Josemberg da Silva Baptista

**Análise do envelhecimento e degeneração de discos intervertebrais
humanos cervicais e lombares**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido
Liberti

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Baptista, Josemberg da Silva

Análise do envelhecimento e degeneração de discos intervertebrais humanos
cervicais e lombares / Josemberg da Silva Baptista. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Edson Aparecido Liberti.

Descritores: 1.Disco intervertebral 2.Degeneração do disco intervertebral
3.Metaloproteases 4.Citocinas 5.Fatores de crescimento neural 6.Envelhecimento
7.Imuno-histoquímica

USP/FM/DBD-225/13

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **08/02/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **007/12** intitulado: **“AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA ESTRUTURA DE DISCOS INTERVERTEBRAIS HUMANOS ASSINTOMÁTICOS JOVENS E IDOSOS”** apresentado pelo **Programa de FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

Pesquisador (a) Executante: Josemberg da Silva Baptista

CEP-FMUSP, 09 de Fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

***"Um projeto deve ser como um poema;
começa com amor e termina com sabedoria."***

***Robert Lee Frost
(Estados Unidos da América, 1874-1963)***

*Dedico essa obra à minha amada esposa,
Eloah da Silva Prado:*

*Por vencer barreiras culturais e abnegar de
suas aspirações para formarmos uma
família; por agir de maneira alegre e
paciente ao suportar a minha ausência, as
idas e vindas e o demasiado tempo dedicado
a esse trabalho; pelo irrestrito amor
empenhado em função da nossa felicidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao Deus onipotente, por permitir a minha existência com saúde e prover sempre excelentes pessoas ao meu redor, como as citadas ao longo dessa seção.

Aos meus amados pais, Ana Nazira da Silva Baptista e José Baptista Sobrinho, por sempre se mostrarem um firme esteio emocional, com motivação e apoio constante. Muito obrigado por propiciarem as melhores oportunidades de aprendizado, e as críticas e sugestões mais construtivas na minha vida.

Ao orientador dessa tese, e estimado amigo, Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti. Muito obrigado pela confiança e amizade depositada ao longo de nosso convívio; pela acolhida desde 2006 na "casa" da família VQM; pela maleabilidade no qual conduziu a orientação desse trabalho; pelas inúmeras lições filosóficas, anatômicas e pessoais, e por demonstrar com rígido caráter, em sua obra, o altruísmo inspirador e a irrestrita dedicação e contentamento com o trabalho. A segunda epígrafe dessa tese é dedicada ao senhor.

Ao meu grande amigo, Dr. Ricardo Bragança de Vasconcellos Fontes, por juntamente ao Dr. Liberti me incluir nesse projeto e depositar tamanha confiança, pelos vários ensinamentos e momentos de discussão ao longo dessa tese, pelo exemplo de médico dedicado a ciência em função dos seus pacientes, causando inspiração em todos ao seu redor; e, evidentemente, pelos gloriosos momentos de descontração.

Ao querido amigo, Prof. Dr. Rogério Albuquerque Azeredo, não somente por me impelir nessa jornada científica desde 2005, mas por se mostrar sempre uma fonte de amizade, aprendizado e trabalho.

Ao Grande Mestre, Prof. Fernando Musso, por ascender a fogueira da anatomia em minha mente, e frequentemente alimentá-la com seu exemplo de retidão e trabalho.

Ao dedicado colega Arthur Nery que sem a ajuda na aquisição dos materiais para técnica imuno-histoquímica essa tese não teria ocorrido.

Ao amigo Ricardo Bandeira, o "Robin Hood" da ciência; pelas muitas horas passadas na bancada, dedicadas ao trabalho, discutindo perspectivas e se divertindo "a valer".

Ao estimado amigo, Prof. Dr. Ricardo Eustáquio da Silva, que com sua dicção serena e postura austera me auxiliou na jornada do doutoramento com muita discussão acadêmica e, sobretudo, com relação às atividades didáticas na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Ao meu grande amigo, colega de faculdade, de pós-graduação, de departamento, quase um irmão, Prof. Me. William Paganini Mayer. Com sua seriedade e dedicação, mostrou-se em todos os momentos engajado em prestar-me auxílio na realização desse aprimoramento, tanto nos afazeres da UFES quanto nos momentos privilegiados de lazer.

À Prof. Flávia de Oliveira, querida amiga que sempre mostrou-se um exemplo de dedicação a ciência e a anatomia, e pelas contribuições acerca dessa obra.

Ao Prof. Richard Halti Cabral, por ser um entusiasta da ciência anatômica, e pelas discussões e contribuições principalmente clínicas acerca dessa tese.

Ao Prof. Francisco Javier Hernandez Blazquez, por seus sábios apontamentos ao presidir a banca de qualificação do presente trabalho.

À minha querida irmã Luana Arpini que, com suas batalhas diárias, sempre me inspirou a seguir em frente.

À André Arpini e Bernardo Baptista Arpini, pelo suporte emocional familiar nos diversos momentos dessa tese.

Aos amigos, Prof. Willian Bautz e Profa. Dra. Letícia Bautz, que fomentaram ricos momentos de discussão sobre os métodos empregados nessa tese.

À Profa. Ma. Andréa Vasconcellos Batista da Silva por sempre demonstrar sinceridade e coragem na sua postura, e amparar-me sempre que necessário nas atividades acadêmicas da UFES.

Ao Chefe do Departamento de Morfologia da UFES, Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira, que assessorou institucionalmente o necessário para que esse doutoramento pudesse ocorrer.

À minha querida "sobra" Sra. Débora Aparecida da Silva, que com seu jeito descontraído e maternal me amparou afavelmente em todo o período do doutoramento.

À carinhosa Família Gardim da Silva: Sra. Leda Gardin da Silva, Sr. Gumercindo da Silva, e Sra. Maria Cristina Gardin da Silva. Com muita simplicidade e amor me auxiliaram nesse período.

Aos caríssimos amigos Nilton e Marisa Fontes, que com muito carinho me encorparam a sua família, e propiciaram verdadeiros momentos de sabedoria e descontração.

Aos meus afilhados do coração, Leonardo Liberti e Érica Liberti, pela prontidão em proporcionar momentos de apoio confortante.

Aos amigos e colegas de profissão, Prof. Dr. Carlos Eduardo Seyfert, Profa. Ma. Patrícia Marega, Prof. Dr. Eduardo Henrique Beber, Prof. Dr. Dorival Terra Martini, Prof. Me. Flávio Tampelini, e Prof. Me. Alexandre Melo, que sempre estiveram próximos, mesmo distantes geograficamente, torcendo e ajudando no que fosse necessário para realização desse trabalho.

Aos "Jovens" amigos do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFACC): Aline Gonçalves, Adriano Ciena, Any Kelly Lima, Ariane Sardo, Bruna Caixeta, Cristina Bolina, Giovanna de Campos, Gisele Martins, Jodonai Silva, Josy Rosa, Joice Pereira, Lídia Cruz, Lígia Mendonça, Liliana Ribeiro, Marcelo Cavalli, Naianne Klébis, Natália Camargo, Paulo Henrique Alves e Regina Bolina-Matos. Esses são os que justificam o verdadeiro espírito "**Vem que é Mole**".

Ao casal Bobna, Aline e André Bobna, por sempre proporcionarem bons momentos de diversão e aprendizado.

À equipe de guardas do Instituto de Ciências Biomédicas III da USP, que propiciaram segurança e coleguismo para que eu pudesse trabalhar nas horas e dias mais inoportunos do ano.

Às Secretárias da Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da FMUSP, Sra. Tânia Regina de Souza e Sra. Liduvina Barros, por se mostrarem sempre solícitas no desempenho de suas atividades.

À Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, por receber-me como candidato e aluno na Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, e prontamente permitir a minha transferência para a Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental.

À Profa. Dra. Elnara Márcia Negri, por ser solidária ao me receber como aluno na Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental enquanto aguardava a transferência de orientação para o Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

Aos indivíduos envolvidos na pesquisa e suas famílias, que em hora difícil consentiram com a prática da pesquisa e reconheceram o valor de ajudar ao próximo.

A Sociedade Americana de Pesquisa em Coluna Cervical - *Cervical Spine Research Society*, pelo financiamento dessa pesquisa.

A minha querida "filhota" canina, Penny, que com suas "lambejocas" encheu de alegria os momentos difíceis dessa tese.

Aos meus alunos.

Homenagem especial

Profa. Dra. Sílvia de Campos Boldrini (1970-2011):

Um trágico acidente em Junho de 2011 retirou a nossa querida Sílvia do convívio diário. Ela desempenhava, com excelência, um papel maternal no VQM; junto do nosso postigo "paizão" Edson, nosso ambiente de trabalho sempre manteve um caráter familiar simbólico, especialmente para os pós-graduandos de outras regiões do Brasil. Serena e branda, Sílvia sempre se mostrava solícita em propiciar um sorriso, um abraço, uma conversa confortante ao tratar as pessoas, irrestritamente. Dessa maneira, era impossível, mesmo nos piores dias, que ela não nos arrancasse, em retribuição, também um sorriso.

Hoje, com grande sentimento de saudade, lembremos da linda pessoa que conviveu conosco, de suas ações exemplares, de sua postura perante os alunos, aulas e pesquisas. Assim, tentemos nos confortar, dia após dia, ao pensar que ela nunca se foi pois, na verdade, sua marca em todos nós deixou.

"A vida é a infância da nossa imortalidade"

Johann Wolfgang von Goethe, Alemanha (1749-1832)

O Espírito Segue (The Spirit Carries On)

Dream Theater

De onde nós viemos? Porque estamos aqui?	Where did we come from? Why are we here?
Para onde nós vamos quando morremos?	Where do we go when we die?
O que há além? E o que havia antes?	What lies beyond? And what lay before?
Alguma coisa é certa na vida?	Is anything certain in life?
Eu costumava ter medo da morte	I used to be frightened of dying
Eu costumava achar que a morte era o fim	I used to think death was the end
Mas isso foi antes	But that was before
Eu não estou mais assustado	I'm not scared anymore
Eu sei que minha alma transcenderá	I know that my soul will transcend
Eu posso nunca encontrar as respostas	I may never find all the answers
Eu posso nunca entender porque	I may never understand why
Eu posso nunca provar	I may never prove
O que eu sei ser verdade	What I know to be true
Mas eu sei que eu ainda tenho que tentar	But I know that I still have to try
Se eu morrer amanhã	If I die tomorrow
Eu estarei bem porque eu acredito	I'd be all right because I believe
Que após nós morrermos	That after we're gone
Que o espírito segue	The spirit carries on
"Siga adiante, seja bravo, não chore no meu túmulo	"Move on, be brave don't weep at my grave
Porque eu não estou mais aqui	Because I am no longer here
Mas por favor nunca deixe suas lembranças sobre mim desaparecer"	But please never let your memory of me disappear"

"Ciência e Arte jorram da mesma fonte"

Christian Albert Theodor Billroth

(Áustria, 1829– 1894)

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado da American Medical Association (AMA).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

Prólogo

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	OBJETIVOS.....	33
3	HIPÓTESE.....	37
4	REVISÃO DA LITERATURA.....	41
4.1	Aspectos epidemiológicos sobre a coluna vertebral.....	43
4.2	Morfofunção da coluna vertebral.....	47
4.3	Estrutura do disco intervertebral.....	49
4.4	Envelhecimento e degeneração do disco intervertebral.....	54
4.4.1	O remodelamento da matriz extracelular de discos intervertebrais.....	57
4.4.2	As citocinas pró-inflamatórias e os agentes angiogênicos nos discos intervertebrais.....	64
4.4.3	Moléculas neurotróficas e axonogênicas em discos intervertebrais....	71
5	MÉTODOS.....	77
5.1	Obtenção dos espécimes e formação dos grupos experimentais.....	79
5.2	Análise macroscópica.....	82
5.3	Descalcificação dos espécimes.....	85
5.4	Microscopia de luz.....	88
5.4.1	Técnica Imuno-histoquímica.....	89
5.4.2	Análises qualitativa e quantitativa.....	93
5.5	Tratamento estatístico.....	98
6	RESULTADOS.....	99
6.1	Análise da amostra.....	101
6.2	Análise macroscópica.....	103
6.3	Análise microscópica.....	107
6.3.1	Morfologia.....	108
6.3.2	Imuno-histoquímica.....	110
6.3.2.1	Aspectos qualitativos.....	111
6.3.2.2	Aspectos quantitativos.....	130
7	DISCUSSÃO.....	137
8	CONCLUSÕES.....	151
	Anexos.....	155
	REFERÊNCIAS.....	160

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

ADAMTS-4 – *A Desintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin*
AF – Anel fibroso
BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*
CD34 – *Cluster of differentiation 34*
CD68 – *Cluster of differentiation 68*
Col – Colágeno
CV – Corpo vertebral
DDD – Doença degenerativa discal
DIV – Disco intervertebral
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EUA – Estados Unidos da América
ICE IL-1 β – *Interleukine Converting Enzyme (IL-1 β)*
FGF – *Basic fibroblast growth factor*
GAP43 – *Growth Associated Protein 43*
GAGs – Glicosaminoglicanas
GI – Grupo idoso
GJ – Grupo jovem
GM-CSF – *Granulocyte macrophage colony stimulation factor*
ICB – Instituto de Ciências Biomédicas
IGF-1 – *Insulin-like growth factor*
IL-1 β – Interleucina-1 β (*Interleukin-1 β*)
LAFACC – Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia
LLA – Ligamento longitudinal anterior
LLP – Ligamento longitudinal posterior
kDa – Kilodalton
MMP – Metaloproteinase de matriz
MT-MMPs – *Membrane type MMP's*
NF-68 – *Neurofilament 68kDa*
NGF- β – Fator de crescimento neural- β
NP – Núcleo pulposo
PECAM-1 ou CD31 – *Platelet endothelial cell adhesion molecule -1(CD31)*
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGP 9.5 – *Protein gene product 9.5*
PG – Proteoglicana
PV – Placa vertebral
RNA – Ácido ribonucleico
RNM – Ressonância Nuclear Magnética
RT-PCR – *Real time polymerase chain reaction*
Sema3A – *Semaphorin 3A*
SLPR – *Small leucine-rich proteoglycans*
Sox9 – *Transcription factor Sox9*
TACE – *Metalloprotease TNF alpha converting enzyme (ADAM17)*

TGF- β – *Transforming growth factor*

Th - Escala de Thompson

TIMP-1 – *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1*

TNF- α – Fator de crescimento tumoral – α

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

USP – Universidade São Paulo

VEGF – Fator de crescimento vascular

Lista de tabelas

Tabela 1 - Características antropométricas dos indivíduos constituintes do GJ e GI. A idade está representada em anos, o gênero como masculino (M) e feminino (F), a altura em centímetros e o peso em kilogramas.....80

Tabela 2 – Escala de Thompson para avaliação morfológica dos discos intervertebrais.....83

Tabela 3 - Características das moléculas e anticorpos primários utilizados no estudo.....90

Tabela 4 – Relação dos subgrupos experimentais e dos agrupamentos de anticorpos testados em cada um deles.....91

Tabela 5 – Distribuição dos espécimes dos grupos Jovem e Idoso, diagnosticados de acordo com a escala de Thompson.....103

Tabela 6 – Alocação dos cadáveres e anticorpos nos subgrupos experimentais.....108

