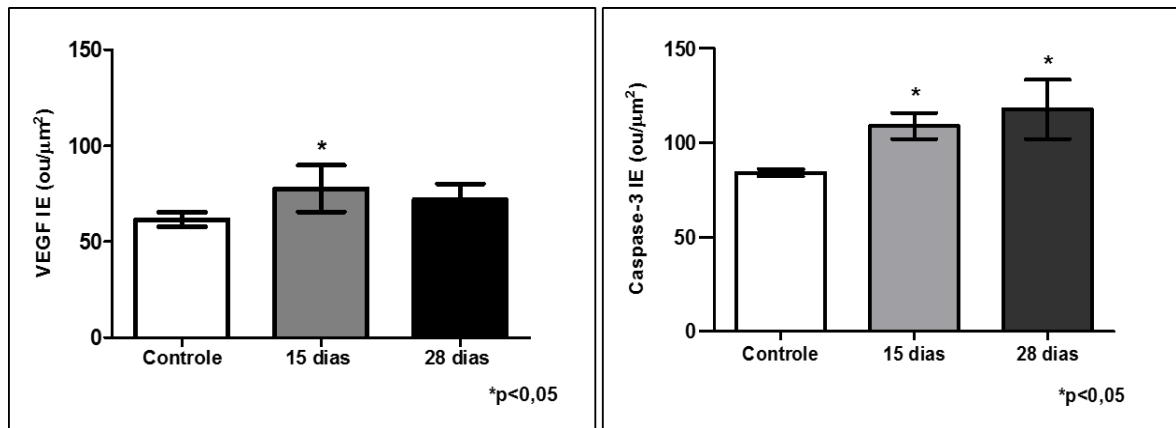


Figura 7. Expressão de VEGF e Caspase-3 em discos intervertebrais de ratos durante o processo degenerativo (15 e 28 dias) e controle (sem degeneração) por imunohistoquímica. Os valores indicam o índice de expressão (IE) obtido por quantificação digital após as reações de imunohistoquímica, utilizando os anticorpos específicos: VEGF-A (18077) e caspase-3 (3015-100). Os valores expressam a média e desvio padrão de todas as amostras analisadas. Análises estatísticas foram realizadas, utilizando o Kruskal-Wallis Test com o teste auxiliar de Dunn's Multiple Comparison Test. * P<0,05 na comparação dos grupos degenerados em relação ao grupo controle.

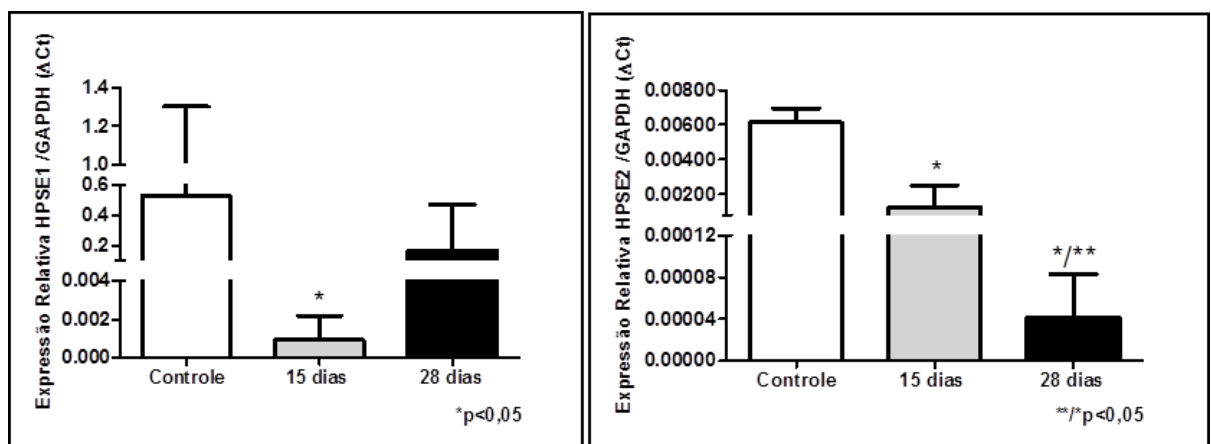


Figura 8. Análise da expressão das isoformas de heparanase em discos intervertebrais de ratos durante o processo degenerativo (15 e 28 dias) e controle (sem degeneração). Expressão relativa HPSE1 e expressão relativa HSPE2. Análises estatísticas foram realizadas, utilizando o Kruskal-Wallis Test com o teste auxiliar de Dunn's Multiple Comparison Test. * P<0,05 na comparação dos grupos degenerados em relação ao grupo controle e **P<0,05 na comparação entre os grupos degenerados.

DISCUSSÃO

O estudo da degeneração do disco intervertebral é imprescindível para melhor entendimento da fitopatologia da doença degenerativa discal que acomete mundialmente grande parte da população e afeta diretamente a qualidade de vida dos indivíduos.

A degeneração do disco intervertebral altera constituintes moleculares e estruturais promovendo reorganização desordenada do colágeno afetando

diretamente o comportamento biomecânico do disco. O NP perde a capacidade de absorção de água em consequência da redução de proteoglicanos e do colágeno prejudicando sua capacidade de resistir às altas cargas em que é submetido durante os movimentos. Afeta o AF, que torna o elemento suporte dessas cargas, essa alteração no conteúdo e direcionamento do colágeno durante o processo degenerativo resulta no endurecimento do tecido do AF ⁽³¹⁻³³⁾.

Neste estudo avalia-se a distribuição e expressão de constituintes da matriz extracelular e do disco intervertebral durante o processo degenerativo em modelo animal, aos 15 dias de evolução da doença caracterizados como processo agudo e 28 dias de degeneração representando a evolução crônica da doença em relação ao grupo controle, sem degeneração.

Na reação de imunohistoquímica nota-se que os níveis de expressão de colágeno I no tecido dos ratos expressaram leve redução aos 15 dias elevando-se significativamente aos 28 dias de expressão. Em relação à organização das fibras colágenas, observadas através da coloração de picrosírius red e análise sob luz normal e polarizada, observa-se que no grupo controle elas apresentaram um padrão de organização, feixes longitudinais e orientados em uma única direção. Aos 15 dias de degeneração essa organização estrutural é alterada apresentando fibras desorganizadas e pouco espessas e aos 28 dias da degeneração evidente desorganização das fibras de colágeno.

Na avaliação histológica das 12 amostras de discos intervertebrais de ratos em todo o processo degenerativo foram encontradas evidentes alterações celulares no disco intervertebral. Os níveis apoptóticos aumentaram gradativamente durante o desenvolvimento da doença (15 e 28 dias da indução da degeneração), em relação ao grupo controle e significativamente todos os animais apresentaram processo de regeneração do tecido aos 15 dias da indução, além de intensa calcificação e presença moderada de infiltrado inflamatório.

Aos 28 dias (degeneração crônica), o processo de calcificação e inflamação foram menos significativos. O estudo de Yurube e colaboradores ⁽³⁴⁾, demonstrou que na degeneração discal em modelo animal de cauda de ratos, a proporção de células em apoptose também aumentou significativamente, corroborando com nossos resultados.

Estudos preliminares realizados mostraram que ocorrem alterações da matriz extracelular durante a degeneração discal e de outros constituintes de matriz ⁽²⁸⁾.

Notamos que a expressão proteica de colágeno I e MMP2 apresentaram redução aos 15 dias e aos 28 dias seus índices de expressão elevaram-se significativamente. Um estudo realizado em 2013 por Rastogi e colaboradores ⁽³⁵⁾, em modelo animal, mostrou que a MMP2 está mais expressa em processos degenerativos e que participa diretamente no remodelamento do colágeno por regular a atividade das gelatinases.

Em relação a MMP9 notamos redução de seus índices aos 15 dias e um discreto aumento aos 28 dias embora menor que o controle. A MMP9 e a MMP2 conforme a literatura estão menos expressas na escoliose em relação aos processos degenerativos possivelmente pelo remodelamento do tecido ^(36,37).

As citocinas inflamatórias apresentam papel fundamental nas fases da degeneração do disco intervertebral. O início da doença é caracterizado por uma lesão inicial onde as células regulam a expressão de citocinas inflamatórias como TNF, IL - 1 β e IL-6 e moléculas de degradação da matriz extracelular resultando em lágrimas, fissuras ocasionando instabilidade mecânica ao disco. Na segunda fase da doença as citocinas são liberadas ativando a infiltração de leucócitos no tecido e a resposta inflamatória acompanhada pela neovascularização e o aparecimento de fibras nervosas. A fase final é caracterizada pela sensibilização das terminações nervosas mediada pelo processo inflamatório e neurotrofinas resultando em dor ⁽³⁸⁾. Utilizando modelo animal da degeneração do disco intervertebral, obtivemos aumento significativo na expressão proteica da IL-6 e VEGF em fase aguda da doença e discreta redução aos 28 dias, fase crônica. Na avaliação histológica dos tecidos notamos que 60% dos animais apresentaram níveis moderados de processo inflamatório na fase aguda da doença e em fase crônica esses índices apresentaram apenas leve presença de inflamação no tecido. Foi encontrada presença de neovascularização nas duas fases da doença ausentes no controle, esses resultados são condizentes com a literatura.

O VEGF está envolvido em processos de neovascularização anormal, crescimento de vasos em discos sintomáticos, dados que corroboram com a literatura, onde um estudo com células humanas mostrou que uma lesão no AF

tem o potencial de iniciar um processo inflamatório e a neovascularização do tecido, envolvendo um VEGF e citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TGF- β ⁽³⁹⁾.

Observou-se que na fase aguda da doença a expressão proteica de IL-10, citocina pró-inflamatória, reduziu significativamente e aos 28 dias elevaram-se. A literatura mostra que essa citocina está envolvida em fases tardias da degeneração ^(25,28).

Foi observado que, a produção anormal de moléculas pró-inflamatórias no processo degenerativo do disco podem desencadear uma série de respostas patogênicas nas células do disco intervertebral promovendo a autofagia, senescência e apoptose celular ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.

Avaliamos também a expressão proteica de caspase-3, marcador de indução de apoptose e observamos que os índices elevaram-se gradativamente e significativamente durante o processo degenerativo, condizente com dados de Yurube et al 2014 ⁽³⁴⁾, que observaram níveis elevados de caspase-3 durante todo o processo degenerativo em ratos.

As isoformas de heparanase estão diretamente relacionadas com processos de remodelamento tecidual. A HPSE1 contribui para a degradação das cadeias dos proteoglicanos de heparam sulfato, os quais estão diretamente relacionados com mecanismos de proliferação celular, migração e adesão ⁽⁴³⁾.

Os dados obtidos confirmam que tal glicosidase (HPSE1), bem como a isoforma HPSE2 também estão envolvidas no desenvolvimento da degeneração do disco intervertebral.

CONCLUSÃO

Notamos que durante o processo degenerativo do disco intervertebral avaliado em modelo animal, alterações celulares e estruturais no disco como o surgimento de estruturas vasculares ocorreram principalmente aos 15 dias, caracterizado como fase aguda da doença e aos 28 dias da indução, fase crônica. Observamos o remodelamento do tecido por alteração de proteases, colágeno, glicosidase, VEGF, caspase-3 e citocinas, que sugerem remodelamento intenso da matriz extracelular acarretando cicatrização da lesão (degeneração do disco intervertebral).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao suporte financeiro que permitiu a realização deste estudo, concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Zhang YG, Sun ZM, Liu JT, Wang SJ, Ren FL, Guo X. Features of intervertebral disc degeneration in rat's aging process. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009 Jul;10(7):522-7.
2. Brisby H, Wei AQ, Molloy T, Chung SA, Murrell GA, Diwan AD. The effect of running exercise on intervertebral disc extracellular matrix production in a rat model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010 Jul 1;35(15):1429-36.
3. Leysen P, Bombeke K, Remmen R. Osteopathic manual treatment and ultrasound therapy for chronic low back pain: an illustration of osteopathic semantic confusion. *J Am Osteopath Assoc*. 2013 Sep;113(9):660-1.
4. Chan WC, Sze KL, Samartzis D, Leung VY, Chan D. Structure and biology of the intervertebral disk in health and disease. *Orthop Clin North Am*. 2011 Oct;42(4):447-64.
5. Horng YS, Hwang YH, Wu HC, Liang HW, Mhe YJ, Twu FC, et al. Predicting health-related quality of life in patients with low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Mar; 30(5):551-5.
6. Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet*. 1999 Aug 14;354(9178):581-5.
7. Liang C, Li H, Tao Y, Zhou X, Li F, Chen G, et al. Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. *J Transl Med*. 2012 Mar 16;10:49.
8. Licciardone JC, Minotti DE, Gatchel RJ, Kearns CM, Singh KP. Osteopathic manual treatment and ultrasound therapy for chronic low back pain: a randomized controlled trial. *Ann Fam Med*. 2013 Mar-Apr;11(2):122-9.
9. Kresse H, Schönherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol*. 2001 Dec;189(3):266-74.
10. Woods A, McCarthy JB, Furcht LT, Couchman JR. A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*. 1993 Jun;4(6):605-13.
11. Zhu J, Beamish JA, Tang C, Kottke-Marchant K, Marchant RE. Extracellular matrix-like celladhesive hydrogels form RGD-containing poly(ethylene glycol) diacrylate. *Macromolecules*. 2006; 39(4):1305–1307.
12. Nomizu M, Weeks BS, Weston CA, Kim WH, Kleinman HK, Yamada Y. Structure-activity study of a laminin alpha 1 chain active peptide segment Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV). *FEBS Lett*. 1995 May 29;365(2-3):227-31.
13. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis

- and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest*. 1996 Aug 15;98(4):996-1003.
14. Dietrich CP, Sampaio LO, Toledo OM, Cássaro CM. Cell recognition and adhesiveness: a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977 Mar 21;75(2):329-36.
 15. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2010 Oct;277(19):3904-23.
 16. Dietrich CP, Tersariol IL, Toma L, Moraes CT, Porcionatto MA, Oliveira FW, et al. Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide domains in eight heparan sulfates of different origins. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998 May;44(3):417-29.
 17. Sivan SS, Hayes AJ, Wachtel E, Caterson B, Merkher Y, Maroudas A, et al. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur Spine J*. 2013 Apr 17. [Epub ahead of print]
 18. Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004 Dec 1; 29(23):2691-9.
 19. Kepler CK, Ponnappan RK, Tannoury CA, Risbud MV, Anderson DG. The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J*. 2013 Mar;13(3):318-30.
 20. 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 May;20(3):409-15.
 21. Moon HJ, Yurube T, Lozito TP, Pohl P, Hartman RA, Sowa GA, et al. Effects of secreted factors in culture medium of annulus fibrosus cells on microvascular endothelial cells: elucidating the possible pathomechanisms of matrix degradation and nerve in-growth in disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Dec 18. pii: S1063-4584(13)01041-8.
 22. Tawara K, Oxford JT, Jorcyk CL. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. *Cancer Manag Res*. 2011;3:177-89.
 23. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011 Apr;22(2):83-9.
 24. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:205-18.
 25. Holm S, Mackiewicz Z, Holm AK, Kontinen YT, Kouri VP, Indahl A, et al. Pro-inflammatory, pleiotropic, and anti-inflammatory TNF-alpha, IL-6, and IL-10 in experimental porcine intervertebral disc degeneration. *Vet Pathol*. 2009 Nov;46(6):1292-300.
 26. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005 Jun;21(6):775-7.
 27. Zhang H, La Marca F, Hollister SJ, Goldstein SA, Lin CY. Developing consistently reproducible intervertebral disc degeneration at rat caudal spine by using needle puncture. *J Neurosurg Spine*. 2009; 10(6):522-30.
 28. de Oliveira CP, Rodrigues LM, Fregni MV, Gotfryd A, Made AM, Pinhal MA. Extracellular matrix remodeling in experimental intervertebral disc degeneration. *Acta Ortop Bras*. 2013 May;21(3):144-9.

29. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):5-14.
30. Matos LL, Stabenow E, Tavares MR et al. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics* 2006; 61:417-24.
31. Gu WY, Mao XG, Foster RJ, Weidenbaum M, Mow VC, Rawlins BA. The anisotropic hydraulic permeability of human lumbar anulus fibrosus. Influence of age, degeneration, direction, and water content. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999 Dec 1;24(23):2449-55.
32. Johannessen W, Elliott DM. Effects of degeneration on the biphasic material properties of human nucleus pulposus unconfined compression. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Dec 15;30(24):E724-9.
33. Galbusera F, van Rijsbergen M, Ito K, Huyghe JM, Brayda-Bruno M, Wilke HJ. Ageing and degenerative changes of the intervertebral disc and their impact on spinal flexibility. *Eur Spine J*. 2014 Jan 31. [Epub ahead of print]
34. Yurube T, Hirata H, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Zhang Z, Takayama K, Matsushita T, Kuroda R, Kurosaka M, Nishida K. Notochordal cell disappearance and modes of apoptotic cell death in a rat tail static compression-induced disc degeneration model. *Arthritis Res Ther*. 2014 Jan 29;16(1):R31. [Epub ahead of print]
35. Rastogi A, Kim H, Twomey JD, Hsieh AH. MMP-2 mediates local degradation and remodeling of collagen by annulus fibrosus cells of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2013 Apr 27;15(2):R57. [Epub ahead of print]
36. Crean JK, Roberts S, Jaffray DC, Eisenstein SM, Durance VC. Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997 Dec 15;22(24):2877-84.
37. Haschtmann D, Ferguson SJ, Stoyanov JV. Apoptosis and gene expression of collagenases but not gelatinases in rabbit disc fragment cultures. *J Neurosurg Spine*. 2008 Jun;8(6):552-60.
38. Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Jan;10(1):44-56.
39. Moon HJ, Kim JH, Lee HS, Chotai S, Kang JD, Suh JK, Park YK. Annulus fibrosus cells interact with neuron-like cells to modulate production of growth factors and cytokines in symptomatic disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Jan 1;37(1):2-9.
40. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88 Suppl 2:10-4.
41. Purmessur D, Walter BA, Roughley PJ, Laudier DM, Hecht AC, Iatridis J. A role for TNF α in intervertebral disc degeneration: a non-recoverable catabolic shift. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Mar 29;433(1):151-6.
42. Shen C, Yan J, Jiang LS, Dai LY. Autophagy in rat annulus fibrosus cells: evidence and possible implications. *Arthritis Res Ther*. 2011 Aug 16;13(4):R132.
43. Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase

3.3 Artigo 3: Expressão das metaloproteinases 2 e 9 da matriz e do TGF-B na hipertrofia do ligamento amarelo

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 AND TGF-B IN
LIGAMENTUM FLAVUM HYPERTROPHY

EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS 2 Y 9 DE LA MATRIZ Y DEL TGF-B EN LA
HIPERTROFIA DEL LIGAMENTO AMARILLO

Marcelo Ferraz de Campos¹, Cintia Pereira de Oliveira¹, Maria Aparecida da Silva
Pinhal¹, Luciano Miller Reis Rodrigues¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a expressão das metaloproteinases e do TGFb em pacientes com estenose do canal vertebral e em pacientes mais jovens que apresentam hérnia de disco. Métodos: Foram analisadas 19 amostras de LA, sendo nove de pacientes com estenose de canal lombar e 10 de pacientes com hérnia discal. Do total, cinco pacientes tinham de 15 a 40 anos, 10 tinham de 40 a 65 anos e quatro tinham mais de 65 anos. As áreas representativas do LA foram escolhidas com base na coloração dos tecidos por hematoxilina-eosina. Os cortes de 3 µm de espessura incluídos em parafina e fixados em formalina foram desparafinizados e reidratados. Todos os ligamentos foram incubados overnight a 40C com os anticorpos primários. Resultados: Constatou-se aumento do TGFb em indivíduos mais velhos, embora sem significância estatística. Conclusão: As metaloproteinases não apresentaram diferença importante entre os grupos tanto com relação à idade quanto ao tipo de alteração da coluna vertebral.

Descritores: Ligamento amarelo; Metaloproteinases; Estenose espinal.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the expression of matrix metalloproteinases and TGFb in patients with spinal stenosis and in younger patients who have herniated disc. Methods: 19 samples of LA were analyzed, nine of them with lumbar canal stenosis and 10 with disc herniation. Of the total, five patients were aged between 15 and 40 years, 10 were between 40 and 65 years and four had more than 65 years. Representative areas of LF were chosen based on the staining of tissues with hematoxylin-eosin. The 3µm-thick sections embedded in paraffin and fixed in

formalin were deparaffinized and rehydrated. All ligaments were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Results: An increase of TGF β was verified in older individuals, although without statistical significance. Conclusion: Metalloproteinases showed no significant difference between both groups with respect to age and type of abnormality of the spine.

Keywords: Ligamentum flavum; Metalloproteinases; Spinal stenosis.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la expresión de metaloproteinasas de la matriz y del TGF β en pacientes con estenosis espinal y en pacientes más jóvenes que tienen una hernia de disco. Métodos: Diecinueve muestras de LA fueron enviadas, de nueve pacientes con estenosis del canal lumbar y diez pacientes con hernia de disco. Del total de pacientes, cinco tenían de 15 a 40 años, 10 tenían de 40 a 65 años y cuatro tenían más de 65 años. Áreas representativas de LA se eligieron sobre la base de la tinción de los tejidos con hematoxilina-eosina. Las secciones de 3 μ m de espesor, incluidas en parafina y fijadas en formalina fueron desparafinadas y rehidratadas. Todos los ligamentos se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios. Resultados: Se encontró un aumento de TGF β en personas mayores, aunque sin significación estadística. Conclusión: Las metaloproteinasas no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a la edad y el tipo de anomalía de la columna vertebral.

Descriptores: Ligamento amarillo; Metaloproteinasas, Estenosis espinal.

INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento da população tem aumentado a incidência de doenças da coluna vertebral, sendo o estreitamento do canal vertebral as principais causas de dor e de limitação funcional em pacientes idosos. A causa desse estreitamento pode ser devido à artrose facetária, abaulamento discal e principalmente a hipertrofia do ligamento amarelo (HLA).¹

Os fatores relacionados com a hipertrofia desse ligamento têm sido parcialmente elucidados, e nenhuma profilaxia efetiva ou opção terapêutica a não ser a cirurgia de descompressão estão bem estabelecidas. Histologicamente o ligamento amarelo é composto por 70% de fibras elásticas e 30% de fibras colágenas que se dispõem em paralelo em várias camadas.^{2,3} Durante a

hipertrofia do ligamento há diminuição do conteúdo de fibras elásticas e aumento das fibras colágenas, calcificação, ossificação e condrometaplasia.⁴⁻⁶

Sairyo et al.^{7,8} demonstraram correlação entre o endurecimento do ligamento amarelo e o grau de fibrose, que teriam como resultado processos inflamatórios repetitivos devido ao estresse mecânico que o ligamento sofre durante os movimentos da coluna vertebral. Park e colaboradores demonstraram que o aumento da expressão do TGF β (fator de transformação do crescimento beta), proteína que controla a proliferação celular e atua nos estágios iniciais da oncogênese, ligamento amarelo.⁹

Na tentativa de desenvolver opções terapêuticas futuras será necessário entender se a hipertrofia tem origem no estresse biomecânico provocado pela movimentação da coluna, ou se esse processo se inicia devido às alterações inflamatórias no disco e em tecidos adjacentes que acabam predispondo a inflamação do ligamento amarelo e sua hipertrofia. Com essa teoria pacientes com história de doença do disco intervertebral teriam maior predisposição de desenvolver alterações no ligamento amarelo no futuro. O objetivo do nosso estudo foi avaliar a expressão das metaloproteinases e do TGF- β nos ligamentos amarelos em pacientes com estenose do canal vertebral e em pacientes mais jovens que apresentam outras doenças da coluna como hérnia de disco.

MÉTODO

Foram estudados 19 amostras de ligamento amarelo (região profunda) de indivíduos com estenose de canal lombar e hérnia de disco coletados pelo cirurgião, no período de maio de 2013 a janeiro de 2014, sendo utilizado imagens de ressonância nuclear magnética do segmento da coluna lombar como complementação no diagnóstico. Esses ligamentos foram obtidos durante a cirurgia para tratamento tanto de hérnia de disco quanto de estenose do canal lombar. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, Brasil. Os indivíduos foram divididos em três grupos conforme a idade: menor que 40 anos, entre 40 e 65 anos e maior que 65 anos. Em relação à faixa etária: grupo I de 15 a 40 anos foram cinco amostras (idade média: 29,2), grupo II de 40 até 65 anos foram dez amostras (idade média: 48,4) e grupo III acima de 65 anos foram quatro amostras (idade média: 74).

Quanto à patologia: grupo I estenose do canal lombar foram nove pacientes e grupo II hérnia de disco foram dez pacientes.

Os critérios de inclusão foram:

Na hérnia de disco: fragmentos extrusos localizados na região centro-lateral do canal vertebral, mais de três meses de sintomatologia, sem cirurgia prévia no segmento lombar e localização da hérnia de disco no segmento L4-L5 ou L5-S1. Na estenose de canal lombar: queixa principal de claudicação neurogênica, fator principal de compressão do canal lombar a hipertrofia do ligamento amarelo, localização da estenose no segmento L4-L5 ou L5-S1.

Imunohistoquímica

Áreas representativas do ligamento amarelo foram escolhidas com base na coloração dos cortes de tecido por hematoxilina-eosina (HE). Cortes com 3 µm de espessura, embebidos em parafina e fixados em formalina, foram desparafinizados e reidratados. A recuperação do antígeno foi realizada pelo aquecimento das lâminas a 100°C, por 30 minutos em um tampão citrato 10 mmol/L, pH 6,0. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% por 35 minutos. Os cortes foram, então, incubados overnight a 4°C com os anticorpos primários: anti-decorin (N-15), anti-biglicam (L-15), TGF-β1(sc-146), anti-MMP-9 (H-129), e anti-MMP-2 (H-76) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Finalmente, as lâminas foram incubadas com um complexo de estreptavidina marcado com peroxidase (LSAB®, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos. Os cortes foram revelados, utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por 1 minuto e foram contra corados com hematoxilina. Algumas amostras foram incubadas com tampão fosfato 1 M na ausência do anticorpo primário, como controles negativos. A presença de coloração marrom foi considerada evidência de expressão positiva das respectivas moléculas na célula.