Lista de figuras

- Figura 1** - Metodologia de análise macroscópica. Em **A** observa-se a fotografia da vista superior do bloco vertebral lombar após a remoção. Ao lado pode-se observar a vista medial do bloco vertebral cervical em **B**, e lombar em **C**, após secção sagital mediana secção (linha amarela, **A**). Após realizada secção, os discos intervertebrais contidos neles foram examinados pela face medial a fim de se classificar o grau de degeneração segundo a escala de Thompson.....85
- Figura 2** - Metodologia de descalcificação dos espécimes e obtenção das peças (ou partes) de um disco intervertebral. Pode-se observar a face superior dos blocos vertebrais após a remoção. A linha amarela demonstra a orientação das secções pelo plano sagital mediano, ao qual foi utilizada para avaliação da escala de Thompson nos segmentos cervicais (**A**) e lombares (**B**). A linha verde representa o corte paramediano que foi limitante para retirada das peças, enquanto que a linha preta registra os cortes frontais que orientaram a separação das amostras em anterior e posterior nos discos cervicais (C4A e C4P; C5A e C5P) e anterior, média(*) e posterior nos disco lombares (L4A, L4M e L4P; e L5A, L5M e L5P).....87
- Figura 3** - Representação da análise qualitativa. Observar em **A** a imunoexpressão no citoplasma da célula localizada na placa vertebral e a densidade de células no campo de estudo. Nota-se em **B** aglomerado celular demonstrando imunopositividade próximo a fissura ou fenda (*). Verificar em **C** a imunoexpressão de VEGF nas células localizadas profundamente no arranjo ou trama fibro-colágena do DIV. Em **D** percebe-se a marcação citoplasmática e também na matriz extracelular de TIMP-1.....95
- Figura 4** – Representação esquemática das etapas do protocolo de quantificação da imuno-histoquímica.....97
- Figura 5** - Gráficos das variáveis antropométricas tratadas estatisticamente entre GJ e GI. Não se observa diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (**A**, altura e **B** peso). Barras horizontais demonstram as médias, as quais também podem ser observadas na **Tabela 1**.....101
- Figura 6** – Demonstração fotográfica dos diferentes graus de Thompson nos blocos vertebrais cervicais do **GJ** e **GI**. Não foram encontrados discos grau 1 no GI.....104
- Figura 7** – Demonstração fotográfica dos diferentes graus de Thompson nos blocos vertebrais lombares do **GJ** e **GI**. Não foram encontrados discos grau 5 no GJ e grau 1 no GI.....105
- Figura 8** – Gráficos demonstrando a média $\pm$ desvio padrão do grau de degeneração nas regiões e grupos avaliados. Observar que os discos do GI são significativamente mais degenerados que os do GJ, tanto na região cervical quanto no lombar.....107
- Figura 9** - **Figura 9** - Fotomicrografias de discos intervertebrais corados por hematoxilina e eosina. Observar em A e E as regiões distintas do tecido discal: (*) Placa Vertebral; (**) Arranjo fibro-colágeno; (***) área de interseção PV/arranjo fibro-colágeno.....109

Figura 10 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para MMP-1 na PV (A-D, F) e AFC (E) de DIVs. Observar a marcação citoplasmática (A, B e D) e o grupo isógeno (E), bem como a ausência de marcação nos controles (C e F).....113

Figura 11 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para MMP-2 na PV (A, C, E, F), na interseção PV/AFC (B) e AFC (D) de DIVs. Observar a imunomarcação no citoplasma com aspecto granulado (A), na membrana (B, D) e em área de remodelamento da MEC (E). (C e F: ausência de marcação nos controles).....115

Figura 12 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para MMP-3 na interseção PV/AFC (A, B, C, D, F) e PV (E) de DIVs. Observar a imunomarcação no citoplasma das células em área de remodelamento da MEC (A, E) e próximo a fissuras (B). Comparar a morfologia da célula entre (B) e (A). (C e F: ausência de marcação nos controles).....117

Figura 13 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para TIMP-1 no AFC (A), na PV (C, D, F) e na interseção PV/AFC (B, D) de DIVs. Notar a imunomarcação na MEC (A), no citoplasma das células (A, B, D, E) e próximo a fissura (E). (C e F: ausência de marcação nos controles).....119

Figura 14 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para IL-1 β na interseção PV/AFC (A, C, D, E, F) e na PV (B) de DIVs. Observar a imunomarcação em citoplasma e membrana plasmática das células (A, B, D), na MEC (B), e próximo a fissuras (A, E). Comparar a morfologia da célula (A, D). (C e F: ausência de marcação nos controles).....121

Figura 15 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para TNF- α na interseção PV/AFC (A, B, E) e na PV (C, D, F) de DIVs. Verificar a imunoexpressão em células próximas a fissura (A), na MEC (B) e aglomerado celular (E). (C e F: ausência de marcação nos controles).....123

Figura 16 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para VEGF na interseção PV/AFC (A, D, E) e na PV (B, C, F) de DIVs. Notar a imunoexpressão no citoplasma da célula (B, D), em grupos isógenos (A) e próximo a fenda (E). (C e F: ausência de marcação nos controles).....125

Figura 17 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para NGF- β na PV (A) e na interseção PV/AFC (B, C, D, E, F) de DIVs. Observar a marcação no citoplasma e membrana de células (A, B, D), e próximo a fissuras (B, E). Comparar a morfologia das células (B, E). (C e F: ausência de marcação nos controles).....127

Figura 18 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para BDNF na interseção PV/AFC (A, C, D, E), no LLP (B) e na PV (F) de DIVs. Verificar a marcação em grupos isógenos (A, D), no LLP (B) e citoplasma e membrana de células (E), e próximo a fissuras (B, E). Comparar a morfologia das células (B, E). (C, F: ausência de marcação nos controles).....129

Figura 19 - Representação gráfica da quantificação imuno-histoquímica nas regiões cervicais anterior (A) e posterior (B) dos grupos GJ e GI. Destaque para as moléculas de MMP-2, -3, IL-1 α , VEGF e NGF- β130

Figura 20 - Representação gráfica da quantificação imuno-histoquímica nas regiões lombares anterior (A), médio (B) e posterior (C) dos grupos GJ e GI. Destaque para as moléculas de MMP-2, -3, IL-1 α , VEGF e NGF- β131

Figura 21 - Representação gráfica da análise estatística dos remodeladores da matriz extracelular MMP-1 (A), MMP-2 (B), MMP-3 (C) e TIMP-1 (D). Observar, entre os grupos e regiões, as diferentes expressões.....133

Figura 22 - Representação gráfica da análise estatística dos agentes pró-inflamatórios e angiogênico: IL-1 β (A), TNF- α (B) e VEGF (C). Notar as diferentes expressões entre os grupos e regiões.....134

Figura 23 - Representação gráfica da análise estatística das neurotrofinas NGF- β (A) e BDNF (B). Notar as diferentes expressões nos grupos e regiões, com destaque para o NGF- β no setor médio do GI.....135

RESUMO

Baptista JS. *Análise do envelhecimento e degeneração de discos intervertebrais humanos cervicais e lombares* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A degeneração do disco intervertebral (DIV) é um processo crônico e apontado como o maior causador de cervicalgia e lombalgia. Esse processo geralmente conta com a degradação da matriz extracelular, expressão de citocinas inflamatórias e fatores angiogênicos e axonogênicos. Entretanto, muito pouco se sabe sobre esse processo em DIVs assintomáticos durante o envelhecimento, principalmente no segmento cervical. O objetivo desse estudo foi de delinear o perfil de moléculas relacionadas à degeneração discal em DIVs cervicais e lombares. **MÉTODOS:** Discos intervertebrais humanos cervicais e lombares (C4-C6 e L4-S1) foram coletados em autópsia de 30 indivíduos presumivelmente assintomáticos e divididos em grupos jovem (GJ<35 anos, n=60) e idoso (GI>65 anos, n=60). O nível de degeneração foi constatado pela escala de Thompson, e foi correlacionado com a detecção imuno-histoquímica das moléculas de MMP-1, -2, -3, TIMP-1, IL-1 β , TNF- α , VEGF, NGF- β e BDNF. **RESULTADOS:** Todos os DIVs mostraram algum grau de degeneração, embora mais acentuadas no GI. As moléculas empenhadas no estudo foram identificadas em ambos grupos. A detecção imuno-histoquímica foi prevalente no citoplasma das células nativas do DIV e na região de interseção entre a placa vertebral e o arranjo fibro-colágeno. O envelhecimento propiciou, no disco cervical, maior expressão de MMP-2, -3, VEGF, NGF- β e BDNF, enquanto que no disco lombar, a maior expressão foi de MMP-1, -2 -3, TIMP-1, TNF- α , VEGF e NGF- β . **DISCUSSÃO:** O envelhecimento de DIVs cervicais e lombares caracterizou-se por exibir um processo catabólico e extensivo remodelamento da matriz extracelular, os quais podem ser interpretados como eventos que antecipam a doença degenerativa discal. Esse processo é capaz de levar a angiogênese e axonogênese de modo a ampliar o metabolismo aeróbico do DIV e captar informação nociceptiva como forma de defesa, uma vez que até nos discos lombares de indivíduos jovens essa última característica pôde ser observada. Discos assintomáticos também exibem moléculas relacionadas à doença degenerativa discal e talvez a inibição de parte dessas possa resultar em terapia preventiva.

Descritores: Disco intervertebral, Degeneração do disco intervertebral, Metaloproteases, Citocinas, Fatores de crescimento neural, Envelhecimento, Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Baptista JS. *Analysis of aging and degeneration of human cervical and lumbar intervertebral disc* [Ph.D. thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUCTION: Degeneration of the intervertebral disc (DIV) is a chronic process that pointed as a major cause of neck and low back pain. This process generally includes an extracellular matrix degradation, expression of inflammatory cytokines, angiogenesis and axonogenesis factors. However, there is a little known about this process in asymptomatic DIVs during aging, especially in the cervical region. The aim of this study was to delineate the profile of molecules related to disc degeneration in the cervical and lumbar discs. **METHODS:** Human cervical and lumbar intervertebral discs (C4-C6 e L4-S1) were harvested at autopsy from 30 asymptomatic individuals, and divided according to age with young (GJ<35 years old, n=60) and elderly (GI>65 years old, n=60) groups. Gross degeneration was graded according to the Thompson scale and this was correlated to the immunohistochemical detection of molecules of MMP-1, -2, -3, TIMP-1, IL-1 β , TNF- α , VEGF, NGF- β e BDNF. **RESULTS:** Discs from GJ were significantly less degenerated than those of GI. The molecules involved in the study were identified in both groups. The immunohistochemical detection was prevalent in the cytoplasm of native disc cells and the region between the vertebral plate and fibrous collagen arrangement (intersection). Aging provided in cervical disc, increased expression of MMP-2, -3, VEGF, NGF and BDNF- β , whereas in the lumbar disc the highest expression of MMP-1, -2, -3, TIMP-1, TNF- α , VEGF and NGF- β was seen. **DISCUSSION:** The aging of cervical and lumbar DIV was marked by catabolic process and a extensive remodeling on extracellular matrix which can be interpreted as a predict event of the degenerative disc disease. This process can lead to angiogenesis and axonogenesis in order to expand the aerobic metabolism of the DIV and get nociceptive information as a defense, since even in the lumbar discs of young individuals this last feature can be observed. Asymptomatic discs also exhibit molecules related to degenerative disc disease and perhaps the inhibition some of these can result in preventive therapy.

Descriptors: Intervertebral disc, Intervertebral disc degeneration, Metalloproteases, Cytokines, Nerve Growth Factors, Aging, Immunohistochemistry.

Prólogo

A trajetória da presente pesquisa foi iniciada em 2007 pelo Dr. Ricardo Fontes, que a propósito de sua tese de doutoramento, orientada pelo Dr. Liberti no ICB/USP, começou a busca por material cadavérico para padronizar um dos estudos morfológicos mais completos em discos intervertebrais humanos. A coleta desse material foi realizada no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC, São Paulo), lotado na Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), onde o Dr. Fontes selecionou cuidadosamente, através de entrevista com os familiares, cadáveres assintomáticos jovens e idosos, para retirada de discos intervertebrais (DIV) cervicais e lombares.

Sua tese intitulada "O disco intervertebral humano nas regiões cervical e lombar: morfologia e envelhecimento"¹, utilizou-se de avaliações por ressonância magnética, macroscopia, histologia, microscopia eletrônica de varredura e imuno-histoquímica, culminando em dados que proporcionaram avanços para o entendimento do mecanismo de degeneração do disco intervertebral, com relação ao fator etário.

Já em 2010, um ano antes da defesa de sua tese, os Drs. Fontes e Liberti confiaram a mim a continuação da pesquisa que, em deferência a eles, muito honrosamente resultou nessa obra: um estudo sobre o perfil de moléculas relacionadas à inflamação, angiogênese, axonogênese e remodelamento da matriz extracelular, na estrutura dos disco intervertebrais humanos jovens e idosos, nas regiões cervicais e lombares. Através da riqueza do material experimental e técnicas de investigação foi possível discutir como o envelhecimento propicia, aos DIVs, morfologia tão diferente entre os indivíduos e regiões da coluna vertebral, quais prováveis moléculas predizem a doença degenerativa discal, e qual é a repercussão biológica do fenótipo discal frente a essas modificações.

É comportamento secular do ser humano, a busca por soluções terapêuticas para as duas principais queixas de dor, as quais levam o indivíduo a buscar algum serviço de saúde: a dor “de cabeça”, e a dor “nas costas”². As dores relacionadas à coluna vertebral, de qualquer origem ou em qualquer região da mesma, sempre instigaram diferentes profissionais da área da saúde a avaliar com extremo cuidado esta condição em cada indivíduo, dada a complexidade e a possibilidade de comprometimento iatrogênico, sobretudo do ponto de vista funcional. Essas dores, localizadas ou não, muitas vezes irradiadas para os membros inferiores, assolam os indivíduos das mais diferentes sociedades ao redor do mundo, caracterizando-se nos trabalhadores, como um dos principais fatores de comprometimento da saúde³⁻⁵.

Desde o século XIX a estrutura morfológica dos componentes anatômicos da coluna vertebral é estudada com o intuito de se estabelecer possíveis conexões entre as modificações que ocorrem na mesma, e o potencial dessas em se tornarem agentes causadores de dor⁶. Em geral, os primeiros estudos foram delineados na estrutura dos processos articulares das vértebras e dos discos intervertebrais (DIVs) utilizando-se de observações morfológicas, histopatológicas e radiológicas. Assim, as descrições acerca da estrutura do DIV têm sido pautadas naqueles da região lombar, aceitas como verdadeiras para os discos das demais regiões (torácica e cervical)^{7,8}. Ulteriormente, mas com o mesmo objetivo, técnicas de discografia e o uso de ressecções cirúrgicas também foram adicionadas para o estudo dessas estruturas⁹.

Se por um lado essas assertivas podem ser consideradas, a fim de se estabelecer um padrão geral da conformação do DIV e da sua estrutura básica, o mesmo não se aplica quando se depara com problemas a serem resolvidos em atos cirúrgicos ou mesmo clínicos.

No entanto, foi somente a partir da década de 1990 que, devido a avanços tecnológicos e a consequente difusão dos mesmos, investigações específicas puderam ser realizadas nesse campo^{10,11}. Desta maneira, metodologias utilizando as biológicas celular e molecular, possibilitaram avaliações mais minuciosas que, se por um lado não eram aplicáveis diretamente na clínica, por outro, contribuíram com uma somatória de dados relevantes para o melhor entendimento sobre a fisiopatologia das lombalgias e cervicalgias.

Entretanto, mesmo considerando o estado atual da arte nas pesquisas sob o tema, é difícil ainda entender porquê um indivíduo em idade senil (por exemplo, com 70 anos), com evidente degeneração dos elementos estruturais da coluna vertebral não manifeste sintomatologia, e outro, com a metade da idade, com características estruturais melhores do que naquele, apresente cervicalgia e lombalgia^{6,12,13}.

Ao longo de aproximadamente três décadas de estudos, grandes avanços puderam ser notados sobre a elucidação da cascata fisiopatológica corrente na degeneração dos DIVs humanos, baseando-se principalmente em evidências experimentais obtidas de discos doentes. Entretanto, o processo degenerativo relacionado ao envelhecimento é ainda assunto inédito.

Sabe-se hoje, que o processo de degeneração discal caracteriza-se por aumento da degradação da matriz extracelular (MEC) e diminuição da síntese normal desse elemento no disco, levando a perda das suas características hidrofílicas e consequente instabilidade biomecânica da coluna vertebral. Muitos desses eventos são atribuídos às metaloproteinases de matriz (MMPs), proteínas que atuam no remodelamento natural da MEC degradando os diversos componentes ali localizados. O desequilíbrio entre a sua expressão e do seu inibidor endógeno (TIMP, *tissue inhibitor of metalloproteinases*), tem sido detectado na degeneração discal. Além disso, a progressiva expressão de citocinas pró-inflamatórias, e a interação entre essas moléculas e o remodelamento da MEC, também têm sido observadas em DIVs doentes^{14,15}.

Partindo da premissa que o DIV normal é avascular e aneural a partir da primeira década de vida^{16,17}, o crescimento de microvasos (angiogênese) e de neurofilamentos em direção as partes mais profundas do DIV se mostram eventos importantes no processo degenerativo, e têm sido detectados em discos com avançado estado de degeneração. Em destaque, a nocicepção aberrante presente na doença degenerativa discal (DDD) está relacionada à expressão de neurotrofinas pelo tecido discal em degeneração¹⁸⁻²⁰.

Perante o exposto, as moléculas de MMP-1, -2, -3, TIMP-1, IL-1 β , TNF- α , VEGF, NGF- β e BDNF vêm sendo apontadas como as protagonistas na degeneração discal, e a correlação entre elas têm contribuído para elucidar muitos aspectos sobre a

DDD, servindo como base para proposições terapêuticas futuras para o tratamento dessa condição¹⁹⁻²³. Entretanto, a grande heterogeneidade dos estudos permite questionamentos sobre os diversos métodos empregados, sobretudo, na seleção das amostras^{21,24-28}.

O uso de animais para estudos DIVs configura prática importante na aplicação e sistematização de métodos, uma vez que ocorre em condições experimentais. No entanto, os modelos estabelecidos não são submetidos a cargas de força aplicadas na coluna vertebral, nem tampouco permite que se faça referência à sintomatologia que pode ser documentada em humanos, dificultando a repercussão desses resultados diretamente na prática clínica^{11,29,30}.

Uma boa parte dos trabalhos utiliza o produto da ressecção cirúrgica anterior do DIV, o que permite a análise da parte superficial e profunda do anel fibroso (AF) e do núcleo pulposo (NP), entretanto, omite a parte posterior^{19,22,31-34}. Outros utilizam como DIV controle o produto cirúrgico retirado de nível vertebral adjacente ao patológico³⁵ ou oriundos de trauma^{21,33,34,36}; da região torácica para comparação com a região lombar³⁷, e até mesmo extrapolam os resultados e características dos discos lombares para os discos das demais regiões da coluna vertebral^{7,8}. Além disso, há autores que consideram o DIV de origem cadavérica como "normal", mesmo que obtidos de indivíduos em idade avançada, e os utilizam para formar o controle do experimento com DIVs doentes³⁸.

O tipo de análise imuno-histoquímica utilizada pelos pesquisadores também difere, levando, em última análise, a dados controversos entre os trabalhos, pois cada grupo de pesquisa propõem uma metodologia, exprimindo subjetividade na avaliação³⁹.

Tais divergências revelam uma lacuna importante a ser explorada, uma vez que a literatura ainda é incipiente em estudos utilizando-se simultaneamente de discos cervicais e lombares humanos obtidos de espécimes assintomáticos, especialmente com relação ao perfil de marcadores da degeneração discal, que é o propósito do presente trabalho.

2.1 Geral

Analisar, com técnicas de imuno-histoquímica, em discos intervertebrais das regiões cervical e lombar da coluna vertebral de indivíduos jovens e idosos, presumivelmente assintomáticos, fatores relacionados aos diferentes processos de degeneração discal.

2.2 Específicos

Delinear na amostra, o perfil dos seguintes fatores:

- Remodeladores da matriz extracelular e seu inibidor: MMP-1, -2, -3 e TIMP-1;
- Citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β e TNF- α ;
- Angiogênico: VEGF;
- Axonogênicos: NGF- β e BDNF.

A expressão das moléculas relacionadas ao processo inflamatório, angiogênico, axonogênico e do remodelamento da matriz extracelular, difere nos DIVs de acordo com a região da coluna vertebral e grupo etário.

4.1 Aspectos epidemiológicos sobre a coluna vertebral

A dor localizada na região cervical ou lombar é hoje uma das queixas mais frequentes em saúde pública. Estima-se que de 70 a 80% da população adulta passará por um episódio clinicamente relevante de lombalgia ao longo da vida⁴⁰, e duas de cada três pessoas experimentarão a cervicalgia neste mesmo período, onde a taxa de prevalência dessa é de 20-40%^{2,3,41} em um ano. Em virtude desses números, essas condições são umas das quais mais levam o paciente a buscar um serviço de saúde, além de serem as sintomatologias que mais geram o consumo de analgésicos. Esse último dado é tão importante, que na literatura já é possível encontrar estudos dedicados diretamente à análise do custo-benefício desses fármacos no combate da lombalgia e cervicalgia^{42,43}.

Muitos trabalhos buscam o cálculo de incidência e prevalência deste tipo de sintomatologia na população; no entanto, são muitas as variáveis a serem quantificadas, em virtude desta condição envolver vários fatores e que em conjunto se manifestam como cervicalgia e lombalgia. São elas: mal-formações da coluna vertebral, desvios funcionais, síndromes paraneoplásicas, síndromes renais, lesões por esforço repetitivo, neoplasias, infecções, fraturas e, razões mecânicas agudas ou crônicas⁴⁴. Analisando esses fatores isoladamente fica difícil diagnosticar se esta dor é intrínseca da região ou se esta queixa vai levar o paciente ao clínico e se, por fim, será quantificada nos estudos epidemiológicos. A população estudada, sua cultura social e médica, ocupação, hábitos diários e o tipo de pesquisa também afetam essas análises. Isso produz algumas lacunas nos resultados nesse tipo de estudo e gera um número pequeno de trabalhos comparáveis e com dados confiáveis, já que demonstram resultados discrepantes. Por exemplo: em uma meta-análise desempenhada por Walker⁴⁵, em 2000, foram identificados 30 estudos epidemiológicos sobre lombalgia com metodologia apropriada publicados entre 1966 e 1998. A partir destes estudos, pôde-se calcular a prevalência pontual desta queixa em 12 a 33%, com prevalência em um ano de 22 a 65% e 11 a 84% para a vida inteira⁴⁵, o que ilustra essa grande variável numeral.

Soma-se a essas peculiaridades do estudo epidemiológico o impacto econômico, direto ou indireto, destas duas condições sobre a sociedade moderna. Sabe-se hoje que esse impacto é enorme, sobretudo em razão dos custos indiretos da reabilitação. Num estudo realizado na Suécia, Hansson e Hansson⁴⁶ calcularam custos diretos e indiretos da

cervicalgia e lombalgia. Os custos diretos, incluindo procedimentos percutâneos e cirúrgicos para tratamento, representaram apenas 7% dos custos totais ao final de dois anos de seguimento. Sendo assim, a maior parcela dos custos decorreu de perdas indiretas, como pagamento de benefícios e dias perdidos de trabalho. Todavia, a perspectiva de retorno à atividade laboral foi muito baixa: ao final de dois anos, 28% destes pacientes não havia retornado ao trabalho. No cálculo total do estudo, observaram perdas de mais de 30 milhões de euros. Ainda assim, utilizando-se do número total de pessoas afastadas pelas mesmas causas naquele país durante o ano de 2001, pode-se afirmar que os custos totais para tratamento da cervicalgia e lombalgia chegaram a 1% do produto interno bruto (PIB) da Suécia⁴⁷.

Num estudo realizado em 2011 com base na sociedade alemã, os pesquisadores puderam observar que de todos os beneficiários (941.100 pessoas) que utilizaram um fundo de saúde específico (DAK *Unternehmen Leben*), em 2006/07, 7% se queixaram de dorsalgia. Desses, mais da metade não possuíam um diagnóstico definido (57%) sobre a causa da queixa de dor e a maior parte destes beneficiários eram mulheres (65%). Observaram também que a média de utilização de recursos e custos de saúde relacionados foi significativamente maior para os beneficiários com fatores de risco para dor crônica do que para os demais. Sobre estes custos ainda foi relatado que os mais significantes foram para prescrição de analgésicos, terapia multimodal da dor (fisioterapia, terapia ocupacional e outros) e cuidados gerais em hospital. Entretanto, o mais importante foi notar que os indivíduos que mais perdiam capacidade de trabalho ou se ausentavam do mesmo, foram os indivíduos com doença degenerativa discal (DDD). Segundo os autores, isso sugere que aqueles outros indivíduos com dorsalgia crônica e que continuam frequentando o trabalho, estão comprometendo a sua capacidade laboral de maneira imensurável, haja vista o quadro de dor que estão suportando. Observaram também, com base em dados de marcadores de cronicidade, que apenas 2,6% dos pacientes portavam, no momento da pesquisa, dor crônica, mas que 10 vezes mais (25,8%) daqueles indivíduos possuíam grande risco para entrar nesta classificação. Isso equivale a 4,7% dos beneficiários da DAK. Relatam também que o maior custo foi gerado por aqueles pacientes que possuem dor crônica ou lombalgia de origem específica de degeneração do disco⁴⁸.

Outros estudos utilizam levantamentos globais sobre as afecções da coluna vertebral, analisando qualquer queixa de dor na região dorsal como dado epidemiológico. Assim, o grupo americano da Universidade de Washington realizou dois interessantes estudos^{5,49}. No primeiro eles realizaram comparação entre dois diferentes anos, 1997 e 2005, e aplicaram uma complexa regressão estatística para avaliar o crescimento da economia do país e os gastos diretos com saúde. Observaram que de 1997 para 2005 os gastos realizados com pacientes que possuíam queixas de lombalgia e cervicalgia aumentaram em 65%, ou seja, aproximadamente 7% por ano e por pessoa, embora tenham notado que o número de pacientes com estas queixas apenas aumentou de 12 para 15% da população norte americana nesses anos, o que confirma a tese de que os custos em saúde para estas condições aumentaram. Além disso, esses pesquisadores puderam detectar que houve um aumento de 20,7 para 24,7% no número de pessoas que se declararam portadoras de limitações funcionais por exibirem cervicalgia ou lombalgia⁵. Muito embora este estudo não tenha calculado os custos indiretos dessas condições, é provável que as mesmas tenham impacto também nos custos fora da área da saúde. No segundo estudo, este mesmo grupo publicou em 2009 que entre os anos de 1997 e 2006 o principal gasto em saúde com pacientes que relatam dor lombar ou cervical foram as internações hospitalares (37% entre estes anos), mas que o principal aumento de custo foi com a prescrição de medicamentos(139%). No geral, os resultados do estudo apontam um aumento em 9% do total de gastos do sistema de saúde dos Estados Unidos para o tratamentos destas condições⁴⁹.

No entanto, o número de estudos que se refere especificamente a investigação da prevalência de cervicalgia na população é muito menor. A meta-análise desenvolvida por Hogg-Johnson et al. (2008)⁴ detectou apenas dezessete estudos adequados entre os anos 1980-2006. Estimaram, com base nesses, que a prevalência de cervicalgia em um ano na população adulta oscile ao redor de 20%, enquanto que cerca de 67% da população apresenta ao menos um episódio de cervicalgia ao longo da vida^{40,50,51}, ou seja, aproximadamente duas a cada três pessoas^{2,3,41}.

Em outra revisão sistemática da literatura, no qual contou com análise de 1.009 trabalhos entre os anos de 1980 e 2006, Côté et al. afirmam que a cada ano 11 a 14,1% dos trabalhadores são limitados em suas atividades por causa da cervicalgia². Esta

condição é um fardo financeiro para a sociedade desde que os seus sintomas resultem em períodos extensos de licença do trabalho e alta utilização dos serviços de saúde⁵².

Na Holanda, o total dos custos para tratamento da cervicalgia em 1996 foi estimado em 686 milhões de dólares, o que resultou em 1% do custo total em saúde, e 0,1% do produto interno bruto do país⁵³. Segundo esses autores, somente os custos diretos, ou seja, aqueles aplicados diretamente ao quadro de saúde do indivíduo, somaram 160 milhões de dólares (23%), enquanto que os custos indiretos, aqueles relacionados a perdas de trabalho principalmente, ou outra área fora da saúde, somaram 527 milhões de dólares (77%). Considerando o desenvolvimento de novas técnicas e ferramentas terapêuticas atuais, é evidente que houve aumento nos custos para tratamento em saúde⁵³.

Numa linha de pesquisa diferente, porém, ainda sobre a cervicalgia, Driessen et al. (2012)⁵⁴ utilizaram de bases eletrônicas tanto clínicas como econômicas a partir de 13 de janeiro de 2011 para avaliar o custo-benefício do tratamento desta condição. Como principal resultado observaram que a manipulação manual, fisioterapia ou acupuntura, não se mostraram conclusivas do ponto de vista do custo-benefício para tratamento da cervicalgia. Entretanto, o mais interessante desse estudo foi a constatação de que a ausência de definitivas conclusões científicas ocorre devido ao número ínfimo de estudos adequados para metodologia utilizada em seu estudo: apenas 5 dentre as 282 publicações reunidas de periódicos. Além disso, os mesmos afirmam que a tamanha heterogeneidade dos estudos e as diversas bases empíricas e científicas utilizadas dificultaram este processo. Isso demonstra a necessidade de dados específicos para a parte cervical da coluna vertebral, sobretudo, como manejo terapêutico, baseado principalmente em evidências morfológicas e clínicas.

Sabe-se que no Brasil, assim como em outras sociedades ao redor do mundo, as dores crônicas que mais afetam a população adulta são a cefaleia e a lombalgia⁵⁵. Entretanto, sobre a prevalência dessas condições em nível nacional, infelizmente não se obteve, no material bibliográfico revisado, conclusões sobre o número total. A maior parte da literatura que analisa essas doenças na sociedade brasileira foi obtida a partir de estudos em populações específicas, como em trabalhadores, grávidas, idosos, estudantes, indivíduos sedentários e outros^{44,56-61}, e localizadas em algumas regiões do país, como em Salvador (Bahia)^{57,62}, em Pelotas (Rio Grande do Sul)⁶³, e São Paulo (São Paulo)^{58,64};

estudos sobre a cervicalgia são escassos, e em geral são baseados em estimativa de prevalência internacional⁶⁵.

Dois grupos de pesquisa nacional^{60,61} concordam em seus resultados que a cervicalgia é a condição que mais afeta a categoria de enfermeiros(as) como reflexo de sua atividade laboral. Se tratando da lombalgia, um dado interessante adquirido num estudo envolvendo 577 indivíduos da população baiana⁵⁷ é que não foi verificado uma maior prevalência de lombalgia no gênero feminino, o que já foi observado na literatura internacional⁵². Isso ocorreu, provavelmente, porque essa pesquisa foi realizada em uma população trabalhadora específica, já que outro grupo sediado na mesma cidade (Salvador) e, que investigou a prevalência de dores crônicas em 2.297 pessoas dessa região, demonstrou que o gênero feminino foi o mais acometido, sobretudo na região lombar (16,3%)⁶².

Um grupo de pesquisa gaúcho⁶³ revelou que a prevalência de dorsalgia dentro de um ano em sua população foi de 63,1%, sendo a região lombar a mais referenciada (40%) e o sexo feminino o mais afetado, o que corroborou na direção dos resultados adquiridos na sociedade baiana. Ademais, Siqueira, Facchini e Hallal publicaram em 2005 o primeiro estudo que utilizou de base populacional sobre utilização de fisioterapia no Brasil, sendo possível demonstrar, após entrevista de 3.100 indivíduos adultos, que a principal causa que levou essa população a procurar o serviço de reabilitação foi a dorsalgia, especificamente a lombalgia⁶⁶.