Quantificação digital

As lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de luz TS100 Nikon Eclipse® para identificar as áreas que melhor representaram a imunomarcagem das moléculas analisadas (hot spots). Em cada caso, a quantificação da imunomarcagem foi realizada por um método de análise digital por computador. As fotomicrografias de 640x480 pixels foram obtidas de campos

consecutivos não coincidentes em aumento de 400X com câmera digital 4300 Nikon Coolpix® ajustada para os mesmos parâmetros. As imagens obtidas foram analisadas pelo sistema de processamento e análise de imagens ImageLab® (Softium Informática®, São Paulo, Brasil), ajustado para a escala micrométrica (µm). Índice de positividade (IP) Em cada caso, pelo menos 1.000 células foram contadas pelo ImageLab®, e o observador as classificou como células positivas ou negativas. Por isso, a porcentagem de células marcadas foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$IP = \frac{\text{número de células marcadas}}{\text{total de células contadas}} \times 100 \quad [\%]$$

O ImageLab® foi utilizado para quantificar a intensidade da cor marrom que resultou da imunomarcação. Para cada caso, as mesmas fotomicrografias que foram usadas para determinar o IP foram consideradas. Doze regiões citoplasmáticas de diferentes células randomicamente marcadas foram acessadas com o same-sized square (ferramenta do sistema ImageLab®). A média de densidade óptica (DO) destas áreas foi automaticamente calculada e representa a média das composições das cores vermelha, verde e azul (VVA) por área de citoplasma analisada; a DO foi expressa em unidades ópticas por micrômetro quadrado (ou/µm²). O mesmo procedimento foi aplicado para obter a densidade óptica do fundo (DOF) de uma área sem tecido ou espaço vascular para cada fotomicrografia. Para isso, uma única área foi suficiente, porque o fundo é homogêneo em cada imagem. A cor branca absoluta, que corresponde à densidade óptica máxima (320.7 ou/µm²) é composta de uma mistura completa de vermelho, verde e azul, enquanto a cor preta representa a ausência dessas cores. Portanto, os valores de densidade óptica calculados pelo programa compreenderam uma escala decrescente, na qual os valores mais altos corresponderam às cores que foram claramente visíveis. A equação mostrada a seguir foi utilizada para calcular a intensidade digital de expressão (ItE) em cada caso. Seus valores compreenderam uma escala crescente que é subtraída da DOF proporcional à densidade óptica do branco absoluto.

$$ItE = 320.7 - \frac{320.7 \times \sum DO}{\sum DOF} \quad [ou/\mu m^2]$$

Índice de expressão (IE)

O índice de expressão digital (IE_{dig}) foi obtido pela multiplicação da porcentagem de células marcadas (PCM) pela intensidade de imunomarcação digital (IT_{dig}) para cada caso, de acordo com a seguinte equação:

$$IE = \frac{IP \times ItE}{100} \quad [ou/\mu m^2]$$

RESULTADOS

Em relação à idade houve aumento na expressão do TGF- β em pacientes com mais de 65 anos. As metaloproteinases 2 e 9 somente a 9 teve um aumento conforme a idade, mas sem variação estatística significativa. (Figuras 1-3) O grupo com estenose de canal lombar apresentou maior expressão de TGF β em comparação com o grupo de hérnia de disco. (Figuras 4-6) As metaloproteinases 2 e 9 tiveram maior expressão no grupo de hérnia de disco comparando com estenose do canal lombar, mas não houve variação estatística significativa.

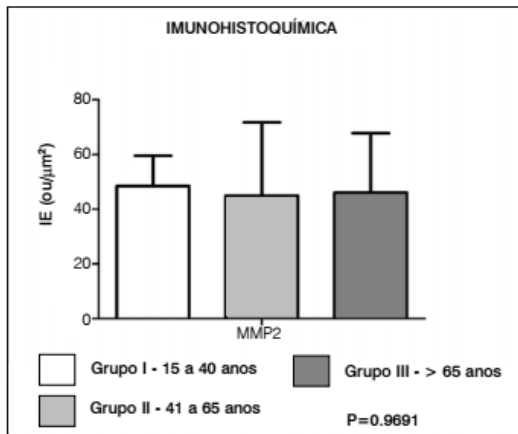


Figura 1. Avaliação da expressão da metaloproteinase 2 nos diferentes grupos de idade.

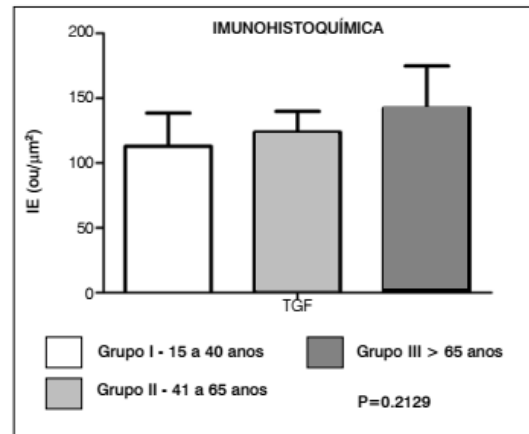


Figura 3. Avaliação da expressão do TGFβ nos diferentes grupos de idade.

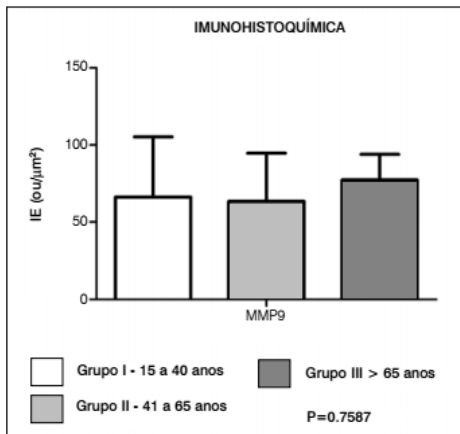


Figura 2. Avaliação da expressão da metaloproteinase 9 nos diferentes grupos de idade

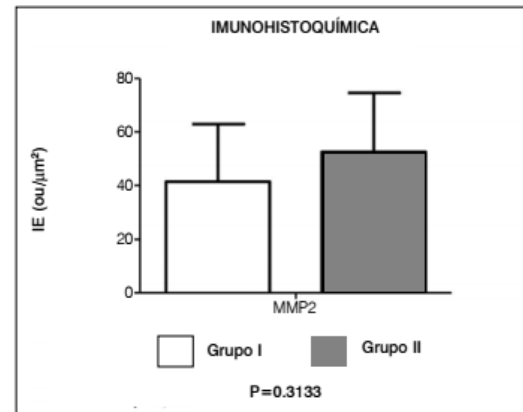


Figura 4. Avaliação da expressão da metaloproteinase 2 em relação à patologia grupo I estenose de canal grupo II hérnia de disco.

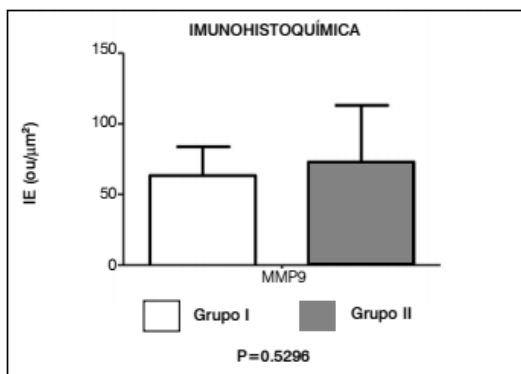


Figura 5. Avaliação da expressão da metaloproteinase 9 em relação à patologia grupo I estenose de canal grupo II hérnia de disco.

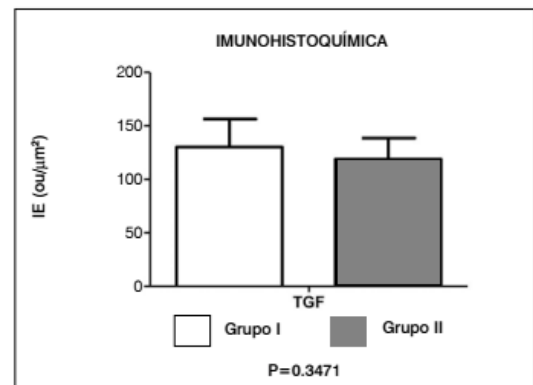


Figura 6. Avaliação da expressão do TGFβ em relação à patologia grupo I estenose de canal grupo II hérnia de disco.

DISCUSSÃO

Na claudicação neurogênica, devido à estenose osteoligamentar, há o processo degenerativo que ocorre em pacientes idosos. Estas alterações causam dor, significativa limitação funcional e alterações neurológicas.

A exata razão da hipertrofia do ligamento amarelo é pouco conhecida, embora o mecanismo de stress mecânico seja tido como o principal fator etiológico; a exata razão dessa progressiva hipertrofia é ainda desconhecida. Também não conhecemos se há algum outro fator que desencadeia essas alterações no ligamento amarelo além do stress mecânico, como, por exemplo, o processo inflamatório de tecidos circunjacentes, como exemplo o disco intervertebral. Lohr et al.¹⁰ demonstraram grande presença de infiltrado inflamatório na região periférica dos ligamentos amarelos hipertrofiados compostos principalmente por macrófagos, células endoteliais e linfócitos T correspondendo a reação imune crônica. Essas células apresentavam grande expressão de TGF- β conhecido como importante analisado, sendo que os resultados poderão contribuir para estura fator de deposição de colágeno extracelular. Isso demonstrou que essa inflamação pode ser importante fator de progressão da hipertrofia do ligamento amarelo pela substituição de fibras elásticas por fibras colágenas.

Nosso estudo demonstrou aumento da expressão do TGF- β em pacientes com estenose de canal lombar com hipertrofia do ligamento amarelo, mas também houve aumento da expressão do TGF- β em indivíduos com quadro de lombociatalgia por hérnia de disco lombar.

Nossa hipótese é que grandes alterações no disco intervertebral podem influenciar alterações no ligamento amarelo, mas para isso teremos que estudar diferentes alterações do disco intervertebral e a relação com o ligamento amarelo.

A pesquisa foi realizada com baixo número de amostras, não apresentando diferenças significativas na avaliação do material analisado, sendo que os resultados poderão contribuir para estudos mais avançados que permitam a elucidação de mecanismos moleculares para o desenvolvimento de moléculas

alvo para novas terapias ou outras formas de diagnóstico/prognóstico do processo de degeneração do ligamento amarelo.

As metaloproteinases são responsáveis pela degradação e modificação da matriz extracelular e inclui mais que 20 tipos. A metaloproteinase 2 e 3 apresenta grande associação com degradação da matriz da cartilagem articular e em disco intervertebral.¹¹ Soo e Kee-Young¹² demonstraram em seu estudo que na espondilolistese degenerativa o stress mecânico sofrido pelo ligamento amarelo influencia o aumento da expressão das metaloproteinases. Esse stress biomecânico ocorre devido ao escorregamento vertebral e a instabilidade tensional as estruturas ligamentares da coluna.¹²

Em nosso estudo houve um aumento da expressão das metaloproteinases em ambos os grupos sendo que os pacientes com hérnia de disco apresentam um maior aumento comparando com o grupo de estenose de canal lombar, adicionando o fator inflamatório na hipótese biomecânica de Soo e Kee-Young¹². Saiyro et al.⁸ como COX-2 e interleucina 1, 6, 8 e 15 em ligamentos com e sem aumento da espessura. Também em seu artigo demonstrou que a expressão do RNAm dessas citocinas inflamatórias ocorre antes da própria hipertrofia ligamentar. Demonstramos em nosso estudo que em pacientes sem hipertrofia do ligamento amarelo houve também um aumento da expressão das metaloproteinases e TGF- β .

CONCLUSÃO

Houve aumento do TGF- β em indivíduos mais velhos, embora sem significado estatístico. As metaloproteinases não apresentaram diferença importante entre os grupos tanto em relação com a idade como em relação ao tipo de alteração da coluna vertebral.

REFERÊNCIAS

1. Szpalski M, Gunzburg R. Lumbar spinal stenosis in the elderly: an overview. Eur Spine J. 2003;12(Suppl 2):S170-5.
2. Nachemson AL, Evans JH. Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament (ligamentum flavum). J Biomech. 1968;1(3):211-20.

3. Yahia LH, Garzon S, Strykowski H, Rivard CH. Ultrastructure of the human interspinous ligament and ligamentum flavum. A preliminary study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990;15(4):262-8.
4. Fukuyama S, Nakamura T, Ikeda T, Takagi K. The effect of mechanical stress on hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum. *J Spinal Disord*. 1995;8(2):126-30.
5. Ramani PS, Perry RH, Tomlinson BE. Role of ligamentum flavum in the symptomatology of prolapsed lumbar intervertebral discs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1975;38(6):550-7.
6. Postacchini F, Gumina S, Cinotti G, Perugia D, DeMartino C. Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis. Light and electron microscopic morphology. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(8):917-22.
7. Sairyo K, Biyani A, Goel V, Leaman D, Booth R Jr, Thomas J, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(23):2649-56.
8. Sairyo K, Biyani A, Goel VK, Leaman DW, Booth R Jr, Thomas J, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(11):E340-7.
9. Park JB, Lee JK, Park SJ, Riew KD. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(12):2750-7.
10. L  hr M, Hampl JA, Lee JY, Ernestus RI, Deckert M, Stenzel W. Hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum is associated with inflammation-related TGF-   expression. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011;153(1):134-41.
11. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
12. Oh IS, Ha KY. Matrix metalloproteinase-3 on ligamentum flavum in degenerativelumbar spondylolisthesis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(16):E552-7.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram alterações significativas de componentes da matriz extracelular na patologia degenerativa do disco intervertebral e do ligamento amarelo da coluna lombar. Tais resultados elucidam moléculas relacionadas com o processo de degeneração discal e do ligamento amarelo, as quais poderão servir como alvo para o desenvolvimento de alternativas para o diagnóstico, prognóstico e futuras condutas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. A; ROUGHLEY, P. J. What is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It? **Spine**, v. 31, n. 18, p. 2151-61, aug. 2006.

ALINI, M. et al. A biological approach to treating disc degeneration: not for today, but maybe for tomorrow. **European Spine Journal**, v. 11, n. suppl 2, p. 02; 11(Suppl 2):S215-S220, oct. 2002.

ANTONIOU, J. et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. **J Clin Invest.**, v. 98, n. 4, p. 996-1003, aug. 1996.

BOXBERGER, J. I. Reduced Nucleus Pulposus Glycosaminoglycan Content Alters Intervertebral Disc Dynamic Viscoelastic Mechanics. **J Biomech.**, v. 42, n. 12, p. 1941-1946, aug. 2009.

CATERSON, B. Fell-Muir Lecture: Chondroitin sulphate glycosaminoglycans: fun for some and confusion for others. **Int. J. Exp. Path.**, v. 93, p. 1-10, 2012.

CHEN, et al. Dose-dependent regulation of cell proliferation and collagen degradation by estradiol on ligamentum flavum. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 15, p. 238, jul. 2014.

FURUKAWA, T. et al. Absence of biglycan accelerates the degenerative process in mouse intervertebral disc. **Spine**, v. 34, n. 25, p. E911-E917, 2009.

HARDINGHAM, T. E.; ADAMS, P. A Method for the Determination of Hyaluronate in the Presence of Other Glycosaminoglycans and its Application to Human Intervertebral Disc. **Biochem. J.**, v. 159, p. 143-147, 1976.

JUNEJA, S. C.; VEILLETTE, C. Defects in tendon, ligament, and enthesis in response to genetic alterations in key proteoglycans and glycoproteins: a review. **Arthritis**, v. 2013, p. 154812, 2013.

KAMITA, M. et al. Proteomic analysis of ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. **Proteomics**, v. 15, p. 1622-1630, 2015.

KIM, Y. U. et al. Clinical symptoms of lumbar spinal stenosis associated with morphological parameters on magnetic resonance images. **Eur Spine J.**, v. 24, n. 10, p. 2236-43, oct. 2015.

KRESSE, H.; SCHÖNHERR, E. Proteoglycans of the extracellular matrix control. **J Cell Physiol.**, v. 189, n. 3, p. 266-74, dec. 2001.

MACLEAN, J. J. et al. Effects of immobilization and dynamic compression on intervertebral disc cell gene expression in vivo. **Spine**, v. 28, p. 973-81, 2003.

MOLINOS, M. et al. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration. **J. R. Soc. Interface**, v. 12, n. 108, 2015.

NACHEMSON, A. L.; EVANS, J. H. Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament. **J Biomech.**, v. 1, p. 211-220, 1968.

NAKAMURA, T. Angiopoietin-like protein 2 promotes inflammatory conditions in the ligamentum flavum in the pathogenesis of lumbar spinal canal stenosis by activating interleukin-6 expression. **Eur Spine J.**, v. 24, p. 2001-2009, 2015.

NOMIZU, M. et al. Structure-activity study of a laminin alpha 1 chain active peptide segment Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV). **FEBS Lett.**, v. 365, n. 2-3, p. 227-31, may. 1995.

OKUDA, T. et al. The pathology of ligamentum flavum in degenerative lumbar disease. **Spine**, v. 29, n. 15, p. 1689-97, aug. 2004.

PARK, J. B. et al. The Increased Expression of Matrix Metalloproteinases Associated with Elastin Degradation and Fibrosis of the Ligamentum Flavum in Patients with Lumbar Spinal Stenosis. **Clinics in Orthopedic Surgery**, v. 1, n. 2, p. 81-89, 2009.

PATTAPPA, G. et al. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function. **Journal of Anatomy**, v. 221, n. 6, p. 480-496, 2012.

PEARCE, R. H.; GRIMMER, B. J. The Chemical Constitution of the Proteoglycan of Human Intervertebral Disc. **Biochem J.**, v. 157, n. 3, p. 753-763, 1976.

ROUGHLEY, P. J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: Involvement of the extracellular matrix. **Spine**, v. 29, p. 2691-9, 2004.

. The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. **European Spine Journal**, v. 15, n. suppl 3, p. 326-332, 2006.

SAIRYO, K. et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue. **Spine**, v. 32, n. 11, p. E340-E347, 2007.

SCOTT, J. E. et al. The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus. **J Anat.**, v. 184, n. pt. 1, p. 73-82, 1994.

SHIGUEMATSU, F. Y. et al. Mielopatia torácica por calcificação do ligamento amarelo cursando com hiperproteinorraquia e resposta à corticoterapia: relato de caso. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 52, n. 3, 2012.

SIVAN, S. S. et al. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. **Eur Spine J.**, v. 23, n. suppl 3, p. S344-53, jun. 2014.

SMITH, L. J. et al. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. **Disease Models & Mechanisms**, v. 4, n. 1, p. 31-41, 2011.

VASILADIS, E. S. et al. Biologic Treatment of Mild and Moderate Intervertebral Disc Degeneration. **Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 400-409, 2014.

WEN-JING, Li. et al. Multilevel thoracic ossification of ligamentum flavum coexisted with/without lumbar spinal stenosis: staged surgical strategy and clinical outcomes. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 16, p. 206, aug. 2015.

WU, Y. et al. Study of Double-level Degeneration of Lower Lumbar Spines by Finite Element Model. **World Neurosurgery**, v. 86, p. 294-9, fev. 2016.

ANEXOS

Anexo 1 - Original article

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-785220162401152960>

ORIGINAL ARTICLE

STUDIES OF MOLECULAR CHANGES IN INTERVERTEBRAL DISC DEGENERATION IN ANIMAL MODEL

MARCELO FERRAZ DE CAMPOS¹, CINTIA PEREIRA DE OLIVEIRA², CHARLES BENJAMIN NEFF¹, OLGA MARIA DE TOLEDO CORREA³, MARIA APARECIDA SILVA PINHAL^{2,4}, LUCIANO MILLER REIS RODRIGUES¹¹. Faculdade de Medicina do ABC, Orthopedics Discipline, Santo André, SP, Brazil.². Faculdade de Medicina do ABC, Biochemistry Department, Santo André, SP, Brazil.³. Faculdade de Medicina do ABC, Cell Biology Department, Santo André, SP, Brazil.⁴. Universidade Federal de São Paulo, Biochemistry Department, São Paulo, SP, Brazil.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the structural and molecular changes in the extracellular matrix (ECM) during the process of intervertebral disc degeneration, using animal model. **Methods:** Wistar rats underwent intervertebral disc degeneration through 20-gauge needle puncture, and 360° rotation applied for 30 sec, representing the degenerated group, while control group was not submitted to this procedure. Histological parameters and expression of extracellular matrix molecules were evaluated in the 15th and 28th days after degenerative induction. **Results:** Fifteen days after the induction of intervertebral disc degeneration, significant changes were observed, such as reduction in the expression metalloproteinase-9 (MMP9) and interleukins (IL-6 and IL-10). There was a

significant increase in the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and caspase-3. However, different alterations in the ECM were observed at 28 days, the level of collagen I, metalloproteinase-2 (MMP2) and caspase-3 were enhanced. Furthermore, expression of heparanase isoforms (HPSE1 and HPSE2) mRNA were increased in the degenerative intervertebral disc. **Conclusion:** The different profiles of ECM molecules observed during the intervertebral disc degeneration suggest that molecular processes such as ECM remodeling, neovascularization, apoptosis and inflammation occur. **Experimental Study.**

Keywords: Intervertebral disc degeneration. Collagen. Metalloproteinases. Neovascularization, pathologic. Apoptosis.

Citation: Campos MF, Oliveira CP, Neff CB, Correa OMT, Pinhal MAS, Rodrigues LMR. Studies of molecular changes in intervertebral disc degeneration in animal model. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2016;24(1):16-21. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUCTION

The intervertebral disc degeneration (IDD) may play an important role in the chronic evolution of the back pain, but still needs greater elucidation of clinical and molecular mechanisms. Intervertebral disc degeneration results in the structural changes to the extracellular matrix.¹⁻³

Metalloproteinases (MMP) and heparanase (HPSE) are enzymes involved in degradation of the extracellular matrix molecules and play an important role in the process of intervertebral disc degeneration.⁴⁻⁶ It was describe that MMP2 mediates local degradation and of collagen in the intervertebral disc.⁷ Heparanase-1 is an endo-β-glucuronidase that degrades heparin sulfate chain from proteoglycans generating oligosaccharides that enhance the response of growth factors, angiogenic factors and cytokines. However, heparanase-2 (HPSE2) has no enzymatic activity, but present a 30% homology with HPSE1 and its biological role still unknown.^{5,6} The cytokines IL-6 and IL-10 respectively, an anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokine are also involved in disc degeneration processes.⁸⁻¹⁰

During disc degeneration neurovascular structures may be induced by the inflammatory and angiogenic factors such as the VEGF.¹¹ Moreover, apoptotic events occurring in the nucleus pulposus cells seem to be mediated by caspases.^{12,13}

In the present study, we evaluated the expression and distribution of structural and molecular constituents of the ECM such as collagen, metalloproteinases, glycosidases (heparanase-1 and heparanase-2), cytokines, VEGF and caspase-3 in the intervertebral disc during degenerative process to elucidate alterations that may be involved with the degenerative process and to better understand the pathophysiology of the disease, contributing towards future improvements in treatment approaches as an attempt to intervene or prevent disease progression.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics in Animal Experimentation Committee of the *Faculdade de Medicina do ABC*, process # 003/2011.

For the animal model of degeneration of the intervertebral

All the authors declare that there is no potential conflict of interest referring to this article.

Work developed at Faculdade de Medicina Do ABC, Santo André, SP, Brazil.

Correspondence: Maria Aparecida Silva Pinhal. Rua Três de Maio, 100, 4º andar, Biologia Molecular. Vila Clementino, SP, Brazil. 04044-020. maspinhal@yahoo.com.br

Article received in 06/08/2015, approved in 09/01/2015.

disc, 12 male Wistar rats were used (*Rattus norvegicus albinus*), from the Animal House of the Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brazil, at 12 weeks of age (complete skeletal maturity), weighing between 300 and 350g. The rats were separated into three groups. Two animals were not submitted to degeneration induction and were euthanized at 28 days, representing the control group. The second group of five animals was euthanized 15 days after induction of the intervertebral disc degeneration process, and the third group of five animals was euthanized 28 days after the degeneration induction. The animals remained under the care of the animal house of the Medical School after the induction of degeneration until the time of euthanasia.

Antisepsis was performed on the animal tail with a solution of alcohol iodate; then the animals were anesthetized with an association of ketamine (88 mg/kg) and xylazine 2% (12 mg/kg) by intraperitoneal route. The deep anesthetic plane was confirmed by the absence of corneal reflex and by the absence of reaction to deep pain provoked by the compression of the interdigits of the paws. The levels between the sixth and seventh, seventh and eighth, and eighth and ninth coccygeal vertebrae were identified by radiography. Induction of degeneration was performed by percutaneous puncture with a 20G needle. The needle was introduced until it reached the nucleus pulposus, turned 360°, and maintained in the same position for 30 seconds, as described in the literature.^{14,15}

The samples were collected after 15 and 28 days after the puncture. For the euthanasia, the animals were deep anesthetized and 5 mL of arterial blood were collected from the abdominal aorta, via trans-abdominal access, causing the euthanasia by hypovolemic shock. After the euthanasia, the samples were removed and stored in RNA Holder or stored in formaldehyde (10%), respectively, gene expression and protein expression studies.

Slices with 3 µm in thickness, embedded in paraffin and fixed in formalin, were deparaffinized and rehydrated. The recovery of the antigen was performed by warming of the slides at 100°C, for 30 minutes in 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0. Activity of the endogenous peroxidase was blocked with an aqueous solution of 3% hydrogen peroxide for 35 minutes. The samples were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: anti-MMP-2 (H-76), anti-MMP-9 (H-129), anti-interleukin-6 130326, and anti-interleukin-10 (H-160) (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-caspase-3 (3015-100) (BioVision, USA) anti-collagen I (C 2456) (Sigma, USA), and anti-VEGF-A (18077) (Biorbyt, England). Finally, the slides were incubated with a complex of streptavidin marked with peroxidase followed by manufacturer instructions (LSAB[®], Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). The sections were developed, using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) counterstained with hematoxylin. The presence of a brown color was considered evidence of positive expression of the respective molecules. Picrosirius Red stain was done the images were analyzed with normal light and polarized light for the study of collagen fibers.

The slides were analyzed with the help of a TS100 Nikon Eclipse[®] light microscope to identify the areas that best represented the immune marking of the molecules analyzed (hot spots). In each case, quantification of the immune labelling was quantified by a digital analysis as described below. The photomicrographs with 640x480 pixels were obtained from consecutive non-

-coincident fields with 400X magnification using a 4300 Nikon Coolpix[®] digital camera adjusted for the same parameters. The images obtained were analyzed by the system of processing and analysis of images of ImageLab[®] (Softium Informática[®], São Paulo, Brazil), adjusted for a micrometric scale (µm), as described by Matos et al.¹⁶

The digital quantification was expressed by the index of expression (IE). Index of expression was obtained by the multiplication of the percentage of stained cells (PI) by the intensity of digital immune staining (ItE) for each sample, as described in the following equation and

$$IE = \frac{PI \times ItE}{100} \text{ [ou/}\mu\text{m}^2\text{]}$$

mRNA expression by quantitative RT-PCR

Total RNA was obtained using the Trizol[®] reagent (Ambion by Life Technologies[™], CA, USA), following the instructions of the manufacturer. RNA quantification was determined on the NanoVue Plus device (GE Healthcare, Germany). The reverse transcription was performed using the reverse transcriptase enzyme ImPromII[™] (Promega Co., WI, USA), as per the manufacturer's instructions to obtain the complementary DNA (cDNA). The cDNA obtained in the reverse transcriptase reaction was used for the amplification of the isoforms of heparanase (HPSE1, HPSE2). The expression of mRNA was represented as relative value using constitutive endogenous genes, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH), thus determining the values of (-ΔCt). The expression of target-genes was analyzed using the primers for the isoforms of heparanase (HPSE1, HPSE2) and GAPDH sequences, described in the Table 1. The assays were performed in triplicate. All the primers were produced by Applied Biosystems, CA, USA. Amplification was performed using the reagent Maxima[®] SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems, CA, USA), following the manufacturer protocol. The reaction was submitted to a thermocycler for real-time amplification (7500 Real Time PCR Cycler[®]) (Applied Biosystems, CA, USA), with cycling of 95°C per 10 minutes, followed by 40 cycles (95°C, 15 seconds; 60°C, 60 seconds).

Statistic Analysis

The quantitative statistical analysis was performed using the GrandPad Prism 5.0 program (La Jolla, CA, USA); to verify the occurrence of significant differences between the quantitative variables, Kruskal-Wallis's non-parametric test with Dunn's supplementary test were used in comparisons of subgroups. For the parametric analysis, the Chi-squared test was used to evaluate the qualitative variables using the SPSS program version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). In all analyses, a 5% significance level was adopted (p≤0.05).