Por fim, em virtude da utilização de distintas populações, métodos científicos e disparidade nos dados, se torna complexa a comparação e submissão desses estudos a um determinado desfecho ou a uma conclusão média sobre prevalência/incidência de dores na coluna vertebral na população brasileira⁶³.

4.2 Morfofunção da coluna vertebral

A coluna vertebral humana possui em sua formação, num padrão anatômico considerado normal, um total de 33 vértebras, sendo destas, 24 segmentos móveis pré-sacrais. Estes ossos têm características regionais e individuais de acordo com a função que exercem e alinham-se através de articulações específicas para formar a coluna

vertebral. Basicamente, dois tipos de articulações existem entre as vértebras: sinoviais do tipo plana, através das articulações dos processos articulares, além das cartilagíneas do tipo sínfises através dos discos intervertebrais (DIVs) – denominadas sínfises intervertebrais, estrutura essa que provê 1/4 da altura total da coluna vertebral⁶⁷. O DIV está localizado adjacente aos corpos vertebrais, sendo delimitado superiormente e inferiormente por essas mesmas estruturas, anteriormente pelo ligamento longitudinal anterior (LLA) e posteriormente pelo ligamento longitudinal posterior (LLP), o qual contém receptores nociceptivos^{68,69}.

As regiões da coluna vertebral recebem denominações relacionadas à orientação de sua curvatura em primária ou secundária, de acordo com o momento que essas surgem na vida. Sendo assim, essas regiões também podem ser denominadas, de acordo com a forma no plano sagital, como côncava ou convexa. Desta maneira, a região torácica e sacrococcígea são primárias e côncavas, já que se apresentam similares à curvatura fetal; de maneira contrária, as regiões cervical e lombar são secundárias, pois se desenvolvem a partir da sustentação da cabeça e da posição bípede adquirida pelo indivíduo mantendo, dessa maneira, uma convexidade anterior.

Evidências anatômicas traduzem esta conformidade da coluna vertebral. As curvaturas primárias são constituídas através de mudanças estruturais do corpo da vértebra, ou seja, a altura anterior do corpo vertebral é menor (em forma de cunha) do que a posterior. As curvaturas secundárias são formadas através da diferenciação adquirida pela ação dos vetores de força que atuam na coluna vertebral, a fim de equilibrar o centro de massa corporal e dissipar forças com a posição bípede. Essas forças modificam a altura posterior dos DIVs nestas regiões, tornando-as menores que a altura anterior, o que denota o mesmo aspecto “em cunha”, entretanto, no DIV. Este é um aspecto articular relevante para mobilidade da coluna vertebral, pois, biomecanicamente, as regiões mais móveis são a cervical e a lombar e, pelo mesmo motivo, estas são as mais afetadas por doenças osteomioarticulares⁷⁰.

Um dado específico entre a região lombar e cervical é que embora ambas as regiões sejam convexas e denominadas curvaturas secundárias, as vértebras de C3 a C7⁷¹ possuem no corpo vertebral um par de projeções em sentido superior e à lateral dos DIVs dessa região. São processos em forma de pontas ou ganchos, denominados

individualmente como unco do corpo; aspecto esse não conferido aos corpos vertebrais lombares. Isso exprime uma característica diferencial à estrutura anatômica dos corpos vertebrais da região cervical, bem como biomecânica e fisiológica⁷².

O unco do corpo e o DIV cervical, formam uma articulação diferenciada denominada uncovertebral (ou fendas de Luschka). Essa articulação não é observável no lactente, nem na infância, e só começa a ser desenvolvida a partir da adolescência para a fase jovem e adulta. Muito embora não se tenha um consenso entre os anatomistas, comumente essa articulação é julgada como sendo do tipo sinovial plana⁷¹. Além disso, a mesma pode ser também, na velhice, uma importante razão para cervicalgia em virtude de que pode-se considerar o seu desenvolvimento após a fase infantil como um sinal de degeneração e passível de reprodução de dor. Essa tese foi comprovada em 2009 quando Brismè et al.⁷² detectaram neuropeptídeos sendo expressos na cápsula e cartilagem articular destas estruturas anatômicas.

Há bastante tempo já se sabe que estas estruturas se relacionam de maneira sinérgica para produzir movimento. Sendo assim, dois conceitos foram propostos por pesquisadores em 1968 e 1978 para denominar esta relação: o segmento móvel - “*motion segment*” por Schmorl e Junghanns⁷³, ou o complexo das três articulações - “*three joint complex*” por Kirkaldy-Willis et al.⁷⁴, respectivamente. Esses autores, muito embora tivessem nomeado suas teorias de forma diferente, descreveram que os corpos vertebrais relacionados a um DIV e suas articulações dos processos articulares formam a menor parte funcional de uma coluna vertebral e, a partir dessa constatação, a função articular poderia ser empenhada de maneira fisiológica. Esta relação entre os elementos articulares do complexo é extremamente dependente, de forma que alterações degenerativas dos DIVs afetariam as facetas articulares, assim como o contrário também é verdadeiro.

4.3 Estrutura do disco intervertebral

Todos os 23 DIVs pré-sacrais do adulto possuem duas partes: o anel fibroso (AF) - perifericamente e superficialmente, e o núcleo pulposo (NP), que é a parte central e profunda do disco. Muito embora o NP fique localizado centralmente, a disposição das estruturas que compõem o AF não é igual, reservando o lugar do NP discretamente

posterior, tanto no DIV cervical quanto no lombar. Não obstante essas características, a proporção de NP e AF no DIV é diferente entre as duas regiões. Na região cervical o NP é 25% do tamanho total do DIV, enquanto que na região lombar é de 50%⁷⁵. A nomenclatura usada pela literatura científica internacional, que em geral é escrita por clínicos, nomeia o AF como uma estrutura externa, enquanto o NP é interno, como se o DIV fosse uma estrutura cavitária. Entretanto, utilizando-se de conceito anatômico, pelo motivo do DIV não ser uma cavidade, como se acreditava no passado⁷⁶, suas estruturas devem ser denominadas como superficial e profunda, como doravante aqui será abordado.

Ambas regiões do DIV são formadas por uma matriz celular ativa e que envolve remodelamento de seus constituintes de maneira contínua, promovendo um espaço discal ótimo para o desenvolvimento das funções biomecânicas da coluna vertebral. Esse mecanismo de manutenção é fornecido pelos condrócitos, que são as células predominantes da estrutura discal. Muitas vezes os autores descrevem os condrócitos como células nativas do DIV, embora uma quantidade relevante de fibroblastos também exista no disco⁷⁷. Esses dois elementos celulares são distintos sobretudo pela forma no qual se apresentam. Os condrócitos variam, dependendo do seu estado etário e localização no DIV, entre a forma ovoide (jovem ou no AF) ou globiliforme (maduro ou no NP, predominantemente), tanto com relação a membrana citoplasmática quanto o núcleo; já os fibroblastos sempre se mostram portando uma forma afinada ou filiforme de seus constituintes celulares. Vale ressaltar ainda que os fibroblastos são, em geral, células notoriamente menores que os condrócitos⁷⁸.

Além dos componentes celulares, classicamente é descrito na literatura que os diversos tipos de colágenos (Col), proteoglicanas (PG), proteínas não-colágenas, elastina e água formam a estrutura do DIV saudável. Assim, sabe-se que aproximadamente 90% desse colágeno são fibrilares do tipo I e II¹², onde estão localizados predominantemente e respectivamente no AF e NP. A principal proteoglicana é a agrecana (*aggrecan*), uma PG altamente hidrofílica formada por um alto número de cadeias de sulfato de condroitina e sulfato de queratina. O NP é o principal local onde se encontra a agrecana que, em geral, está associada por meio ligações protéicas com a hialurona, formando assim um grande agregado de proteoglicanas. Além disso, o DIV contém uma pequena quantidade de versicana, uma segunda proteoglicana agregadora e da mesma classe das agrecanas (*large aggregating*), no qual é distribuída predominantemente no AF.

Um número menor de outra classe de PGs denominada “*small leucine-rich proteoglycans - SLRPs*”, nas quais estão incluídas a decorina, biglicana, fibromodulina e lumican¹⁵ fazem parte da parte profunda do AF¹². A função destas PGs é de modular a fibrilogênese do colágeno e, portanto, influenciar na organização e propriedades mecânicas do tecido. Ambos os componentes estão distribuídos de maneira organizada de acordo com a região do DIV e a função que desenvolve.

A maior distribuição de PGs, principalmente de característica hidrofílica, é no NP dos DIVs, enquanto que o Col exerce localização predominante no AF. Sendo assim, o NP é responsável por resistir a forças de compressão, enquanto que o AF proporciona resistência a forças de rotação, translação e distração^{6,79,80}.

O AF é constituído por um grande número de lamelas concêntricas constituídas de Col tipo I, embora sua parte superficial também contenha os Cols tipo III, V e VI. As fibras colágenas, juntamente com os fibroblastos e condrócitos, se organizam paralelamente em cada lamela que, por sua vez, se mantêm organizadas por fibras elásticas entre elas. No entanto, estas lamelas percorrem um sentido contrário entre si, fazendo com que as fibrilas colágenas formem um ângulo aproximado de 120° entre cada lamela adjacente; portanto, essa organização está disposta de maneira oblíqua ao corpo vertebral, o que oferece resistência biomecânica as forças exercidas sobre ele. Ademais, estas fibras penetram o corpo vertebral de maneira semelhante às fibras de Sharpey do periósteo^{17,81}.

Contido profundamente às lamelas do AF está o NP, de estrutura macroscópica amorfa e de aspecto semi-gelatinoso, com distinção clara entre estas duas estruturas na primeira década de vida⁸¹. Essa distinção ocorre devido ao decréscimo gradual de colágeno do AF para o NP, aumento das glicosaminoglicanas/proteoglicanas no NP e perda da estrutura lamelar do AF a medida que se aprofunda no DIV⁷⁸. Todavia, com as alterações biológicas do tecido, na fase adulta essa distinção é perdida, sobretudo na região cervical, pois a região lombar leva mais tempo - aproximadamente na quarta década de vida - para perder essa característica^{75,82}. O NP também é constituído por fibroblastos e condrócitos⁸¹, colágeno tipo II, principalmente, mas também pequenas

quantidades de colágeno tipo VI, IX, e XI¹⁵, fibras elásticas arranjadas radialmente no centro e grande agregados de proteoglicanas (agrecana e hialurona).

A razão entre colágeno tipo II e agrecana é de 1:20 no NP, o que se mostra bastante específico já que na cartilagem articular estes dois componentes revelam razão de 1:2⁸³. Essa evidência expõe a característica hidratada do NP nos DIVs humanos. Além disso, o NP é mantido pelas células em seu interior, que mostram um fenótipo condroide, e que é caracterizado por ser capaz de expressar moléculas da matriz (agrecana e Col II) e sua molécula regulatória Sox9 (*transcription factor Sox9*)⁸⁴. Entretanto, tem sido observadas evidências de que a interleucina-1 (IL-1, *interleukin-1*) é importante na função celular normal do DIV³¹.

Superiormente e inferiormente o AF e NP guardam relação íntima com a denominada placa vertebral (PV), localizada em toda superfície articular dos corpos vertebrais, limitando-se à epífise anular do corpo vertebral. A PV é formada por uma delgada lâmina cartilágnea do tipo hialina, assim como da cartilagem articular, jaz adjacente ao AF e NP, separando-os da placa óssea compacta na periferia do corpo vertebral. Na sua matriz extracelular (MEC) as fibras colágenas estão orientadas paralelamente à placa óssea do corpo vertebral, e numa faixa etária adulta não possui vasos nem nervos em sua estrutura - característica essa comum às cartilagens do tipo hialina³⁴. Suas células estão relacionadas à síntese do tecido fibrocartilaginoso do DIV, já que a sua estrutura é basicamente repleta de condrócitos, sem distinta separação em zonas. Sua relação proteoglicana:colágeno é de 2:1, assim como na cartilagem articular, ou seja, bem inferior ao do NP⁸¹. Sendo assim, a relação AF/NP e suas respectivas PVs superior e inferior são importantes para o equilíbrio no dispêndio de cargas no disco intervertebral, constituindo também importante mecanismo biomecânico da coluna vertebral⁶⁹.

Em contraposição ao classicamente descrito sobre a predominância e localização de colágenos na estrutura do DIV, em 2011 Fontes¹ selecionou discos intervertebrais da região cervical e lombar de indivíduos assintomáticos jovens (<35 anos) e idosos (>65 anos) para o estudo do perfil colágeno dessas amostras. No seu trabalho pode-se observar que os Cols I, II IV e IX (fibrilares) foram detectados em paralelo com as fibras dos DIVs e o III e IV de maneira peri ou intra-celular (em concordância com a literatura)⁸⁵. O Col V foi basicamente expresso na PV dos espécimes. Especificamente, o colágeno

predominante nos discos cervicais e lombares foram o do tipo II. O Col IV também se destacou na região cervical como o segundo mais frequente. Ambos diminuíram no GI cerca de 50 a 70%. Na região lombar o Col II também foi predominante, porém, com significativa redução em comparação à região cervical e, o Col IV, mostrou ser importante constituinte do AF desses discos. Os jovens apresentaram Col IX no NP e Col X no NP e AF posterior. Os indivíduos idosos demonstraram diminuição na expressão de Col III no AF e não demonstraram Col IX e X na estrutura do disco como os jovens.

A vascularização do disco intervertebral é pobre ou inexistente, dependendo da idade do indivíduo. Coventry et al.⁸⁶ relataram, em seu estudo pioneiro, que foi detectada a presença de canais vasculares através da PV em espécimes com até 30 anos. Embora Coventry et al. tenham obtido esse resultado, a maior parte dos pesquisadores concordam que esses vasos são obliterados na primeira década de vida^{6,9,18,34}. Entretanto, sua nutrição continua ocorrendo por meio de difusão através da capacidade de permeabilidade da PV e por pequenos vasos na periferia do AF.

Os DIVs e os LLA e LLP da coluna vertebral são inervados pelos ramos meníngeos do nervo espinal. É a única emergência de ramo nervoso do nervo espinal antes da divisão em ramos anterior e posterior, embora o ramo meníngeo também possa ser originado de um deles. É comum observar dois a quatro ramos bilaterais em cada segmento vertebral. A maioria desses recorre ao forame intervertebral para inervar a meninge e estruturas contidas no canal vertebral, em especial o LLP, o que origina a expressão recorrente, denominando estes ramos como meníngeos recorrentes (na Terminologia Anatômica Brasileira é catalogado apenas como ramo meníngeo). Na literatura internacional o ramo meníngeo é conhecido como ramo sinovertebral, e é assim comumente encontrado nos trabalhos publicados na língua inglesa (*sinuvertebral nerves*).

Alguns ramos meníngeos se mantêm externamente ao canal, percorrendo em sentido anterior à coluna vertebral inervando o periósteo das vértebras adjacentes e as lamelas mais superficiais do AF dos DIVs e LLA⁷¹. Desta maneira, esses ramos externos ao canal vertebral não devem ser chamados de meníngeos, porém, os mesmos também não estão catalogados na Terminologia Anatômica Brasileira.

Testut¹⁶ descreveu a presença de fibras nervosas periféricamente aos ligamentos longitudinais e AF. Estas fibras foram descritas também como ramo meníngeo ou sinovertebral, particularmente aquelas na região posterior do AF e ligamento longitudinal posterior (LLP). Os ramos da região anterior do disco intervertebral e do ligamento longitudinal anterior (LLA) provêm, no segmento lombar, do tronco simpático e de ramos comunicantes em cada nível, onde foram descritas como fibras nervosas finas, livres e amielínicas^{9,87}. Em 1940 Roofe afirmou que estas fibras nervosas possuíam função nociceptiva⁸⁸. Já em 1995, Roberts et al.⁸⁹ revelaram que estas estruturas possuem terminações proprioceptivas. Entretanto, em 2010 Dimitroulias et al.⁹⁰ descreveram que a maior parte dos receptores nervosos relacionados aos DIVs considerados normais são do tipo Ruffini (corpúsculos bulbosos), além de outro "morfologicamente similar" ao órgão neurotendinoso (órgão de Golgi). Esses autores afirmaram que os receptores encontrados são capazes de auxiliar no controle da musculatura envolvida (cinestesia), já que conseguiram relacionar, estatisticamente, o maior número desses receptores na parte anterior dos DIVs L5S1. Além disso, os mesmos discutem que as fibras nervosas livres, detectadas em seu experimento, estão envolvidas com a propriocepção, nocicepção e com o controle vasomotor na região.