Table 1. Oligonucleotide sequences used as primers.

mRNA	Forward	Reverse
GAPDH	5'TCTAGAGACAGCCGCATCTTCTTG3'	5'GTCCGATACGGCCAAATCCGTTC3'
HPSE1	5'AGAAGTCGTGATGAGGCAGGTGT3'	5'TTGGGTGATAGACGTCGTGCAGT3'
HPSE2	5'TTCTAGTGGCCCTGAGCCTGTTGAA3'	5'TCCCAACTGACTGCCATTACTGC3'

RESULTS

Histologic and pathologic parameters evaluation are described in the Table 2. Concerning cellular alterations, it can be observed no apoptotic events in the control group, while all samples of the degenerative intervertebral discs presented apoptosis. Moreover, there was a significant difference between degenerative samples, since apoptotic events were more intense in the samples obtained from 28 days compared to the samples in the 15 days samples ($p=0.002$). Furthermore, no regenerative process was verified in the control group. However, mild and moderate regeneration was present in the samples obtained from animals submitted to disc degeneration process ($p=0.01$). Significant differences were also observed in the extracellular matrix of the intervertebral disc. Intense calcification and inflammatory infiltrate were present at 15 days after degenerative process, whilst such events represented moderate level in the samples obtained at 28 days, respectively, $p = 0.022$ and $p = 0.025$. Additionally, none of these events were detected in the control group. There were no significant differences in the analysis of fractures and fissures, myxoid and eosinophilic degeneration between the groups. (Table 2)

In the process of neovascularization of the disc, we observed the noteworthy presence of new vessels during the process of degeneration of the intervertebral disc and absent in the control group, despite these results are not statistically significant as shown in the Table 2.

In the control group we observed that the collagen fibers of the AF had a pattern of organization, with only longitudinal strands oriented along a single direction. The fibers were thickened and densely packed. (Figures 1A and B) At 15 days of degeneration of the intervertebral disc, we observed structural changes in the fibers, with the presence of longitudinal and transversal strands with no pattern of organization, and fibers were not as thick relative to the controls (Figures 1C and D). At 28 days of degeneration, we noted a high degree of strand disorganization, presence of fibrils represented with green coloring under polarized light, and an association of new collagen fibers represented in red. (Figures 1E and F)

Analysis of the expression of collagen I revealed a significant increase at 28 days relative to the degenerated group. (Figures 2 and 3A) The protein expression of metalloprotease MMP9 is decreased at 15 days of disc degeneration. On the other hand, a significant increase of MMP2 was noted after 28 days of intervertebral disc degeneration as demonstrated in Figure 2, Figures 3B and C. Figures 4 and 5 show, respectively, the immunohistochemistry reaction and digital quantification for evaluation of the inflammatory process of the intervertebral disc by the analysis of interleukins profile. An increase in expression of IL-6 was noted during the degenerative process along with a decrease of IL-10 restricted to 15 days of degenerative process.

In the analysis of the expression of VEGF, the vascular endothelial growth factor that may be involved in the neovascularization, we noted a significant increase 15 days after the disc degeneration relative to the controls. (Figure 6) Digital quantification confirmed the results obtained by immunohistochemistry. (Figure 7)

The values obtained by the index of expression (IE) of caspase-3, a protease directly involved with mechanisms of cellular

Table 2. Histologic features during intervertebral disc degeneration.

Histological features		Control (n=2)	Degeneration 15 days (n=5)	Degeneration 28 days (n=5)	p
Cellular alterations	Apoptosis				*0.002
	(0)	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	(+)	0 (0.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	
	(++)	0 (0.0)	2 (40.0)	5 (100.0)	
	(+++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	Regeneration				*0.010
	(0)	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	(+)	0 (0.0)	5 (100.0)	4 (80.0)	
	(++)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	
	(+++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Extracellular matrix alterations	Fracture/fissure				0.186
	(0)	2 (100.0)	3 (60.0)	5 (100.0)	
	(+)	0 (0.0)	2 (40.0)	0 (0.0)	
	(++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	(+++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	Calcification				*0.022
	(0)	2 (100.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	
	(+)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (40.0)	
	(++)	0 (0.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	
	(+++)	0 (0.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	
	Mixoid degeneration				0.065
	(0)	1 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	(+)	1 (50.0)	5 (100.0)	5 (100.0)	
	(++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
	(+++)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Extracellular matrix alterations	Eosinophilic degeneration				0.125
	(0)	2 (100.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	
	(+)	0 (0.0)	2 (40.0)	2 (40.0)	
	(++)	0 (0.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	
	(+++)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	
	Inflammatory infiltrate				*0.025
	(0)	2 (100.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	
	(+)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (80.0)	
	(++)	0 (0.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	
	(+++)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	
	Neovascularization				0.380
	(0)	2 (100.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	
	(+)	0 (0.0)	1 (20.0)	2 (40.0)	
	(++)	0 (0.0)	2 (40.0)	2 (40.0)	
	(+++)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	

Degree of alterations: 0, absent; (+), Low; (++) Mild; (+++) Intense; n, number of rats. Percentage (%). * Statistic Significance (Qui-Square test).

apoptosis, increased significantly during the degenerative process of the intervertebral disc at 28 days compared to the control group. (Figures 6 and 7)

The expression of the messenger RNA (mRNA) of the isoforms of heparanase was carried out by quantitative RT-PCR analysis, which demonstrated that the degenerated intervertebral discs presented a significant reduction in the expression of HPSE1 and HPSE2 after the induction of the degenerative process when compared to the control group, as is shown in Figure 8.

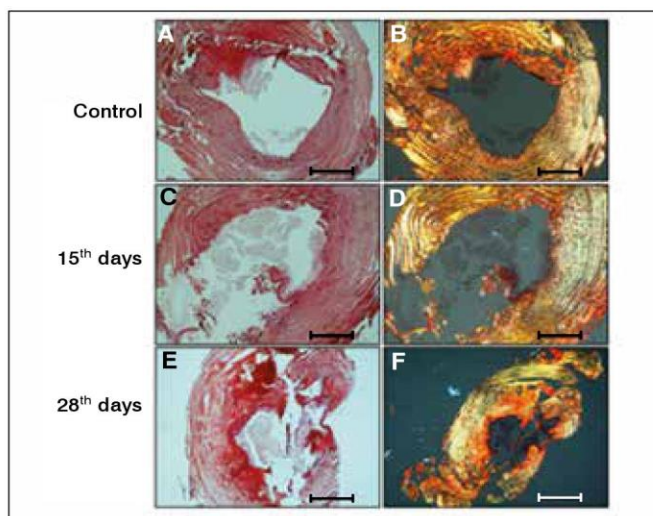


Figure 1. Analysis of collagen distribution. Picrosirius red staining was used to evaluate collagen fibers of the annulus fibrosus (AF), under normal and polarized light, during intervertebral disc degenerative process. A, C and E normal light evaluation; B, D and F polarized light; 28 days, AF obtained 28 days after degenerative induction; 25 days, AF obtained 25 days after degenerative induction. Fibers association (red); new fibrils formation (green).

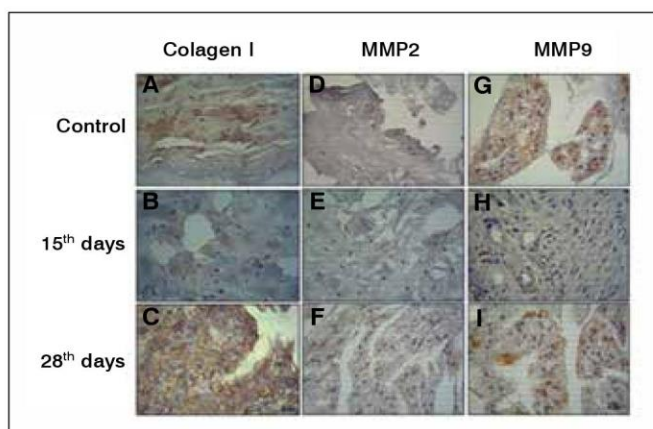


Figure 2. Collagen I, metalloprotease-2 (MMP2) and metalloprotease-9 (MMP9) Expression. Immunohistochemistry reaction in the intervertebral disc after degeneration (15 and 28 days), control (samples obtained from rats non submitted to the degenerative process). A, B and C, Collagen I; D, E and F, MMP2; G, H and I, MMP9).

DISCUSSION

In the histopathologic evaluation of the degenerative intervertebral samples of rats we noted evident cellular alterations such as apoptosis that increased gradually during the development of the degenerative process (14 and 28 days of induction of degeneration), mild regeneration, intense calcification and moderate presence of inflammatory infiltrate. The study done by Haschtmann and coworkers demonstrated that in the degenerative intervertebral disc of the rat model, the proportion of cells in apoptosis also increased significantly, corroborating our results.¹⁷

The degeneration of the intervertebral disc altered significantly

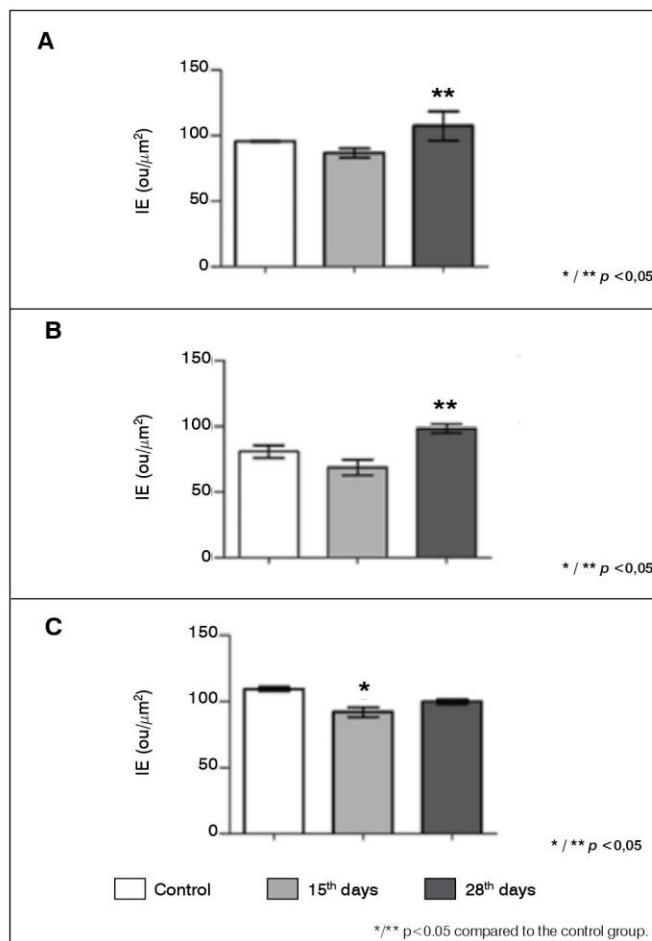


Figure 3. Digital quantification of collagen I, metalloprotease-2 (MMP2) and metalloprotease-9 (MMP9). (A) collagen I; (B) MMP2; (C) MMP9. The values represent the Index of Expression (IE) obtained as described in methods. The values represent media and standard deviation. The statistic analysis were performed using Kruskal-Wallis Test with Dunn's Multiple Comparison Test.

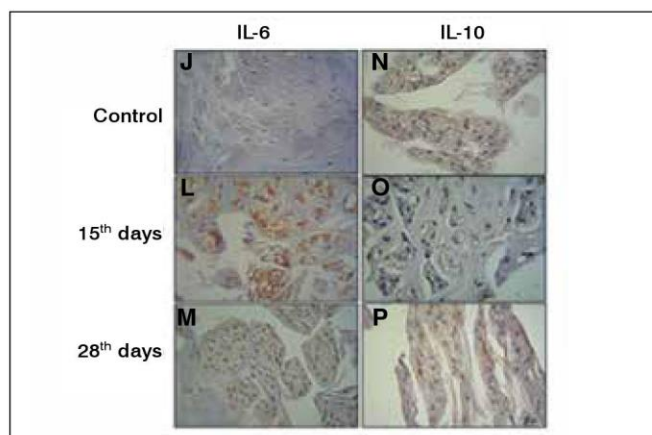


Figure 4. IL-6 and IL-10 Immunoeexpression Immunohistochemistry reaction in the intervertebral disc after degeneration (15 and 28 days), control (samples obtained from rats non submitted to the degenerative process). J, L and M, Interleukin-6 (IL-6); N, O and P, interleukin-10 (IL-10).

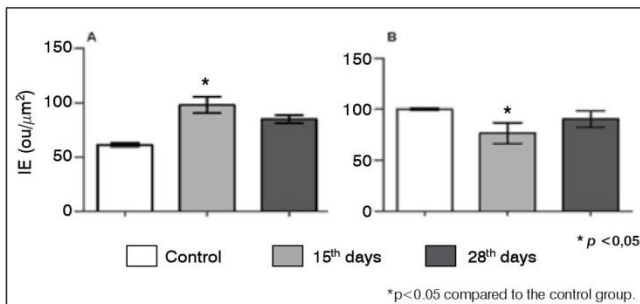


Figure 5. Digital quantification of IL-6 and IL-10. The values represent the Index of Expression (IE) obtained as described in Methods. The values represent media and standard deviation. (A) IL-6; (B) IL-10. The statistic analysis were performed using Kruskal-Wallis Test with Dunn's Multiple Comparison Test.

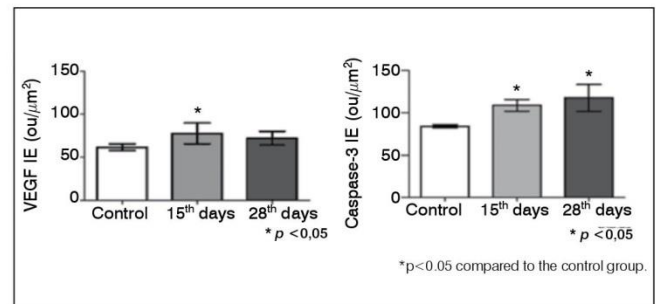


Figure 7. Digital quantification of VEGF e Caspase-3. The values represent the Index of Expression (IE) obtained as described in methods. The values represent media and standard deviation. The statistic analysis were performed using Kruskal-Wallis Test with Dunn's Multiple Comparison Test.