Em suma, é consenso na literatura internacional que se faz necessário um balanço entre as proteoglicanas e colágenos presentes nas regiões do DIV para considerá-lo saudável, além de que os mesmos devem ser essencialmente desprovidos de vascularização e de inervação, ressaltando o terço periférico do AF¹⁷.

4.4 Envelhecimento e degeneração do disco intervertebral

Partindo do conceito visto no item 1.2 sobre a sinergia entre as articulações que promovem a menor unidade funcional da coluna vertebral (*three joint complex* ou *motion segment*), já é sabido que existe associação entre a diminuição da altura discal, alterações das propriedades mecânicas da coluna vertebral e aumento de carga nas articulações dos processos articulares. O resultado desse conjunto é a hipertrofia do processo articular (faceta) e ulterior estenose do forame intervertebral, com ou sem compressão dos ramos nervosos emergentes. Desde a publicação dos trabalhos de Schmorl e Junghanns, e Kirkaldy-Willis et al.^{73,74}, já se discutia sobre a riqueza de inervação das articulações dos

processos articulares através de ramos posteriores mediais dos nervos espinais de maneira proprioceptiva e nociceptiva. Contudo, mesmo que essas articulações sejam sinoviais e portanto, possuidoras de razoável estímulo mecânico capaz de aumentar o limiar à dor, essas estruturas são capazes de gerar a denominada "dor facetária", que significa existência de estímulo nociceptivo nessas articulações, perceptíveis ao indivíduo. Essa condição ocorre basicamente quando existe associação entre o aumento de carga e a produção de agentes pró-inflamatórios locais. Naquela época esse conhecimento foi tão propagado e forte, que foi cogitada a eliminação da hipótese sobre a dor discogênica, já que o disco é, em termos gerais, avascular e aneural⁹¹.

Com o passar do tempo os pesquisadores seguiram estudando as características morfológicas dos DIVs retirados de pacientes sintomáticos (DDD), tentando relacionar a gravidade da cervicalgia e lombalgia com a gravidade das lesões morfológicas. Introduzido por Coventry et al.^{86,92}, a avaliação dos DIVs foi além da análise de gravidade do estado discal, e passou a utilizar também a frequência com que apareciam essas lesões. Este mesmo grupo foi capaz de iniciar a descrição das lesões por faixa etária, de 10 meses a 79 anos, dividindo os resultados em décadas. Não obstante, os pesquisadores canadenses Harris e McNab⁹³, em 1954, adicionaram à essas observações sobre o estado discal o elemento temporal, o que ainda vem sendo aplicado na prática clínica. Mesmo assim, por muitos anos têm-se utilizado conceitos e denominações de maneira contraditória e extremamente heterogênea, havendo então a necessidade de uma padronização.

Após muita discussão entre os profissionais, Fardon e Milette⁹⁴ publicaram uma revisão em 2001 onde padronizaram, com auxílio dos colegas clínicos de três grandes sociedades médicas americanas, os conceitos acerca das alterações morfológica dos DIVs, no que concerne a sua morfologia normal, degenerativa e de doença degenerativa discal (DDD). Conceituaram como “normais” aqueles discos livres de alterações morfológicas, ou seja, jovens, ainda que dentro da sua morfologia esta possa ser característica da idade. Os DIVs considerados “degenerados” demonstram características relacionadas à degeneração inclusive em nível celular, mesmo que este possa ser assintomático e/ou comumente visto para idade. Reservaram o termo “doença degenerativa discal” apenas para aqueles que apresentassem condições clínicas de dor atribuídas à degeneração discal.

Essa condição apresenta uma gama de aspectos morfológicos. Coventry et al.^{86,92,95} conseguiram observar e colher as primeiras ideias acerca da dinâmica de mudanças que os DIVs podem sofrer ao longo da. Eles descreveram, numa sucessão de três artigos, as alterações que seriam ditas comuns ao envelhecimento e aquelas que seriam patológicas nos DIVs. Dentre as observações feitas relativamente à morfologia dos discos e à faixa etária estão: o desaparecimento dos canais vasculares oriundos da PV, a progressiva perda da distinção anel-núcleo, substituição do tecido nuclear original por fibrocartilagem, o surgimento de aglomerados de condrócitos na parte profunda do disco, adensamento das fibras que compõem o anel fibroso, hialinização cartilaginosa da placa vertebral, vascularização da porção posterior do anel fibroso, o aparecimento de fissuras no disco e a extrusão (em pequena quantidade) de material nuclear pela placa vertebral, também conhecido como nódulo de Schmorl⁸⁶. Com relação aos achados oriundos de condições anormais ou patológicas, como na degeneração, estão incluídos: surgimento de osteófitos, expansão e inchaço do núcleo pulposo, achatamento discal, protrusões anteriores e posterior (com ruptura total ou parcial das fibras do anel fibroso), presença de nódulos de Schmorl e calcificações do núcleo pulposo⁹². O próprio grupo assume que sua classificação em características do “envelhecimento” ou de uma situação “patológica” não seguiu critérios específicos e que mesmo usando o critério de observância da incidência em seus espécimes, a maior parte das alterações seria classificada como patológicas ou anormais, mesmo que muitas dessas alterações possam ser assintomáticas para o indivíduo.

Com o avançar do tempo vários estudos contribuíram, através de diversos tipos de metodologia, para que se pudesse entender a ligação entre a morfologia do DIV, patologia discal e sintomatologia. Isso se tornou mais evidente após pesquisas que utilizaram ensaios clínicos entre voluntários e pacientes, ensaios intervencionistas e, sobretudo, em imagiologia, onde foi constatado que a sintomatologia não somente é de origem mecânica^{17,96}. Revisado isso, com adições modernas às técnicas de estudo em biologia celular e molecular, as pesquisas tomaram rumos diferentes e uma série de estudos foi desempenhada para entender qual é o evento determinante para dor discogênica, sendo ela oriunda da degeneração ou da idade. Perante este quadro, demasiado número de moléculas se tornaram protagonistas de estudos que buscam veementemente identificar qual(is) delas está(ão) associada(s) aos eventos degenerativos do DIV; esses pontos estão revisados nos próximos subitens desta tese:

4.4.1 O remodelamento da matriz extracelular de discos intervertebrais

Um dado específico sobre a degeneração do DIV é que existe degradação da MEC e alteração de sua síntese, basicamente através da mudança do colágeno tipo II para o tipo I⁹⁷ e diminuição da síntese de agrecana³², tornando o balanço de força e pressão no NP alterado. Esse processo pode se estender e afetar o AF, o que consequentemente vai diminuir espaço entre os corpos vertebrais, ou seja, diminuindo a “altura discal”. Sendo assim, o equilíbrio biomecânico existente entre as forças do NP e do AF fica perdido resultando numa diminuição da tensão no colágeno do AF, alteração das resultantes dos vetores de força na coluna vertebral e promoção de impactos oriundos da carga durante o movimento, levando a microtraumas e dor^{15,98}.

Evidentemente que essas alterações permitirão movimentos e dispêndio de carga anormais, além do aumento dessas em todo o segmento motor, causando lesões traumáticas nas articulações dos processos articulares e demais estruturas. Mudanças similares ocorrem na PV, podendo resultar em microfraturas⁹⁹. Todos estes aspectos são oriundos do distúrbio existente na biologia das células do AF, NP e PV, o que tem sido o foco das pesquisas mais recentes sobre degeneração discal¹⁰⁰. Para tal evento, a matriz extracelular do DIV necessita ser extensamente remodelada, o que decorre de alterações no balanço entre síntese e degradação de cada componente individual desta matriz.

No estado inicial da degeneração, a síntese de colágeno, em geral, aumenta, com um claro aumento do colágeno tipo II no NP, representando um possível significado de mecanismo de reparação¹⁰¹. Com o avanço da degeneração, o padrão de síntese se altera e mais Col tipo II é sintetizado na superfície do AF, o qual forma fortes fibrilas colágenas; não obstante, mais Col tipo I é sintetizado na região profunda do AF e NP desses discos. Além disso, o Col tipo X foi associado a aglomerados de condrócitos e formações de fendas em DIVs degenerados, o que significa atividade celular anormal³⁸. A síntese de PGs também muda com um declínio na produção de agrecana e aumento da produção de versicana, biglicana e decorina. Ademais, a quantidade de fibronectina também aumenta concomitante à diminuição das glicosaminoglicanas (GAGs), em especial a modificação de sulfato de condroitina para sulfato de queratina, o que resulta em menos hidratação do DIV. Todo esse processo ocorre mediado por enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (*matrix metalloproteinases* ou MMPs)¹⁵.

Coletivamente, as metaloproteinases de matriz são enzimas que degradam todo tipo de proteína da matriz extracelular (MEC). Inicialmente foram descritas por Jerome Gross e Charles Lapiere em 1962¹⁰², que durante a metamorfose do rabo do girino observaram uma proteína capaz de degradar as fibrilas de colágeno e que já se demonstrava relevante no processo de reparação. Foi a partir dessa visualização que essa molécula foi originalmente chamada de collagenase intersticial (*interstitial collagenase MMP-1*). As MMPs são proteínas conjugadas com um grupo prostético metálico, zinco-dependentes, compostas por 180 aminoácidos com sequência-sinal N-terminal, que pertencem a uma grande família de enzimas proteolíticas¹⁰³. Essas moléculas são originadas como pró-enzimas, possuindo, entre a sequência e o domínio catalítico, um pró-peptídeo auto-inibidor de cisteína que se liga ao íon zinco no sítio catalítico mantendo-a inativa. Portanto, há necessidade da clivagem proteolítica em receptores da superfície celular ou no meio extracelular para torná-las ativas e posteriormente serem transportadas até substratos específicos da matriz pelos movimentos celulares. Ou seja, quando produzidas ou secretadas pelas células estas moléculas já possuem destino específico. Além disso, a maior parte das MMPs possuem um domínio regulatório C-terminal que influencia na especificidade do substrato¹⁰³. A estrutura das MMPs é bastante conservada na família, haja vista que a maior delas possui um domínio regulatório C-terminal de hemopexina junto com seu domínio catalítico, que confere a sua estrutura quaternária específica em β -hélice, no qual media a interação proteína-proteína. Ademais, este domínio catalítico é composto por cinco folhetos beta e três alfa hélices que denotam ao todo uma topologia esférica para molécula¹⁰⁴.

As MMPs atuam em diversos aspectos do comportamento celular: proliferação, migração (adesão/dispersão) e diferenciação da célula, na angiogênese, na apoptose e na imunidade. Os fatores de crescimento, as citocinas e a própria MEC controlam a produção e ativação destas enzimas nas necessidades de modificação tecidual, assim como o contrário também ocorre. Sendo assim, é consenso de que as MMPs atuam na morfogênese/embriogênese e no reparo tecidual¹⁰⁵.

Com os estudos mais recentes têm-se descoberto várias metaloproteinases de matriz e cada vez mais funções têm sido atribuídas a elas. Embora tenham as suas especificidades, o que não é objetivo deste texto expô-las minuciosamente, uma divisão

do ponto de vista funcional é adequada para traçar correlação entre suas ações e a estrutura do DIV.

As collagenases são capazes de degradar a tripla hélice fibrilar dos colágenos, em especial, já tendo sido demonstrado *in vitro* a sua ação para os tipos I, II e III, através da quebra das pontes entre os aminoácidos glicina e isoleucina ou glicina e leucina¹⁰⁶; estão incluídos neste grupo as MMPs -1, -8, -13, -14, -18.

As gelatinases, MMPs -2 e -9, possuem uma cadeia catalítica contendo três domínios de fibronectina II capaz de mediar ligação com o colágeno neste domínio. Sendo assim, participam principalmente da degradação do colágeno IV e gelatina, como também do colágeno V, VII e X¹⁰⁶.

As estromelisinases são as MMPs capazes de degradar demais proteínas presentes na matriz extracelular, como proteoglicanas, fibronectina, laminina e elastina, além dos colágenos III, IV e V; são membros deste grupo as MMPs -3, -10, e -11¹⁰⁴. Em especial, a MMP-3 é capaz de ativar outras pro-MMPs como pró-MMP-1, -3, -7, -8, -9, e -13¹⁰⁷.

Ainda existe uma classe de MMPs associadas às membranas celulares por um domínio transmembrana ou glicosilfosfatidilinositol (GPI), no qual não são sintetizadas pela via de secreção e recebem a denominação de MT-MMPs (*membrane type MMP's*), como as MMP's -15, -16, -17, -24 e -25¹⁰⁵.

A inativação das MMPs é regulada por um inibidor endógeno, que foi purificado em 1979 como um fibroblasto anti-colagenase (*fibroblast anti-collagenase*) por um grupo de pesquisadores da Universidade de Washington¹⁰⁸. Ulteriormente, em 1985, a sequência protéica foi descoberta por um grupo inglês¹⁰⁹ e a caracterização de sua ação foi ratificada. Os inibidores das MMPs, atualmente conhecidos como TIMP-1, -2, -3 e -4 (*tissue inhibitor matrix metalloproteinase*)¹¹⁰, possuem um peso molecular de 21-34 kDa, onde todos da família contam com 12 aminoácidos de cisteína na sua constituição molecular, formando seis pontes de dissulfeto. Sabe-se hoje que o TIMP inibe as MMPs através da formação de um complexo 1:1 com o zinco catalítico ativado dessas. O contato molecular entre o TIMP e a MMP ocorre na maior parte das vezes através de ligação não-covalente entre os primeiros 5 resíduos amino-terminais da cadeia TIMP (N-terminal) ao local ativo da MMP, assim como ocorre entre a MMP e o seu substrato¹¹¹. Essa ligação

não é sensível ao calor e nem a degradação proteolítica. Assim como as MMPs, os TIMPs são expressos por uma grande variedade de células¹¹⁰. Sendo assim, se torna evidente que a atividade de remodelamento da MEC, seja ela de caráter fisiológico ou patológico, depende da sinergia entre estas duas famílias de proteínas endógenas.

Um dos primeiros estudos a correlacionar o remodelamento da matriz com a degeneração do DIV, utilizando-se de imuno-histoquímica, foi realizado no Japão por Nishida em 1999¹¹². Nesse estudo foi possível observar que o número de células detectadas no experimento para MMP-3 foi maior em discos degenerados e herniados. Seu trabalho também demonstrou que discos com degeneração grave apresentaram mais imunoexpressão do que aqueles que exibiram degeneração leve ou moderada, muito embora o autor não tenha relatado os critérios para essa classificação de gravidade da degeneração em sua publicação. Nos discos herniados, as moléculas de MMP-3 e TIMP-1 foram mais detectadas nas células dos discos extrusos ou sequestrados do que nos protrusos. Ao final, Nishida relata que foi possível notar correlação significativa entre o número de células que expressaram MMP-3 e TIMP-1, de acordo com o progresso da degeneração e/ou herniação. Esse resultado pode sugerir que a MEC está patologicamente sendo reorganizada, em virtude que, tanto a protease ativa do processo (MMP-3), quanto o inibidor dessa (TIMP-1), estão desempenhando o seu papel de maneira sinérgica, porém, num estado fisiopatológico dos DIVs estudados. Supostamente deveria existir um desbalanço representando uma reposição da MEC, ou seja, mais expressão de TIMP-1 do que de MMP-3.

Em outra pesquisa, Roberts et al.³⁹ estudaram 49 DIVs de 46 pacientes (11-75 anos) que sofreram cirurgia (hérnia de disco, espondilolistese e prolapso posterior do DIV) e o grupo controle foi oriundo de 7 cadáveres considerados "normais". Utilizaram de imuno-histoquímica para detectar a expressão de MMP-1, -2, -3, -8, -9 e TIMP-1 e -2 nas células típicas do DIV. Esses pesquisadores obtiveram ao menos uma marcação para alguma MMP e uma marcação para algum TIMP em todas as amostras do estudo, embora tenha havido uma larga variação na marcação, o que os levaram a interpretar esse resultado como uma evidência do processo ativo de degradação e remodelamento no DIV. A MMP-1 foi a protease mais facilmente detectada, enquanto MMP-8 e -9 foram as menos frequentes (38%). A expressão de MMPs em suas amostras foi decrescente entre MMP-1, -2 e -3. Os espécimes que mostravam prolapso do DIV obtiveram mais

marcação, enquanto os cadáveres (normais) obtiveram menos. Muito embora a MMP-8 tenha sido a menos presente nos espécimes, a mesma foi detectada quatro vezes mais nos espécimes com prolapso do DIV do que nos controles e duas vezes mais nos demais espécimes oriundos do grupo cirurgia do que no controle. Esse dado mostra mais uma vez o processo ativo de remodelamento da matriz extracelular de discos intervertebrais humanos. O TIMP-2 foi bastante detectado nos três grupos que sofreram a cirurgia, somando aproximadamente 80% das células contadas. O TIMP-1 foi menos frequente, não pôde ser detectado no grupo normal e foi mais evidente no grupo com prolapso. Esses pesquisadores também relatam que muito pouco foi detectado de MMP e TIMP na MEC, a predominância de imunopositividade foi no meio intracelular de células nativas do DIV, detectadas individualmente ou em aglomerados celulares. Um dado importante deste estudo é que já foi possível observar a discrepância no nível de expressão entre as MMPs e os TIMPs investigados, muito embora a detecção dessas moléculas tenha ocorrido por todo o disco, ou seja, sem uma regionalização na estrutura discal.

Uma correlação entre a maior expressão de MMPs e idade foi demonstrada por Weiler et al. em 2002²⁵. Esses pesquisadores investigaram a distribuição das MMPs, particularmente MMP-1, -2, -3 e -9, em 60 DIVs de várias idades (fetal até 86 anos) e compararam com o grau de degeneração das amostras através de um protocolo histológico⁹⁷. Eles puderam observar que nos espécimes fetais, infantis ou juvenis quase não se obteve marcação para MMP-1, -2, -3 e -9. Notaram que acima dos 15 anos houve aumento da expressão de MMP-1, -2 e -3, entretanto, ocasionalmente de MMP-9 no AF e NP. Fizeram a afirmação de que a presença dessas proteases está relacionada com as fendas presentes no tecido, porém não exclusivamente. O grupo entre 31-60 anos revelou uma ampla marcação para MMP-1, -2 e -3, mas, novamente, pouco para MMP-9. Todavia, no grupo maior de 60 anos o número de células marcadas diminuiu para essas três MMPs, fazendo exceção apenas da MMP-2 no NP, quando comparado ao grupo adulto. Esses autores concluem que existe "levemente" mais imunoexpressão no NP do que no AF destes espécimes e que ainda houve uma correlação maior de detecção da MMP-1 e -2 no AF, além de MMP 1, -2 e -3 no NP dos DIVs com maiores achados histológicos de degeneração.

Mais recentemente, em 2011, Zigouris et al.¹¹³ publicaram um estudo sobre a expressão de MMP-1 e -3 em células de 43 DIVs lombares obtidos de cirurgia em

diversos graus de degeneração e herniação. Dividiram os seus espécimes por idades, sendo o primeiro grupo menor de 30 anos, o segundo com idade entre 30-60 anos e o último com idade maior que 60; divisão essa similar àquela realizada por Weiler et al.²⁵. Observaram que não houve significância estatística quando comparado a idade com o grau de degeneração para nenhum grupo; as mudanças degenerativas, na verdade, foram mais pronunciadas de acordo com a crescente classe de herniação do DIV. O interessante foi o dado relacionado a idade, onde quando comparada a mesma graduação de herniação, a expressão de MMP-1 e -3 foi proporcional com o aumento da idade. Em geral, observaram também que condrócitos com expressão citoplasmática de MMP-1 e -3 foram encontradas em todas as amostras, tanto no AF quanto no NP. No grupo com idade menor de 30 anos houve uma correlação positiva entre expressão de MMP-1 e -3, grau de degeneração e graduação de herniação. No grupo de 30 a 60 anos não houve significância entre expressão de MMP-1 e o grau de degeneração, mas foi visto para expressão de MMP-3. O grupo com mais de 60 anos obteve correlação positiva para todos eles. Em suma, a expressão de MMP-1 e -3 no grupo com menos de 30 anos obteve significante menor expressão comparado com os demais grupos, além de que neste mesmo grupo houve estatisticamente mais expressão de MMP-1 do que de MMP-3¹¹³.

Um destacado grupo de pesquisadores ingleses³², em Manchester, Reino Unido, estudaram 18 DIVs oriundos de autopsias (normais) e de ressecções cirúrgicas (patológicos). Usaram anticorpos para detectar MMP-1, -3, -13, TIMP-1, -2, -3 e ADAMTS 4 (*A Desintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin*), uma enzima específica que degrada agregana. Dividiram as regiões do DIV em partes superficial e profunda do AF e NP, além de utilizarem, para quantificação da imuno-histoquímica, a contabilização de 200 células por campo e por espécime. Como resultado observaram que a marcação foi mais presente no NP e na parte profunda do AF, sem haver diferenças estatísticas entre estas regiões, para MMP-1, -3, ADAMTS-4, TIMP-1 e -2. Já MMP-13 e TIMP-3 foram observadas mais no NP que na parte profunda do AF. Na parte superficial do AF foi encontrado um número menor de marcação comparativamente às outras regiões do DIV.

Ainda sobre esse trabalho, nos discos não degenerados, segundo sua classificação de degeneração histológica¹¹⁴, foram encontradas marcações para MMP-1 e ADAMTS-4,

mas nenhuma marcação para MMP-3 e -13. Poucas marcações foram encontradas nesse grupo para TIMP-1 e -2, mas uma grande imunopositividade foi encontrada para TIMP-3, que é um potente inibidor da agrecanase ADAMTS-4¹¹⁵. Interessante resultado tendo em vista que obtiveram detecção de uma protease específica da agrecanase (ADAMTS-4), acompanhado de aumento do seu inibidor (TIMP-3), entretanto, com ausência de detecção da enzima comum de degradação da agrecanase (MMP-3), o que demonstra, mesmo nestes espécimes considerados não-degenerados, um processo ativo de remodelamento da MEC. Além disso, nos discos considerados degenerados, esses pesquisadores acharam uma correlação entre a graduação de degeneração e a quantificação imuno-histoquímica. Nos discos com grave degeneração, a marcação para MMP-1, -3 e -13, ADAMTS-4, TIMP-1, -2, obteve número similar aos demais degenerados, mas foi significativamente maior do que o visto para os discos não degenerados no NP; no entanto, esse aumento de marcação não foi acompanhado pelo TIMP-3.

Numa discussão mais aprofundada, esse grupo inglês³² demonstra que o grande número de marcação para MMP-1 e ADAMTS-4 sugerem uma ação na homeostase do tecido, mas que muito embora ocorra um aumento na detecção de MMPs, há também um aumento dos seus inibidores endógenos, sobretudo na região mais central do DIV, o que não ocorre nos DIVs considerados degenerados. Vale ressaltar ainda que nesse estudo pode-se observar que, de fato, no processo de degeneração ocorre depleção da proteína mais hidrofílica do DIV, a agrecana e, em destaque, essa investigação mostra a ação específica da sua protease nesse processo, a ADAMTS-4, no entanto, não relaciona o aumento da sua expressão paralelamente com o do seu inibidor, o TIMP-3, o que resulta nesses DIVs uma MEC menos hidratada e suscetível a lesões biomecânicas.

Em um estudo mais funcional, Bachmeier et al. (2009)²¹ fizeram uma busca pelos níveis de expressão das metaloproteinases (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -13) e de seus inibidores (TIMP-1 e -2), em 37 DIVs lombares com conhecida herniação ou degeneração (patológicos) e tiveram como controles dois discos oriundos de trauma. Fizeram análises sobre a expressão gênica, utilizando da quantificação de mRNA (RNA mensageiro) através da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, *real time polymerase chain reaction*), da atividade funcional das metaloproteinases através da zimografia *in situ* e analisaram o padrão de expressão protéica através da imuno-histoquímica. O RT-

PCR mostrou grande expressão gênica para MMP-2 e -3 em discos mais degenerados, ao passo que a expressão de MMP-1 e -13 foi moderada. Com relação a imuno-histoquímica, esses pesquisadores focaram na detecção das MMP-1, -2, -3, e -9, com quantificação de 100 células no AF e NP entre marcadas e não marcadas. Tiveram como principais resultados a alta expressão de MMP-3 (média 65%), o que acompanhou o resultado sobre expressão gênica de mRNA para essa mesma molécula, e também para TIMP-1. A MMP-1 também foi muito detectada (média 55%), enquanto que a marcação para MMP-2 e -9 foram menores (10 e 20% respectivamente). Observaram várias marcações, porém não exclusivas, de MMPs em áreas próximas a fendas. A zimografia *in situ* demonstrou atividade enzimática da MMP-1 e -2, especialmente para MMP-3 e TIMP-1. Portanto, acompanharam os achados já descritos para as outras técnicas. Contudo, ao final do trabalho os autores revelaram que não houve diferença estatística entre o número de células marcadas pela imuno-histoquímica, comparativamente aos resultados de expressão gênica e da zimografia²¹.

Digno de nota também são os estudos onde se analisou a associação das MMPs e TIMPs com o processo degenerativo, utilizando modelos animais e experimentos *in vitro*¹¹⁶⁻¹¹⁹, onde os resultados se mostram similares aos obtidos em experimentos com DIVs humanos.

De maneira geral, a desorganização e diminuição de níveis de PGs e Cols, evidenciados pela maior produção da metaloproteinases de matriz, resultam em perda da integridade estrutural, diminuição da hidratação do DIV e redução da habilidade de resistir carga. Isso gera várias características fenotípicas do disco intervertebral degenerado, já comentadas nessa revisão.

4.4.2 As citocinas pró-inflamatórias e os agentes angiogênicos nos discos intervertebrais

Como visto no subitem anterior (1.4.1), ocorrem mudanças específicas na MEC dos DIVs, oriundas da degeneração de seus componentes. Além dos eventos biomecânicos que influenciam na biologia do disco, a perda de vascularização e, consequente alteração na disponibilidade de nutrientes e fatores de crescimento para as

suas células^{27,120}, propiciam alterações das funções normais desempenhadas por essa estrutura anatômica. Esse processo também resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias capazes de influenciar na atividade celular local²⁶. Dessa maneira, na última década pesquisas vêm elucidando as relações entre as citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios na fisiopatologia da degeneração discal.

A literatura já demonstra que as células nativas do DIV são capazes de sintetizar várias citocinas pró-inflamatórias. São elas, em ordem alfabética: FGF (*basic fibroblast growth factor*), fosfolipase A2, GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulation factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor*), interleucina-1 β (IL-1 β , *interleukine-1 β*), interleucina-6, interleucina-8, interleucina-10, PGE₂ (*prostaglandin E2*), TGF- β (*transforming growth factor*) e TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*)²⁶. De maneira geral, as citocinas são proteínas capazes de modular a função de outras células. Entretanto, a despeito do grande número de moléculas dessa classe, a IL-1 β e o TNF- α , em especial, são os mediadores pró-inflamatórios mais apontados nos estudos sobre a fisiopatologia da degeneração discal e presume-se que ambos têm efeito modulador na ação das moléculas da família das MMPs¹⁷.

A IL-1 foi a primeira citocina a ser descrita na literatura. É um polipeptídeo pequeno, de 17 a 31 kDa de alta atividade e seu descobrimento começou com os estudos da patogênese da febre. Especificamente, a IL-1 desenvolve papel na regulação da resposta imune e inflamatória e induz a apoptose celular. O nome interleucina foi dado pela gama de propriedades biológicas encontradas nos fatores solúveis de macrófagos e linfócitos. Sendo assim, IL-1 foi a designação dada para o produto do macrófago e IL-2 do linfócito. Desta maneira, várias funções foram atribuídas às interleucinas, dentre elas: aumento da temperatura corporal atuando diretamente no hipotálamo (pirógeno endógeno), aumento da expressão de fatores de adesão das células endoteliais, para permitir migração leucocitária, hiperalgesia e regulação da hematopoiese¹²¹.

Em 1985, dois distintos materiais complementares de DNA humano demonstraram replicar sequência protéica similar aos daqueles já pesquisados em ratos, com peso molecular diferente (17 e 31 kDa); sendo assim, foram isolados da biblioteca de DNA complementares de macrófagos, o qual foram designadas em IL-1 α (31kDa) e IL-1 β (17,5kDa)¹²¹. Desses dois, a IL-1 β é a que se mostra mais envolvida nos eventos

degenerativos do DIV^{15,17}. Ambas moléculas são primeiramente sintetizadas como precursores protéicos e depois secretadas. O precursor da IL-1- α , proIL-1- α é ativo (31kDa) e está presente na superfície celular de várias células. A sua forma madura, IL-1 α (18kDa) extracelular, só existe após clivagem pela calpaína, uma protease de cisteína dependente de cálcio capaz de realizar essa ação. O precursor da IL-1- β , proIL-1 β , não se mostra otimamente responsivo antes da sua conversão através da associação entre a caspase-1 e a enzima conversora de interleucina (*ICE, IL-1 β converting enzyme*). Esta associação também pode ser chamada de CASP1/ICE. Sendo assim, as duas interleucinas podem se ligar aos receptores denominados IL-1RI e IL-1RII (*receptor*) para exibir sua função¹²¹. O terceiro membro desta família foi inicialmente chamado de inibidor da interleucina-1 (*IL-1-inhibitor*)¹²¹ e logo após, esta molécula foi renomeada e passou a ser referido como IL-1Ra (*receptor antagonist*), por ser um polipeptídeo concorrente natural nos receptores da IL-1. Em virtude das características supracitadas, no caso de uma infecção/inflamação, todos os membros dessa família são estimulados, modulando assim a resposta interna e externa do indivíduo. Várias células sintetizam as interleucinas. Dentre elas os monócitos, fagócitos, fibroblastos, condrócitos e células dendríticas^{22,31,122}. Embora sejam moléculas de estruturas diferentes, as interleucinas possuem propriedades biológicas muito próximas daquelas conferidas também ao TNF¹²¹.

O TNF é uma citocina pró-inflamatória que atua no estímulo da fase aguda da inflamação, embora seu principal papel seja na modulação da resposta imunológica do organismo. Atua mediando sinais característicos da inflamação, (dor, calor, rubor e edema), assim como é capaz de inibir ou estimular a morte programada da célula, dependendo da via que acessa. O estímulo inflamatório o ativa, assim como a IL-1; dessa maneira, é comum os estudos que em geral observam a relação ou co-dependência dessas duas moléculas no processo de degeneração discal, juntamente com a ação da IL-6^{17,29,37,123,124}.

Há aproximadamente quatro décadas, a linfotóxina (*lymphotoxin*) e o TNF (*tumor necrosis factor*) foram identificados como produtos de linfócitos e macrófagos que causavam a quebra de certos tipos de células, especialmente tumorais (o que originou a sua denominação). Ambas moléculas foram descobertas em experimentos quando testadas as suas capacidades de atacar o fibrossarcoma do rato. Inicialmente foi pensado que o TNF somente era produzido por macrófagos; no entanto sua expressão pode ser

realizada por uma gama enorme de células, no qual os fibroblastos e condrócitos, células constituintes do DIV, estão incluídos^{29,37}.