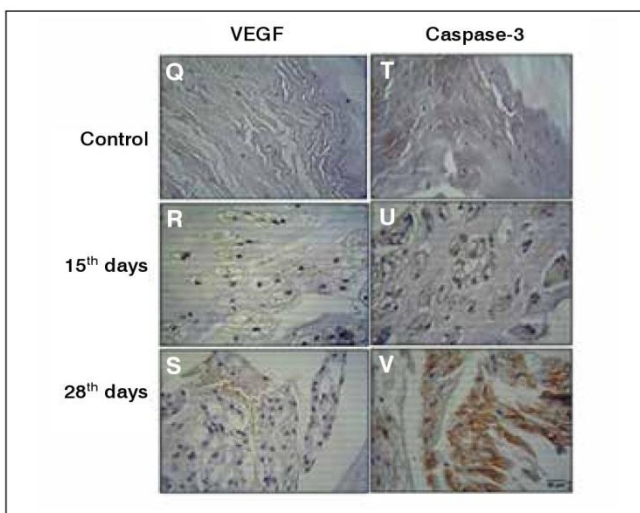


Figure 6. VEGF and caspase-3 immunoexpression. immunohistochemistry reaction in the intervertebral disc after degeneration (15 and 28 days), control (samples obtained from rats non submitted to the degenerative process). Q, R and S, VEGF; T, U and V caspase-3.

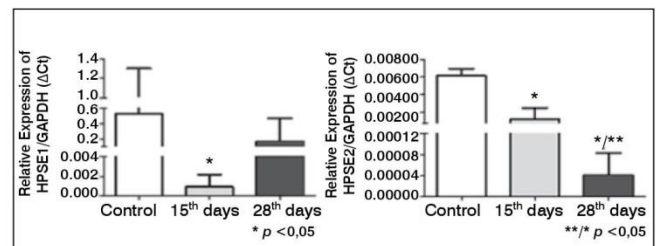


Figure 8. Heparanase-1 (HPSE1) and heparanase-2 (HPSE2) expression by quantitative RT-PCR. Quantitative RT-PCR analysis were performed as described in Methods, using cDNA samples obtained from intervertebral disc after degeneration induction (15 and 28 days), control (samples obtained from rats non submitted to the degenerative process).

the structural organization of the collagen, since degenerative samples presented disordered fibers that are not as thick as control samples representing new collagen fibers, beyond to increase type I collagen expression.

It is known that MMP2 has more expression in degenerative processes and that it participates directly in remodeling of the collagen by regulating the activity of the gelatinases.⁷ These data corroborates with our results, since MMP2 protein expression increased at 28 days in the degenerative discs together with the disorganization of collagen.

It is acknowledged that metalloproteases are involved with extracellular matrix remodeling.^{4,18} The results demonstrated higher level MMP2 and MMP9 in the degenerative intervertebral disc compared to the samples obtained by non-affected tissue, suggesting their role in extracellular matrix remodeling.

Inflammatory cytokines have a fundamental role in the phases of degeneration of the intervertebral disc. The start of the disease is characterized by an initial lesion where the cells regulate the expression of inflammatory cytokines such as TNF,

IL - 1 β , and IL-6, as well as degradation molecules of the extra-cellular matrix, resulting in tears, fissures causing mechanical instability to the disc. In the second phase of the disease, the cytokines are released activating the infiltration of leukocytes into the tissue and the inflammatory response is accompanied by neovascularization and the appearance of nervous fibers. The final phase is characterized by sensitization of the nervous endings mediated by the inflammatory process and neurotrophins resulting in pain.^{8,9}

In our study, we obtained a significant increase in the protein expression of IL-6 an anti-inflammatory cytokine, while there was a significant decrease of IL-10 that is a pro-inflammatory cytokine at the same time (15 days) of disc degeneration. The histologic evaluation of the tissues showed a moderate level of inflammatory process, which may suggest a balance between the action of such interleukins. Moreover, the abnormal production of pro-inflammatory molecules in the degenerative process of the disc can trigger a series of pathogenic responses in the cells of the intervertebral disc promoting autophagy, senescence, and cellular apoptosis.¹⁹ Therefore, the increased level of IL-10 can be modulating apoptosis events in the degenerative discs.

VEGF expression are enhanced at 15 days after the intervertebral disc degeneration and neovascularization was also present in the degenerative samples and absent in the control samples (non affected by disc degeneration). Furthermore, taken together these results are consistent with those of literature.⁸

VEGF is involved in processes of abnormal neovascularization, growth of vessels in symptomatic discs. There data corroborate literature, in which one study with human cells showed that a lesion in AF has the potential to initiate an inflammatory process and the neovascularization of the tissue involving a VEGF and inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and TGF- β .²⁰

Caspase-3 represents a marker of apoptosis induction and its expression increases gradually during the degenerative process of intervertebral disc¹² which is consistent with the high levels of caspase-3 during the entire degenerative process in rats, obtained in our results.

High level of HPSE1 obtained in the samples submitted to intervertebral disc degeneration indicates that this enzyme is possibly involved with the processes of tissue remodeling during degenerative process. Our data confirm that the isoform HPSE2 are also possibly involved in the development of intervertebral disc degeneration, due to increased expression compared to the non-degenerative discs.

CONCLUSION

The alteration of metalloproteases, collagen, glycosidases, VEGF, caspase-3, and interleukins observed in the present study, suggest an intense remodeling process of the extracellular matrix of the degenerative intervertebral discs.

Better understanding of the molecular mechanisms involved in the intervertebral disc degeneration is important to elucidate the pathophysiology of the degenerative disc disease that affects the population worldwide and directly impacts the quality of life of the individuals.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the financial support given by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS: Each author contributed individual and significantly to the development of this article. MFC (0000-0002-6939-8390*): writing and reviewing the article, performing the surgeries; CPO (0000-0002-3904-2836*): surgeries, data analysis and writing the article; CBN (0000-0003-3910-714x*): statistical analysis, surgeries and reviewing the article; OMTc (0000-0002-1563-6621*): analysis of the slides and reviewing the article; MASP (0000-0003-4001-1663*): writing and reviewing the article and also the intellectual design of the article; LMRR (0000-0001-6891-5935*): surgery, writing the article, statistical analysis, intellectual design of the article and the overall research project. *ORCID Identifier (Open Researcher and Contributor ID).

REFERENCES

- Sivan SS, Hayes AJ, Wachtel EA, Caterson B, Merkher Y, Maroudas A, et al. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur Spine J*. 2014; 23(Suppl 3):S344-53.
- de Oliveira CP, Rodrigues LM, Fregni MV, Gotfryd A, Made AM, Pinhal MA. Extracellular matrix remodeling in experimental intervertebral disc degeneration. *Acta Ortop Bras*. 2013;21(3):144-9.
- Chan WC, Sze KL, Samartzis D, Leung VY, Chan D. Structure and biology of the intervertebral disk in health and disease. *Orthop Clin North Am*. 2011;42(4):447-64.
- Wang WJ, Yu XH, Wang C, Yang W, He WS, Zhang SJ, et al. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin Chim Acta*. 2015;448:238-46.
- Rodrigues LM, Oliveira LZ, Pinhal MA. Expression of heparanase isoforms in intervertebral discs classified according to Pfirrmann grading system for disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38(13):1112-8.
- Rodrigues LM, Theodoro TR, Matos LL, Mader AM, Milani C, Pinhal MA. Heparanase isoform expression and extracellular matrix remodeling in intervertebral disc degenerative disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(5):903-9.
- Rastogi A, Kim H, Twomey JD, Hsieh AH. MMP-2 mediates local degradation and remodeling of collagen by annulus fibrosus cells of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(2):R57.
- Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(1):44-56.
- Holm S, Mackiewicz Z, Holm AK, Kontinen YT, Kouri VP, Indahl A, et al. Pro-inflammatory, pleiotropic, and anti-inflammatory TNF-alpha, IL-6, and IL-10 in experimental porcine intervertebral disc degeneration. *Vet Pathol*. 2009;46(6):1292-300.
- Sainoh T, Orita S, Miyagi M, Sakuma Y, Yamauchi K, Suzuki M, et al. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor expression, localization, and involvement in pain-sensing neuron activation in a mouse intervertebral disc injury model. *J Orthop Res*. 2015;33(10):1508-14.
- Liu XW, Kang J, Fan XD, Sun LF. Expression and significance of VEGF and p53 in rat degenerated intervertebral disc tissues. *Asian Pac J Trop Med*. 2013; 6(5):404-6.
- Yang SD, Bai ZL, Zhang F, Ma L, Yang DL, Ding WY. Levofloxacin increases the effect of serum deprivation on anoikis of rat nucleus pulposus cells via Bax/Bcl-2/caspase-3 pathway. *Toxicol Mech Methods*. 2014;24(9):688-96.
- Shi L, Teng H, Zhu M, Li C, Huang K, Chen BI, et al. Paeoniflorin inhibits nucleus pulposus cell apoptosis by regulating the expression of Bcl-2 family proteins and caspase-9 in a rabbit model of intervertebral disc degeneration. *Exp Ther Med*. 2015;10(1):257-62.
- Zhang H, La Marca F, Hollister SJ, Goldstein SA, Lin CY. Developing consistently reproducible intervertebral disc degeneration at rat caudal spine by using needle puncture. *J Neurosurg Spine*. 2009;10(6):522-30.
- Masuda K, Aota Y, Muehleman C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):5-14.
- Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(5):417-24.
- Haschtmann D, Ferguson SJ, Stoyanov JV. Apoptosis and gene expression of collagenases but not gelatinases in rabbit disc fragment cultures. *J Neurosurg Spine*. 2008;8(6):552-60.
- Crean JK, Roberts S, Jaffray DC, Eisenstein SM, Duance VC. Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22(24):2877-84.
- Shen C, Yan J, Jiang LS, Dai LY. Autophagy in rat annulus fibrosus cells: evidence and possible implications. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):R132.
- Moon HJ, Kim JH, Lee HS, Chotai S, Kang JD, Suh JK, et al. Annulus fibrosus cells interact with neuron-like cells to modulate production of growth factors and cytokines in symptomatic disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(1):2-9.

Anexo 2 – Original article

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE/ARTÍCULO ORIGINAL

EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 DA MATRIZ E DO TGF-B NA HIPERTROFIA DO LIGAMENTO AMARELO

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 AND TGF-B IN LIGAMENTUM FLAVUM HYPERTROPHY

EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS 2 Y 9 DE LA MATRIZ Y DEL TGF-B EN LA HIPERTROFIA DEL LIGAMENTO AMARILLO

MARCELO FERRAZ DE CAMPOS¹, CINTIA PEREIRA DE OLIVEIRA¹, MARIA APARECIDA DA SILVA PINHAL¹, LUCIANO MILLER REIS RODRIGUES¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a expressão das metaloproteinasas e do TGFb em pacientes com estenose do canal vertebral e em pacientes mais jovens que apresentam hérnia de disco. **Métodos:** Foram analisadas 19 amostras de LA, sendo nove de pacientes com estenose de canal lombar e 10 de pacientes com hérnia discal. Do total, cinco pacientes tinham de 15 a 40 anos, 10 tinham de 40 a 65 anos e quatro tinham mais de 65 anos. As áreas representativas do LA foram escolhidas com base na coloração dos tecidos por hematoxilina-eosina. Os cortes de 3 µm de espessura incluídos em parafina e fixados em formalina foram desparafinizados e reidratados. Todos os ligamentos foram incubados *overnight* a 4°C com os anticorpos primários. **Resultados:** Constatou-se aumento do TGFb em indivíduos mais velhos, embora sem significância estatística. **Conclusão:** As metaloproteinasas não apresentaram diferença importante entre os grupos tanto com relação à idade quanto ao tipo de alteração da coluna vertebral.

Descritores: Ligamento amarelo; Metaloproteinasas; Estenose espinal.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the expression of matrix metalloproteinases and TGFb in patients with spinal stenosis and in younger patients who have herniated disc. **Methods:** 19 samples of LA were analyzed, nine of them with lumbar canal stenosis and 10 with disc herniation. Of the total, five patients were aged between 15 and 40 years, 10 were between 40 and 65 years and four had more than 65 years. Representative areas of LF were chosen based on the staining of tissues with hematoxylin-eosin. The 3µm-thick sections embedded in paraffin and fixed in formalin were deparaffinized and rehydrated. All ligaments were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. **Results:** An increase of TGFb was verified in older individuals, although without statistical significance. **Conclusion:** Metalloproteinases showed no significant difference between both groups with respect to age and type of abnormality of the spine.

Keywords: Ligamentum flavum; Metalloproteinases; Spinal stenosis.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la expresión de metaloproteinasas de la matriz y del TGFb en pacientes con estenosis espinal y en pacientes más jóvenes que tienen una hernia de disco. **Métodos:** Diecinueve muestras de LA fueron enviadas, de nueve pacientes con estenosis del canal lumbar y diez pacientes con hernia de disco. Del total de pacientes, cinco tenían de 15 a 40 años, 10 tenían de 40 a 65 años y cuatro tenían más de 65 años. Áreas representativas de LA se eligieron sobre la base de la tinción de los tejidos con hematoxilina-eosina. Las secciones de 3 µm de espesor, incluidas en parafina y fijadas en formalina fueron desparafinadas y rehidratadas. Todos los ligamentos se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios. **Resultados:** Se encontró un aumento de TGFb en personas mayores, aunque sin significación estadística. **Conclusión:** Las metaloproteinasas no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a la edad y el tipo de anomalía de la columna vertebral.

Descriptores: Ligamento amarillo; Metaloproteinasas; Estenosis espinal.

INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento da população tem aumentado a incidência de doenças da coluna vertebral, sendo o estreitamento do canal vertebral as principais causas de dor e de limitação funcional em pacientes idosos. A causa desse estreitamento pode ser devido à artrose facetária, abaulamento discal e principalmente a hipertrofia do ligamento amarelo (HLA).¹ Os fatores relacionados com a hipertrofia desse ligamento têm sido parcialmente elucidados, e nenhuma profilaxia efetiva ou opção terapêutica a não ser a cirurgia de descompressão estão bem estabelecidas.

Histologicamente o ligamento amarelo é composto por 70% de fibras elásticas e 30% de fibras colágenas que se dispõem em paralelo em várias camadas.^{2,3} Durante a hipertrofia do ligamento

há diminuição do conteúdo de fibras elásticas e aumento das fibras colágenas, calcificação, ossificação e condrometaplasia.⁴⁻⁶

Sairoy *et al.*^{7,8} demonstraram correlação entre o endurecimento do ligamento amarelo e o grau de fibrose, que teriam como resultado processos inflamatórios repetitivos devido ao estresse mecânico que o ligamento sofre durante os movimentos da coluna vertebral. Park e colaboradores demonstraram que o aumento da expressão do TGFb (fator de transformação do crescimento beta), proteína que controla a proliferação celular e atua nos estágios iniciais da oncogênese, está relacionado com a hipertrofia do ligamento amarelo.⁹

Na tentativa de desenvolver opções terapêuticas futuras será necessário entender se a hipertrofia tem origem no estresse

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

Trabalho realizado na Disciplina de Ortopedia e Bioquímica da Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.
Correspondência: Rua Atlântica, 400. São Bernardo do Campo, SP, Brasil. 09750-480. ferrazcampos@uol.com.br

Recebido em 11/04/2014, aceito em 09/06/2014.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1808-18512014130300451>

biomecânico provocado pela movimentação da coluna, ou se esse processo se inicia devido às alterações inflamatórias no disco e em tecidos adjacentes que acabam predispondo a inflamação do ligamento amarelo e sua hipertrofia. Com essa teoria pacientes com história de doença do disco intervertebral teriam maior predisposição de desenvolver alterações no ligamento amarelo no futuro.

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a expressão das metaloproteínas e do TGF β nos ligamentos amarelos em pacientes com estenose do canal vertebral e em pacientes mais jovens que apresentam outras doenças da coluna como hérnia de disco.

MÉTODO

Foram estudados 19 amostras de ligamento amarelo (região profunda) de indivíduos com estenose de canal lombar e hérnia de disco coletados pelo cirurgião, no período de maio de 2013 a janeiro de 2014, sendo utilizado imagens de ressonância nuclear magnética do segmento da coluna lombar como complementação no diagnóstico. Esses ligamentos foram obtidos durante a cirurgia para tratamento tanto de hérnia de disco quanto de estenose do canal lombar. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, Brasil.

Os indivíduos foram divididos em três grupos conforme a idade: menor que 40 anos, entre 40 e 65 anos e maior que 65 anos. Em relação à faixa etária: grupo I de 15 a 40 anos foram cinco amostras (idade média: 29,2), grupo II de 40 até 65 anos foram dez amostras (idade média: 48,4) e grupo III acima de 65 anos foram quatro amostras (idade média: 74). Quanto à patologia: grupo I estenose do canal lombar foram nove pacientes e grupo II hérnia de disco foram dez pacientes.

Os critérios de inclusão foram:

Na hérnia de disco: fragmentos extrusos localizados na região centro-lateral do canal vertebral, mais de três meses de sintomatologia, sem cirurgia prévia no segmento lombar e localização da hérnia de disco no segmento L4-L5 ou L5-S1.

Na estenose de canal lombar: queixa principal de claudicação neurogênica, fator principal de compressão do canal lombar a hipertrofia do ligamento amarelo, localização da estenose no segmento L4-L5 ou L5-S1.

Imunohistoquímica

Áreas representativas do ligamento amarelo foram escolhidas com base na coloração dos cortes de tecido por hematoxilina-eosina (HE). Cortes com 3 μ m de espessura, embebidos em parafina e fixados em formalina, foram desparafinizados e reidratados.

A recuperação do antígeno foi realizada pelo aquecimento das lâminas a 100 °C por 30 minutos em um tampão citrato 10 mmol/L, pH 6,0. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% por 35 minutos.

Os cortes foram, então, incubados *overnight* a 4°C com os anticorpos primários: anti-decorin (N-15), anti-biglicam (L-15), TGF β 1 (sc-146), anti-MMP-9 (H-129), e anti-MMP-2 (H-76) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Finalmente, as lâminas foram incubadas com um complexo de estreptavidina marcado com peroxidase (LSAB[®], DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos. Os cortes foram revelados, utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por 1 minuto e foram contra corados com hematoxilina. Algumas amostras foram incubadas com tampão fosfato 1 M na ausência do anticorpo primário, como controles negativos. A presença de coloração marrom foi considerada evidência de expressão positiva das respectivas moléculas na célula.

Quantificação digital

As lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de luz TS100 Nikon Eclipse[®] para identificar as áreas que melhor representaram a imunomarcagem das moléculas analisadas (hot spots). Em cada caso, a quantificação da imunomarcagem foi realizada por um método de análise digital por computador. As fotomi-

crografias de 640x480 pixels foram obtidas de campos consecutivos não coincidentes em aumento de 400X com câmera digital 4300 Nikon Coolpix[®] ajustada para os mesmos parâmetros. As imagens obtidas foram analisadas pelo sistema de processamento e análise de imagens ImageLab[®] (Softium Informática[®], São Paulo, Brasil), ajustado para a escala micrométrica (μ m).

Índice de positividade (IP)

Em cada caso, pelo menos 1.000 células foram contadas pelo ImageLab[®], e o observador as classificou como células positivas ou negativas. Por isso, a porcentagem de células marcadas foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$IP = \frac{\text{número de células marcadas}}{\text{total de células contadas}} \times 100 \text{ [\%]}$$

total de células contadas

Intensidade de expressão (ItE)

O ImageLab[®] foi utilizado para quantificar a intensidade da cor marrom que resultou da imunomarcagem. Para cada caso, as mesmas fotomicrografias que foram usadas para determinar o IP foram consideradas. Doze regiões citoplasmáticas de diferentes células randomicamente marcadas foram acessadas com o *same-sized square* (ferramenta do sistema ImageLab[®]). A média de densidade óptica (DO) destas áreas foi automaticamente calculada e representa a média das composições das cores vermelha, verde e azul (VVA) por área de citoplasma analisada; a DO foi expressa em unidades ópticas por micrômetro quadrado ($\text{ou}/\mu\text{m}^2$). O mesmo procedimento foi aplicado para obter a densidade óptica do fundo (DOF) de uma área sem tecido ou espaço vascular para cada fotomicrografia. Para isso, uma única área foi suficiente, porque o fundo é homogêneo em cada imagem. A cor branca absoluta, que corresponde à densidade óptica máxima ($320.7 \text{ ou}/\mu\text{m}^2$) é composta de uma mistura completa de vermelho, verde e azul, enquanto a cor preta representa a ausência dessas cores. Portanto, os valores de densidade óptica calculados pelo programa compreenderam uma escala decrescente, na qual os valores mais altos corresponderam às cores que foram claramente visíveis. A equação mostrada a seguir foi utilizada para calcular a intensidade digital de expressão (ItE) em cada caso. Seus valores compreenderam uma escala crescente que é subtraída da DOF proporcional à densidade óptica do branco absoluto.

$$ItE = 320.7 - \frac{320.7 \times \sum DO}{\sum DOF} \text{ [ou}/\mu\text{m}^2]$$

Índice de expressão (IE)

O índice de expressão digital (IE_{dig}) foi obtido pela multiplicação da porcentagem de células marcadas (PCM) pela intensidade de imunomarcagem digital (IT_{dig}) para cada caso, de acordo com a seguinte equação:

$$IE = \frac{IP \times ItE}{100} \text{ [ou}/\mu\text{m}^2]$$

RESULTADOS

Em relação à idade houve aumento na expressão do TGF- β em pacientes com mais de 65 anos. As metaloproteínas 2 e 9 somente a 9 teve um aumento conforme a idade, mas sem variação estatística significativa. (Figuras 1-3)

O grupo com estenose de canal lombar apresentou maior expressão de TGF β em comparação com o grupo de hérnia de disco. (Figuras 4-6) As metaloproteínas 2 e 9 tiveram maior expressão no grupo de hérnia de disco comparando com estenose do canal lombar, mas não houve variação estatística significativa.

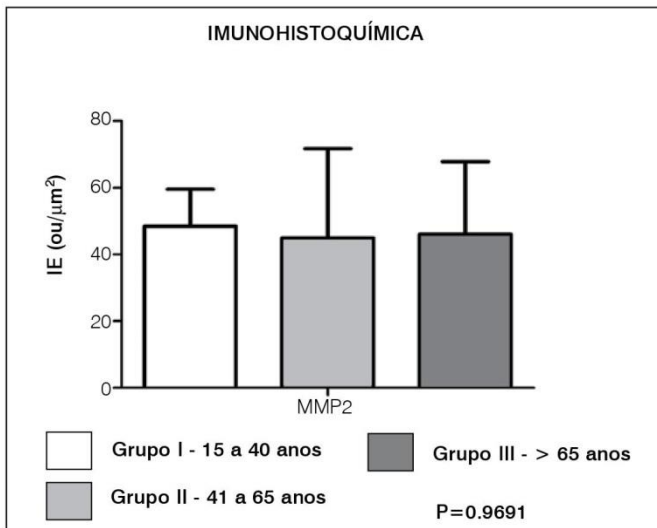


Figura 1. Avaliação da expressão da metaloproteinase 2 nos diferentes grupos de idade.

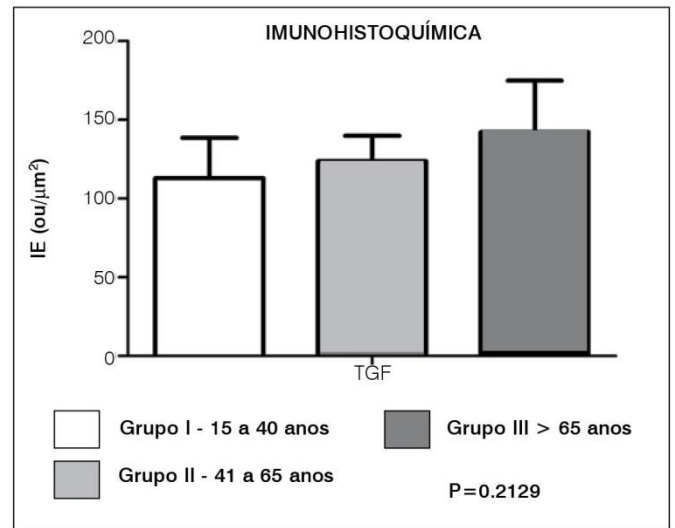


Figura 3. Avaliação da expressão do TGFβ nos diferentes grupos de idade.

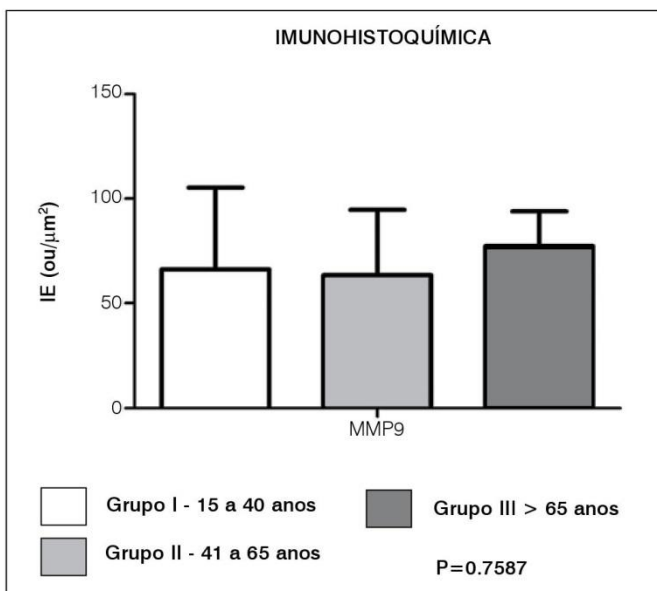


Figura 2. Avaliação da expressão da metaloproteinase 9 nos diferentes grupos de idade.

DISCUSSÃO

Na claudicação neurogênica, devido à estenose osteoligamentar, há o processo degenerativo que ocorre em pacientes idosos. Estas alterações causam dor, significativa limitação funcional e alterações neurológicas. A exata razão da hipertrofia do ligamento amarelo é pouco conhecida, embora o mecanismo de stress mecânico seja tido como o principal fator etiológico; a exata razão dessa progressiva hipertrofia é ainda desconhecida. Também não conhecemos se há algum outro fator que desencadeia essas alterações no ligamento amarelo além do stress mecânico, como, por exemplo, o processo inflamatório de tecidos circunjacentes, como exemplo o disco intervertebral.

Lohr *et al.*¹⁰ demonstraram grande presença de infiltrado inflamatório na região periférica dos ligamentos amarelos hipertrofiados compostos principalmente por macrófagos, células endoteliais e linfócitos T correspondendo a reação imune crônica. Essas células apresentavam grande expressão de TGFβ conhecido como importante

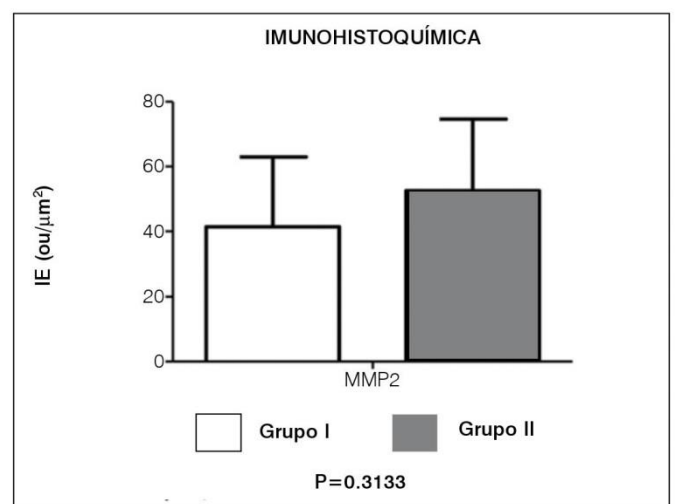


Figura 4. Avaliação da expressão da metaloproteinase 2 em relação à patologia grupo I estenose de canal grupo II hérnia de disco.

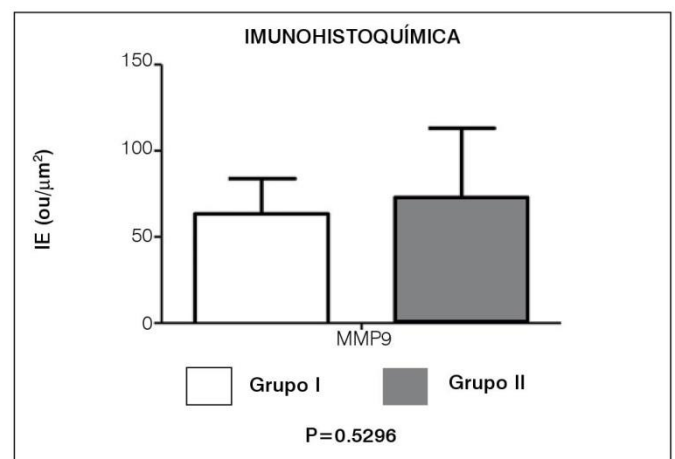


Figura 5. Avaliação da expressão da metaloproteinase 9 em relação à patologia grupo I estenose de canal grupo II hérnia de disco.

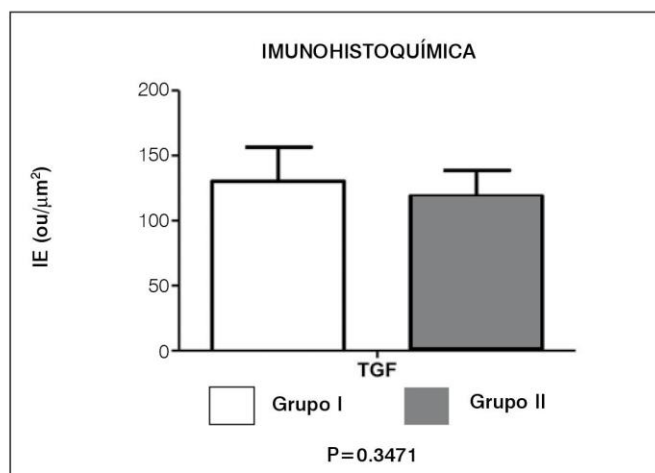


Figura 6. Avaliação da expressão do TGFβ em relação à patologia grupo I estenose de canal grupo II hérnia de disco.

fator de deposição de colágeno extracelular. Isso demonstrou que essa inflamação pode ser importante fator de progressão da hipertrofia do ligamento amarelo pela substituição de fibras elásticas por fibras colágenas. Nosso estudo demonstrou aumento da expressão do TGFβ em pacientes com estenose de canal lombar com hipertrofia do ligamento amarelo, mas também houve aumento da expressão do TGFβ em indivíduos com quadro de lombociatalgia por hérnia de disco lombar. Nossa hipótese é que grandes alterações no disco intervertebral podem influenciar alterações no ligamento amarelo, mas para isso teremos que estudar diferentes alterações do disco intervertebral e a relação com o ligamento amarelo.

A pesquisa foi realizada com baixo número de amostras, não apresentando diferenças significativas na avaliação do material analisado, sendo que os resultados poderão contribuir para estu-

dos mais avançados que permitam a elucidação de mecanismos moleculares para o desenvolvimento de moléculas alvo para novas terapias ou outras formas de diagnóstico/prognóstico do processo de degeneração do ligamento amarelo.

As metaloproteínases são responsáveis pela degradação e modificação da matriz extracelular e inclui mais que 20 tipos. A metaloproteinase 2 e 3 apresenta grande associação com degradação da matriz da cartilagem articular e em disco intervertebral.¹¹ Soo e Kee-Young¹² demonstraram em seu estudo que na espondilolistese degenerativa o stress mecânico sofrido pelo ligamento amarelo influencia o aumento da expressão das metaloproteínases. Esse stress biomecânico ocorre devido ao escorregamento vertebral e a instabilidade tensional as estruturas ligamentares da coluna.¹² Em nosso estudo houve um aumento da expressão das metaloproteínases em ambos os grupos sendo que os pacientes com hérnia de disco apresentam um maior aumento comparando com o grupo de estenose de canal lombar, adicionando o fator inflamatório na hipótese biomecânica de Soo e Kee-Young¹².

Sairoy *et al.*⁸ detectaram a presença de citocinas inflamatórias, como COX-2 e interleucina 1, 6, 8 e 15 em ligamentos com e sem aumento da espessura. Também em seu artigo demonstrou que a expressão do RNAm dessas citocinas inflamatórias ocorre antes da própria hipertrofia ligamentar. Demonstramos em nosso estudo que em pacientes sem hipertrofia do ligamento amarelo houve também um aumento da expressão das metaloproteínases e TGFβ.

CONCLUSÃO

Houve aumento do TGFβ em indivíduos mais velhos, embora sem significado estatístico. As metaloproteínases não apresentaram diferença importante entre os grupos tanto em relação com a idade como em relação ao tipo de alteração da coluna vertebral.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Szpalski M, Gunzburg R. Lumbar spinal stenosis in the elderly: an overview. *Eur Spine J*. 2003;12(Suppl 2):S170-5.
2. Nachemson AL, Evans JH. Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament (ligamentum flavum). *J Biomech*. 1968;1(3):211-20.
3. Yahia LH, Garzon S, Strykowski H, Rivard CH. Ultrastructure of the human interspinous ligament and ligamentum flavum. A preliminary study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990;15(4):262-8.
4. Fukuyama S, Nakamura T, Ikeda T, Takagi K. The effect of mechanical stress on hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum. *J Spinal Disord*. 1995;8(2):126-30.
5. Ramani PS, Perry RH, Tomlinson BE. Role of ligamentum flavum in the symptomatology of prolapsed lumbar intervertebral discs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1975;38(6):550-7.
6. Postacchini F, Gumina S, Cinotti G, Perugia D, DeMartino C. Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis. Light and electron microscopic morphology. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(8):917-22.
7. Sairoy K, Biyani A, Goel V, Leaman D, Booth R Jr, Thomas J, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(23):2649-56.
8. Sairoy K, Biyani A, Goel VK, Leaman DW, Booth R Jr, Thomas J, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(11):E340-7.
9. Park JB, Lee JK, Park SJ, Riew KD. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(12):2750-7.
10. Löhr M, Hampf JA, Lee JY, Ernestus RI, Deckert M, Stenzel W. Hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum is associated with inflammation-related TGF-β expression. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011;153(1):134-41.
11. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
12. Oh IS, Ha KY. Matrix metalloproteinase-3 on ligamentum flavum in degenerative lumbar spondylolisthesis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(16):E552-7.

Anexo 3 – Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: Ligamento Amarelo.

O **motivo** que nos leva a estudar o ligamento amarelo é para podermos avaliá-lo anatomopatológica e bioquimicamente, ou seja, sua composição e perda da sua função devido à sua inflamação.

A pesquisa se justifica pois tratá importante resultado quanto ao tratamento das doenças da coluna. O objetivo desse projeto é, através da análise do ligamento amarelo (tecido que cobre o espaço entre os ossos da coluna) , saber a influência do mesmo na causa da doença da coluna.

O procedimento de coleta de material será da seguinte forma: Será retirada uma parte do ligamento amarelo no ato cirúrgico para a descompressão do canal vertebral e radicular, ou seja, descompressão dos nervos. **Essa retirada já faz parte da cirurgia de descompressão dos nervos, portanto, não haverá nenhuma alteração no procedimento cirúrgico padrão.**

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: Não haverá nenhum desconforto, risco ou benefício extra ou diferente de uma cirurgia padrão de descompressão dos nervos, tanto pelo disco quanto pela compressão de demais estruturas, como osso e articulação (bico de papagaio). O risco na sua participação deste projeto de pesquisa é de quebra da confidencialidade, e por isso me comprometo em manter o anonimato de todos os participantes, tomando cuidados como não identificação do seu nome, endereço, parentescos, e qualquer outro tipo de informação que comprometa a confidencialidade, ou seja, sua identificação.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Caso você apresente algum problema em seus exames, você será encaminhado para tratamento adequado ao tipo de doença da seguinte maneira:

Será acompanhado em segmento ambulatorial no consultório do Dr Marcelo Ferraz de Campos, localizado na Rua Atlântica, 400, Jardim do Mar, São Bernardo do Campo.

Telefones: 4330-4487 (clínica) ou 98497-0009 (celular) e email: ferrazcampos@uol.com.br

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos seus exames serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Curso de Pós Graduação Nível Doutorado da Faculdade de Medicina do ABC e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará nenhum custo para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Não haverá nenhum gasto extra de tempo, transporte, creche, alimentação, etc, uma vez que a extração do material se dará durante a cirurgia que irá ser realizada.

*Rubrica Participante:*_____ *Rubrica Pesquisador:*_____

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se

assim o desejar. O Dr Marcelo Ferraz de Campos certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso não existe a possibilidade de gastos adicionais, uma vez que esta pesquisa em nada alterará a cirurgia que já estou prestes a realizar. Em caso de dúvidas, poderei contatar o Dr Marcelo Ferraz de Campos no telefone (11) 98497-0009.

Este estudo clínico foi analisado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) é um órgão que tem por objetivo proteger o bem-estar dos indivíduos pesquisados. É responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, visando assegurar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do sujeito da pesquisa. Se você tiver dúvidas e/ou perguntas sobre seus direitos como participante deste estudo, ou se estiver insatisfeito com a maneira como o estudo está sendo realizado, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina do ABC pelo endereço: Avenida Príncipe de Gales, 821, 1º andar - prédio: CEPES / Santo André / SP ou pelo telefone: (11)-4993-5453. O horário de atendimento é de segunda à sexta das 07h00 às 17h00.

Declaro que concordo em participar desse estudo, sendo que este termo de consentimento livre e esclarecido me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____,
fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha
colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto,
sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.



Comitê de Ética em Experimentação Animal
Faculdade de Medicina do ABC
Mantida pela Fundação do ABC

REGISTRO CEEA FMABC PROTOCOLO Nº 003/2011

Santo André, 28 de junho de 2011.

Ilmo (a). Sr (a).
Maria Aparecida da Silva Pinhal

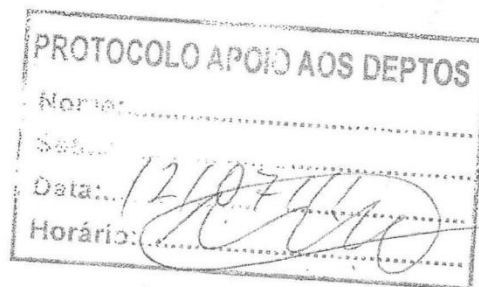
Prezado (a) Senhor (a):

Servimo-nos do presente para informar a V. Sa., que o Protocolo de pesquisa intitulado: **“Estudos moleculares da degeneração do disco intervertebral”**, foi aprovado em reunião do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMABC, realizada em **16 de junho de 2011**.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos com os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª. Mônica Akemi Sato
Vice-Presidente do Comitê de Ética em
Experimentação Animal da FMABC



Anexo 5 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FUNDAÇÃO DO ABC - FMABC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS DO LIGAMENTO AMARELO NAS DOENÇAS DEGENERATIVAS DA COLUNA LOMBAR

Pesquisador: Marcelo Ferraz de Campos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12564313.2.0000.0082

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina do ABC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 279.202

Data da Relatoria: 22/05/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo histopatológico do ligamento amarelo em pacientes com doença degenerativa da coluna lombar. O ligamento é retirado habitualmente nas cirurgias da coluna lombar em questão. Esse ligamento é desprezado, porém no presente estudo essa estrutura será analisada histopatologicamente.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar alterações histopatológicas (neovascularização, infiltrado inflamatório, celularidade, apoptose, degeneração mucoide, alterações granulares e calcificações) presentes no ligamento amarelo em patologias da doença degenerativa da coluna lombar. E então correlacionar com a expressão das metaloproteinases 2 e 9, heparanase, TGF β interleucina 6.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos inerentes ao procedimento cirúrgico e de exposição da confidencialidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho histopatológico, não acarreta prejuízo ao paciente além dos riscos inerente ao

Endereço: Av. Príncipe de Gales, 821

Bairro: Santo André

CEP: 09.060-650

UF: SP

Município: SANTO ANDRÉ

Telefone: (11)4993-5453

E-mail: cep@fmabc.br

FUNDAÇÃO DO ABC - FMABC



Continuação do Parecer: 279.202

procediementno cirúrgico e de quebra da confidencialidade. Adequado para pesquisa com ser humano, necessita pequenas correções.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Houve adequação do TCLE, porém precisa corrigir a formatação, pois a rubrica do participante saiu na página 2.

Detalhar o orçamento financeiro.

Recomendações:

Corrigir formatação TCLE (local da rubrica)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicitações atendidas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Na formatação o local da rubrica está fora da página.

SANTO ANDRE, 22 de Maio de 2013

Assinador por:

MARCIA RODRIGUES GARCIA TAMOSAUSKAS
(Coordenador)

Endereço: Av. Príncipe de Gales, 821

Bairro: Santo Andre

CEP: 09.060-650

UF: SP

Município: SANTO ANDRE

Telefone: (11)4993-5453

E-mail: cep@fmabc.br