Ulteriormente, a codificação do cDNA (DNA complementar) da LT- α (*lymphotoxin*) e TNF, com conseguinte clonagem, mostrou que essas moléculas são homólogas, sendo assim se tornaram membros de uma mesma família de gene. Desta maneira, o TNF foi renomeado como TNF- α e a linfotóxina de TNF- β . Logo após foi descoberto que o hormônio caquexina (*cachectin*), que induzia a caquexia, na verdade, também era o TNF. Apesar de sua forma ativa, primeiramente o TNF é sintetizado como uma proteína transmembrana, só sendo liberado do seu sítio após clivagem proteolítica pela enzima de conversão chamada TACE (*metalloprotease TNF alpha converting enzyme*, também chamada de ADAM17)¹²⁵. Da mesma maneira, os receptores para essas proteínas são denominados de TNFR (*TNF receptor*), sendo seus representantes o TNF-R55 ou TNF-R75, ou ainda, em virtude do grande número de receptores nessa família, de (*TNFR*)-*related gene superfamily*¹²⁵. Contudo, as principais funções do TNF- α nos tecidos discais são de aumentar a atividade e expressão gênica das MMPs, estimular outras potentes citocinas pró-inflamatórias, estimular a migração celular, alterar a permeabilidade do endotélio, diminuir a síntese de colágeno e proteoglicanas e, por último, desenvolver a hiperalgesia relacionada a inflamação³⁷.

Alguns estudos demonstraram que a IL-1 não é apenas capaz de induzir as mudanças características na MEC de discos em degeneração^{25,31,32,39,114}, mas sua expressão aumenta durante esse processo sem o aumento concomitante do seu natural inibidor, a IL-1Ra³¹. Além disso, recentemente foi publicado um estudo que evidenciou que camundongos *knockout* para IL-1Ra exibem perda de PGs e da estrutura normal de colágenos dos DIVs, além de aumento na expressão de MMP-3, MMP-7³⁰. Estes trabalhos, juntamente com evidências indiretas de outros, indicam que a IL-1 é uma molécula chave no processo de degeneração discal. Desta maneira, muito embora não se saiba ao certo os meios que levam a desregulação na produção de IL-1, sabe-se que na degeneração ocorre um aumento de sua produção e de suas isoformas pelas células nativas do DIV e uma falha no aumento do seu receptor antagonista, IL-1Ra, o que induz a modificações no tecido como o aumento das enzimas degradadoras da matriz, síntese anormal de agrecana e colágeno tipo II, além de substituição do mesmo pelo tipo I, angiogênese, neurogênese e apoptose de células nativas do DIV^{15,126-129}.

Em 2002, Burke et al.¹²³ não detectaram IL-1 β e TNF- α em nenhum dos DIVs obtidos de 83 pacientes com lombalgia e irradiação neuropática. Entretanto, o estudo de Igarashi et al.²⁹ em 2000 já havia demonstrado *in vivo* que o NP herniado expressa TNF- α e que a administração exógena dessa molécula causa desmielinização da raiz nervosa e consequente dor neuropática. Esta disparidade está especialmente relacionada ao fato de Burke et al. terem utilizado apenas de ensaios bioquímicos para analisar as suas amostras.

Já em 2005, Weiler et al.³⁷ demonstraram através de detecção imuno-histoquímica, a presença de TNF- α em espécimes “normais” (autópsia) e com degeneração (sintomatológicos). Em destaque, a expressão dessa citocina pró-inflamatória também foi visualizada em NP de espécimes fetais/infantis, o que corrobora com a ideia de que o TNF- α está relacionado às modificações fisiológicas do tecido, já que sua expressão foi encontrada próxima aos vasos. Por outro lado, em espécimes adultos, essa citocina foi relacionada estatisticamente com a degeneração³⁷.

Um dado atual relacionando essas duas citocinas foi publicado em 2011 por Wang et al.¹³⁰. Esse grupo foi capaz de analisar células de NP de ratos ditos normais, comparando os seus resultados com células de DIVs humanos oriundos de cirurgia. Observaram que a ativação das duas potentes agrecanases, ADAMTS-4 e -5, depende da presença da IL-1 β e TNF- α . Todavia, esse processo não ocorre diretamente, pois conseguiram constatar que o mecanismo de ativação destas agrecanases, em especial a ADAMTS-5, depende da co-expressão da SDC4 (*syndecan-4*), uma PG presente na membrana celular de condrócitos, fibroblastos e células epiteliais. Esse resultado evidencia mais uma frente de pesquisa e alternativa para proposições terapêuticas à degeneração discal.

Em complementação às frentes terapêuticas, com relação ao estudo da IL-1 β , ensaios terapêuticos já estão sendo realizados com base na administração gradativa do seu natural inibidor (IL-1Ra) em preparados utilizando cultura de células. Os resultados ainda são embriológicos, mas podem ser ditos como favoráveis, tanto com relação à técnica de administração, quanto com a diminuição da degeneração da MEC¹³¹. De maneira mais avançada, hoje nos Estados Unidos da América já existe cerca de 5 opções farmacológicas de terapia anti-TNF sendo analisados em aproximadamente 2 milhões de

pessoas que sofrem com doenças degenerativas osteomioarticulares¹³².

Koike et al.¹³³ sugeriram que a reabsorção da herniação discal ocorre através da vascularização que é necessária para a infiltração de macrófagos e secreção das enzimas proteolíticas como as MMPs, embora já seja sabido que condrócitos e fibroblastos são capazes de expressar essas moléculas em disco intervertebrais cervicais e lombares^{33,34}. Esses pesquisadores se basearam na observação de que discos herniados demonstraram maior expressão de CD68 (*Cluster of Differentiation*, presente em macrófagos) e de CD34 (presente em células endoteliais). Além disso, verificaram que quanto mais ampla for a degeneração da matriz extracelular, maior será a existência de vasos e estímulo angiogênico induzido pelo fator de crescimento do endotélio (*vascular endothelium growth factor* – VEGF).

O VEGF é uma glicoproteína do grupo dos fatores de crescimento produzido por células que estimulam a vasculogênese e angiogênese^{134,135}. No caso das células do DIV, entende-se que o mecanismo que é estimulado seja o da angiogênese, já que o termo se refere aos vasos que se originam de outros já existentes. Essa molécula recebeu denominação de VEGF-A, quando as demais moléculas dessa família foram descobertas; dentre elas: PGF (*placenta growth factor*), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. No entanto, como a ação dessas últimas está extremamente relacionada ao crescimento de vasos na fase embriogênica – vasculogênese – a denominação passou a ser simplesmente VEGF¹³⁴.

Essa glicoproteína atua como principal regulador na angiogênese e sua expressão é regulada positivamente através da hipóxia tecidual. Sendo assim, a cadeia biomolecular de ações para ocorrência de brotos vasculares, como a mitose e migração das células endoteliais, é rapidamente iniciada em resposta à deficiência de oxigênio do tecido. As funções do VEGF incluem: multiplicação e mobilização de células endoteliais, vasodilatação, ação quimiotática para macrófagos e granulócitos e aumento da permeabilidade vascular¹³⁴.

O VEGF é produzido por diversas células, dentre elas estão incluídas as plaquetas, os linfócitos, os fibroblastos, os osteoblastos, e os macrófagos; sua produção foi mostrada como sendo diretamente proporcional a gravidade da lesão. O VEGF atua através da ligação com receptores da tirosina quinase (VEGFRs) na superfície da célula, e depende

principalmente da sobrevivência e diferenciação de moléculas mediadoras de interações célula-célula e célula-matriz extracelular como as cateninas (*catenins*)¹³⁶. Dois são os receptores para essa proteína: Flt-1 e KDR/Flk-1, também denominados de VEGFR-1 e VEGFR-2, sendo esse último o principal mediador das respostas conhecidas por essa glicoproteína^{134,135}.

Perante as características e propriedades do VEGF, já é sabido que o processo de envelhecimento é acompanhado de crescimento vascular na parte superficial do AF⁹⁵ e que a angiogênese é essencial para o crescimento e regeneração de tecidos. Acredita-se que o aumento de carga sobre as estruturas vertebrais seria a razão do crescimento vascular com o intuito de se aumentar a nutrição do DIV, já que esse se torna avascular na primeira década de vida^{6,9,18}.

Os estudos relacionando a expressão de VEGF no DIV foram iniciados quando foi possível denotar a reabsorção de hérnias discais em análises por ressonância nuclear magnética (RNM), o que levou a formulação da hipótese de que esse fenômeno estava ocorrendo em virtude da vascularização regional. A constatação dessa tese ocorreu quando um agente radiopaco foi injetado no sistema circulatório de um paciente e os vasos neoformados puderam ser visualizados na região de herniação discal. A partir daí pôde-se afirmar que esse processo era mediado por neovascularização^{137,138}. Entretanto, até esse momento a ciência apenas conhecia a detecção do VEGF no tecido discal através da imunoexpressão dessa molécula em macrófagos levados ao tecido por ação quimiotática ou a detecção maciça dessa molécula sem direta relação das células nativas do DIV³⁵.

Com o progresso nas investigações, pode-se constatar que o VEGF é capaz de ativar algumas metaloproteinases de matriz como a MMP-3, -9, -12 e -13, através da via fibrinolítica da plasmina¹³⁹. Sendo assim, fica claro que essa glicoproteína também está envolvida no remodelamento do tecido e, portanto, esse dado justifica os estudos que apontavam-no como um grande contribuidor na reabsorção de hérnias discais. No entanto, a dúvida sobre qual a origem do estímulo fisiopatológico estaria predominando, seja a inflamação ou a herniação, ainda não havia sido solucionado^{23,35,133}.

Em 2010 Lee et al.¹²² investigaram a relação do VEGF com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α . Analisaram DIVs oriundos de 25 pacientes com

degeneração discal e estenose foraminal, e realizaram as técnicas de cultura de células, imuno-histoquímica e RT-PCR. Notaram que ambas citocinas induziram a expressão de VEGF nas células do NP. Observaram também que existe relação estatística entre a imunoexpressão de IL-1 β e VEGF. Seu estudo *in vitro* demonstrou que em 22 dos 25 pacientes a IL-1 β foi capaz de estimular, nas células da matriz do NP, a expressão de VEGF e que em virtude disso houve aumento da expressão da proteína PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*). Pelo motivo dessa última molécula estar presente apenas em células endoteliais, esse resultado constata a neovascularização no tecido discal.

Baseado na premissa de que a degeneração do DIV, seja ela pelo fator etário ou através de uma enfermidade, se dá através das cargas mecânicas e dos eventos biológicos que ocorrem em suas células, como a diminuição da característica hidrofílica de sua MEC¹⁸, atualmente acredita-se que a presença de VEGF em amostras de DIVs é oriunda da cadeia inflamatória, em razão da necessidade metabólica da região, ao invés de ser uma consequência da herniação, já que anteriormente achava-se que esse último poderia ser o precursor de angiogênese no tecido discal^{122,133}.

4.4.3 Moléculas neurotróficas e axonogênicas em discos intervertebrais

O uso de anticorpos na detecção de neuropeptídeos propiciou a identificação de fibras nervosas presentes nos DIVs, tanto em modelos animais como em espécimes humanos^{10,11,140}. Em virtude disso, os pesquisadores sugerem que ocorre crescimento de brotos nervosos, sabidamente presentes na periferia do AF⁹⁰, para as regiões mais profundas do DIV, chegando até o NP. Duas neurotrofinas tem sido altamente apontadas na literatura como marcadoras desse evento: o NGF- β (*nerve growth factor- β*) e o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*).

Existem quatro neurotrofinas caracterizadas em mamíferos: NGF, BDNF, NT-3 (*neurotrophin-3*) e NT-4 (*neurotrophin-4*). São sintetizadas como precursores (*proneurotrophins*) e ulteriormente são clivadas proteoliticamente para se tornarem maduras e ativas. Esses peptídeos, em geral, regulam a sobrevivência, desenvolvimento,

função e plasticidade de células neurais¹⁴¹. Os precursores são produzidos por células nativas dos tecidos e a clivagem para maturação da molécula pode acontecer no interior da célula (*Furin* ou proconvertases), ou no meio extracelular (por plasmina, MMP-3 ou MMP-7)¹⁴². A primeira neurotrofina a ser descoberta foi o NGF, a qual exibe suas funções nos neurônios simpáticos e sensitivos. Sua descoberta foi em 1950, mas só foi conferir aos pesquisadores Stanley Cohen e Rita Levi-Montalcini o Prêmio Nobel em fisiologia e medicina em 1986¹⁴³.

O NGF possui dois receptores passíveis de ligação, sendo um com afinidade para todas as neurotrofinas, p75NTR, dito como receptor de baixa afinidade e um específico para forma madura do NGF, o receptor transmembrana tirosina-quinase (TrkA, *tropomyosin-related kinase*). Esse último media sinais endógenos para promover sobrevivência e diferenciação em todas as populações neuronais estudadas até hoje. O NGF também pode ser sintetizado por células nervosas simpáticas e sensitivas (nociceptivas), ou sua presença nessas células pode ocorrer através de captura por endocitose. O transporte dessa neurotrofina pelo axônio vai ocorrer de maneira retrógrada até o corpo neural, utilizando-se dos microtúbulos, para promover a sobrevivência e diferenciação da célula. Sendo assim, na lesão periférica da célula nervosa, macrófagos infiltram a região, como resposta a inflamação, ocorrendo a liberação de citocinas que induzem a produção de NGF pelas células de Schwann, fibroblastos e mastócitos. Esse mecanismo é determinante para o crescimento e ramificação dendrítica nos pontos de lesão, no qual sem esse fator sofreriam apoptose¹⁴⁴.

Da mesma maneira, o BDNF atua nas lesões nervosas de maneira autócrina e parácrina, pode ser transportado de maneira anterógrada e atravessar sinapses para atingir demais corpos neuronais, além de exibir função a partir da ligação no receptor p75NTR ou, especificamente, no seu receptor transmembrana tirosino-quinase (TrkB).

Em 1997, Freemont et al.¹⁴⁰ começaram a estudar a relação entre DIVs sintomático e a axonogênese na tentativa de explicar a origem da dor discogênica. Sendo assim, esse grupo elaborou um experimento utilizando um marcador neuronal geral (PGP 9.5, *protein gene product*), um marcador de axonogênese (GAP43, *gene-associated protein*) e um neurotransmissor com função nociceptiva e autonômica (*substance P*, SP), em amostras obtidas de cirurgias de artrodese lombar e de autópsias. Apesar de terem

detectado alguma marcação para PGP 9.5 na periferia de todos os discos, esses pesquisadores reportaram a existência de marcação para GAP43 e SP apenas nos discos de indivíduos sintomáticos. Foram capazes de sugerir que a maioria das fibras positivas para PGP 9.5 e SP possuem função vasoregulatória, em virtude de terem sido detectadas próximos a vasos neoformados no interior do disco. Segundo esses mesmos autores, as fibras positivas para GAP43 estenderam-se até a porção interna em 41% dos casos e, supostamente, estariam envolvidas com remodelamento discal e nocicepção aberrante¹⁴⁰. Esses primeiros resultados estimularam novas pesquisas, sobretudo com utilização de métodos funcionais, como estudos *in vitro*, para relacionar a presença de neurotrofinas em células nativas do DIV como preditores da axonogênese.

Esse mesmo grupo de pesquisa continuou suas investigação e revelou, em outro trabalho, que 18 dos 21 DIVs considerados degenerados em sua pesquisa, apresentaram o PGP9.5 e a neurotrofina NGF- β de maneira satélite aos microvasos. A maior parte desses vasos relacionados a esses neuropeptídeos adentravam o DIV pela PV. Concluíram que esses filetes nervosos são amielínicos e que somente crescem em áreas onde ocorre estímulo pelo NGF- β ¹⁹. A pesquisa de Lee et al.¹²² corroborou com esses achados afirmando que o NGF- β e a neurotrofina BDNF estimularam a expressão de PGP9.5, ou seja, de crescimento de neurofilamentos *in vitro*¹²².

Outro estudo *in vitro* foi perspicaz em observar que essas duas neurotrofinas são capazes de mediar a relação das célula do NP com o neurônio pseudounipolar do gânglio nervoso da raiz dorsal do nervo espinal, sendo possível, desta maneira, controlar o crescimento de nervos para o interior do disco intervertebral. Além disso, nesse mesmo experimento, Yamauchi et al.¹⁴⁵ observaram que as neurotrofinas induziram a co-expressão de substância P, ou seja, de estímulo nociceptivo nas células do NP de discos degenerados.

Purmessur et al., em 2008²⁰, também integrantes do grupo inglês, estudaram os efeitos da IL-1 β e TNF- α na DDD, comparando seus resultados com a imunoexpressão das neurotrofinas BDNF e NGF- β . Esses pesquisadores puderam afirmar que a IL-1 β estimula a expressão de NGF- β e BDNF, assim como outros autores^{146,147}. Observaram que em 40% dos indivíduos sintomáticos foi possível detectar o BDNF na parte profunda do AF, porém, numa proporção muito menor no NP e que quanto maior a degeneração do

disco maior é a expressão desses neuropeptídeos, mostrando assim a correlação entre degeneração discal e a imunoexpressão de neurotrofinas. Por outro lado, Gruber et al.¹⁴⁸ constataram que, além de ocorrer expressão de BDNF nas células nativas dos DIVs, essa neurotrofina foi estatisticamente mais expressada na parte superficial da estrutura, assim como do seu receptor (BDNF-*tropomyosine receptor kinase*, *TrkB*) e muito pouco na parte profunda do DIV.

Uma série de outros autores têm realizado experimentos específicos e publicado dados relevantes sobre a interação entre o processo de axonogênese, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular discal^{149–152}. Sendo assim, a despeito da grande concentração fisiológica de proteoglicanas a base de sulfato de condroitina, como a agregana, esses autores sugerem que essas moléculas atuam como agentes preventivos e inibidores para o crescimento neural e vascular. Suas evidências estão baseadas em estudos *in vitro* utilizando-se de discos degenerados, com conhecida depleção de agregana e outras proteoglicanas, aos quais demonstraram perda dessa inibição. Entretanto, assim como a angiogênese ocorre mediante um complexo processo, a axonogênese necessita de uma série de moléculas que estão relacionadas com o estímulo de crescimento de nervos (NGF- β e BDNF), bem como fatores que inibem e, portanto, direcionam esse processo especificamente, já que o crescimento nervoso tem capacidade de navegação extremamente acurada nos órgãos e tecidos¹⁵³.

Partindo deste dado, num estudo contendo metodologia moderna de RT-PCR, foi demonstrado a alta expressão da Sema3A (*Semaphorin 3A*) na parte superficial de DIVs saudáveis¹⁵³. Essa molécula, formalmente conhecida como *collapsins*, faz parte de uma grande família de polipeptídeos responsáveis por guiar o processo de crescimento axonal, já que atuam como um quimiorrepelente para o desenvolvimento neural¹⁵⁴. Em virtude disso, Tolofari et al.¹⁵³ além de publicarem esse primeiro resultado, também observaram que nos discos degenerados essa molécula se mostrou significativamente menor, nesta mesma área estudada do DIV, embora os aglomerados celulares no interior do NP tenham revelado forte expressão. Esses pesquisadores identificaram a menor expressão de Sema3A com a maior presença de PECAM-1 e PGP9.5 nas amostras oriundas de pacientes pré-operatórios no qual sofriam de lombalgia, e justificaram esse resultado com base na já existência de fibras nervosas nas amostras.

Mais recentemente, em 2012, utilizando-se da técnica de cultura de células, Richardson et al.¹⁵⁵ demonstraram que mediadores solúveis liberados pelas células do NP de discos não degenerados são capazes de inibir o crescimento de filamentos nervosos para o interior do disco. Anteriormente a esse trabalho, Johnson et al.¹⁵² já haviam observado, através da mesma técnica, que as células do NP de DIVs degenerados são capazes de expressar neurotrofina; entretanto, o estudo de Richardson foi além: esses pesquisadores puderam constatar que além dessas células inibirem o crescimento de filamentos nervosos para o interior do DIV, a célula do NP retirada de DIV degenerado estimula essa ação, sugerindo que as mesmas são capazes de modular o crescimento nervoso e que a degeneração discal é o evento primordial para o fenômeno de neo-inervação¹⁵⁵.

Numa análise resumida pode-se afirmar que o BDNF é o neurotrófico mais relacionado com a sensibilidade nociceptiva no DIV¹⁵⁶, uma vez que o NGF- β foi detectado em altos níveis nessa estrutura¹⁹; que a IL-1 β tem o papel modulador na expressão dessas neurotrofinas¹⁴⁶ e que o TNF- α pode ter um papel regulador do estímulo nociceptivo²⁰.

5 MÉTODOS

5.1 Obtenção dos espécimes e formação dos grupos experimentais

Foram utilizados espécimes oriundos do biorrepositório do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFACC, ICB/USP), adquiridos originalmente pelo Dr. Ricardo Bragança de Vasconcellos Fontes para utilização em sua tese de doutorado¹, a qual foi orientada pelo Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti. Esses espécimes foram registrado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH 143.11- ICB/USP), liberado para utilização através do parecer 1009 de 22/08/2011. Como complemento, atendendo às exigências contidas nas normas que regem o Programa de Fisiopatologia Experimental da FMUSP, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa instituição (certificado 007/2012, de 08/02/2012).

Segundo as informações de origem das peças contidas no biorrepositório do LAFACC, os espécimes foram obtidos de cadáveres rotineiramente submetidos à autópsia no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital do Estado de São Paulo (SVOC/SP), lotado na Faculdade de Medicina da USP. Para a sua utilização, foi necessário o consentimento dos familiares através de termo especificamente elaborado para esse fim, onde é manifestada a concordância pelos mesmos da extração de espécimes para pesquisa. De posse desse documento, procedeu-se uma entrevista específica com os familiares a respeito do histórico médico do doador, sendo excluídos da pesquisa aqueles que, nas regiões de interesse (cervical e/ou lombar), haviam sido submetidos a intervenção cirúrgica ou sofrido traumas, apresentavam doenças neoplásicas ou reumatológicas e deformidades evidentes, ou história de dor localizada ou referida em trajeto radicular. Desta forma, foi possível estabelecer dois grupos etários (**Tabela 1**):

- Grupo Jovem (GJ), formado por indivíduos com idade inferior a 35 anos; e
- Grupo Idoso (GI), com os indivíduos exibindo idade acima de 65 anos.

Tabela 1 - Características antropométricas dos indivíduos constituintes do GJ e GI. A idade está representada em anos, o gênero como masculino (M) e feminino (F), a altura em centímetros e o peso em kilogramas.

Número SVOC do espécime	Idade	Gênero	Altura	Peso
<u>Grupo Jovem</u>				
300/08	33	M	168	65
314/08	34	M	175	75
479/08	33	M	160	75
2780/08	34	M	180	75
2781/08	27	M	170	60
2788/08	29	F	162	70
6040/08	34	M	180	85
9386/08	32	F	170	70
11243/08	26	M	185	80
11250/08	29	M	180	65
1767/09	34	F	165	45
4410/09	32	M	180	88
4413/09	32	M	170	49
5050/09	34	F	162	106
5091/09	34	M	182	80
<u>Média Grupo Jovem</u>	<u>31,8</u>		<u>172,6</u>	<u>72,53</u>
<u>Grupo Idoso</u>				
320/08	85	M	178	75
321/08	80	M	170	50
323/08	66	F	165	65
478/08	67	M	180	120
482/08	71	F	155	40
2786/08	68	M	165	60
2787/08	86	M	165	65
2789/08	76	F	162	70
2790/08	89	F	155	66
5981/08	79	F	160	65
6042/08	71	M	180	75
8354/08	79	F	160	40
8356/08	83	M	180	110
8358/08	81	M	165	80
4411/09	91	F	150	45
<u>Média Grupo Idoso</u>	<u>78,1</u>		<u>166,0</u>	<u>68,4</u>

FONTE: adaptado de FONTES RBV, 2011¹.

O procedimento para obtenção dos espécimes inicialmente ocorreu com uma incisão biacromial atravessando a base do pescoço, onde foi dissecado cuidadosamente a parte superficial rebatendo a pele, tela subcutânea e músculo platisma, e todo o conteúdo do triângulo anterior do pescoço bilateralmente, até a retirada do conteúdo do compartimento visceral do pescoço, permitindo a observação anterior da parte cervical da coluna vertebral. Sendo assim, localizou-se o arco anterior do atlas e dente do eixo, para então, com auxílio de osteótomo, bisturi e pinça anatômica desarticular os processos articulares e ressecar as inserções dos músculos nas vértebras. Esse procedimento possibilitou a retirada de um bloco entre a quarta e a sexta vértebras cervicais (C4-C6), incluindo os seus discos intervertebrais C4C5 e C5C6.

Feito isso, a dissecação da parede ântero-lateral do abdome através de laparotomia longitudinal mediana foi realizada para se obter acesso à cavidade peritoneal. Sequencialmente foi realizada a celiotomia, afastamento do intestino delgado súpero-lateralmente à direita, abertura do peritônio parietal posterior para acessar o retroperitônio e, com dissecação minuciosa, foi feito o deslocamento da aorta e veia cava inferior, vasos ilíacos comuns, tronco simpático e ureteres, para assim se obter livre acesso anterior ao segmento lombossacral da coluna vertebral. Após a visualização da região alvo do estudo, a ressecção dos músculos e a osteotomia da asa do sacro foram realizadas a fim de se obter um bloco contendo da quarta vértebra lombar até a primeira vértebra sacral (L4-S1), juntamente com seus respectivos discos intervertebrais L4L5 e L5S1.

Ao final da coleta, cada grupo (GJ e GI) foi constituído por 30 DIVs cervicais e 30 DIVs lombares, que foram inicialmente avaliados macroscopicamente.

5.2 Análise macroscópica

Esse tipo de análise fundamentou-se na revisão sistemática publicada por Kettler e Wilke em 2006⁴⁴. Estes autores testaram 22 escalas para degeneração discal do segmento lombar e 10 escalas para degeneração do segmento cervical, utilizando avaliação inter e intra-observador através dos índices estatísticos de *Kappa* e o *Intraclass Correlation Coefficient*. Muito embora esses pesquisadores tenham revelado que não existe uma escala específica para o segmento cervical de ampla confiabilidade, a escala morfológica criada pelo grupo de anatomistas canadenses liderado por J.P. Thompson (1990)¹⁵⁸ foi eleita a mais confiável escala morfológica para ser utilizada em estudos sobre o DIV lombar, podendo também ser utilizada em estudos do segmento cervical, já que seus critérios não incluem nenhuma característica anatômica exclusivamente lombar (**Tabela 2**).

Na aplicação dessa escala são avaliadas quatro áreas do conjunto disco/corpo vertebral (NP, AF, placa vertebral e corpo vertebral), de acordo com os aspectos morfológicos. A graduação varia de 1 a 5 em ordem crescente de alterações encontradas em indivíduos, sendo 5 o maior grau de degeneração e 1 o menor. A avaliação ainda seguiu as recomendações referenciadas por Kettler e Wilke¹⁵⁷, onde a pior classificação de um subgrupo justifica a inclusão deste disco em uma categoria geral mais deteriorada⁹².

Tabela 2 – Escala de Thompson para avaliação morfológica dos discos intervertebrais.

Grau	Núcleo Pulposos (NP)	Anel Fibroso (AF)	Placa Vertebral (PV)	Corpo Vertebral (CV)
I	Proeminente, com aspecto gelatinoso	Discretas lamelas fibrosas	Espessura uniforme da cartilagem	Margens arredondadas
II	Tecido fibroso e esbranquiçado perifericamente	Material mucinoso entre as lamelas	Espessura irregular	Margens pontiagudas
III	Tecido fibroso consolidado	Infiltração extensa de material mucinoso: perda da distinção AF e NP	Defeitos focais na cartilagem	Margens com início de condrófitos ou osteófitos
IV	Fissuras paralelas à PV	Lacerações focais	Extensão da fibrocartilágnea do osso subcondral: irregularidade e esclerose focal no osso subcondral	Osteófitos < 2mm
V	Fissuras se estendendo através do NP e AF		Esclerose difusa	Osteófitos > 2mm

FONTE: adaptado de THOMPSON et al., 1990¹⁵⁸.

Sendo assim, os conjuntos vertebrais já no laboratório, foram seccionados no plano sagital mediano e avaliados segundo a graduação da escala de Thompson (Th)¹⁵⁸ ainda frescos (**Figura 1**).

FONTE: adaptado de FONTES RBV, 2011¹.

Figura 1 - Metodologia de análise macroscópica. Em **A** observa-se a fotografia da vista superior do bloco vertebral lombar após a remoção. Ao lado pode-se observar a vista medial do bloco vertebral cervical em **B**, e lombar em **C**, após secção sagital mediana secção (linha amarela, **A**). Após realizada secção, os discos intervertebrais contidos neles foram examinados pela face medial a fim de se classificar o grau de degeneração segundo a escala de Thompson.

5.3 Descalcificação dos espécimes

Após fixadas em solução de formalina a 10% por pelo menos 72 horas, a metade direita dos discos intervertebrais foi descalcificada segundo um protocolo realizado em duas etapas. Assim, inicialmente as peças foram imersas em solução de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 0,25M por 90 dias ininterruptos.

Findo esse período, realizou-se em cada espécime um corte paramediano, a fim de se obter uma fatia de aproximadamente 0,5 cm, contendo todas as estruturas discais no sentido ântero-posterior. Em seguida, os DIVs foram segmentados, através de cortes frontais, nas partes anterior (A) e posterior (P), para os discos cervicais, e nas partes anterior (A), média (M - correspondente ao núcleo pulposos) e posterior (P) para os discos lombares. Com esse procedimento, obteve-se para cada cadáver de cada grupo (GJ e GI) **10 peças** identificadas como C4A e C4P; C5A e C5P; L4A, L4M e L4P; e L5A, L5M e L5P, que foram submetidas à segunda fase da descalcificação, por imersão em EDTA 0,5M por 5 dias. A **figura 2** ilustra as regiões delimitadas para a obtenção das partes dos discos intervertebrais.

FONTE: adaptado de FONTES RBV, 2011¹.

Figura 2 - Metodologia de descalcificação dos espécimes e obtenção das peças (ou partes) de um disco intervertebral. Pode-se observar a face superior dos blocos vertebrais após a remoção. A linha amarela demonstra a orientação das secções pelo plano sagital mediano, ao qual foi utilizada para avaliação da escala de Thompson nos segmentos cervicais (A) e lombares (B). A linha verde representa o corte paramediano que foi limitante para retirada das peças, enquanto que a linha preta registra os cortes frontais que orientaram a separação das amostras em anterior e posterior nos discos cervicais (C4A e C4P; C5A e C5P) e anterior, média(*) e posterior nos disco lombares (L4A, L4M e L4P; e L5A, L5M e L5P).

5.4 Microscopia de luz

As partes de cada disco, devidamente identificadas, foram colocadas em formas apropriadas, onde foi inserido o meio de inclusão biológico para congelamento (*Tissue freezing medium*®, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), sendo em seguida acondicionado em um criostato a -25° Celsius (Leica Microsystems CM1850, Wetzlar, Alemanha - LAFACC). Após homogeneização do congelamento no criostato, os blocos foram submetidos a cortes sagitais semi-seriados de 10µm de espessura, alocados em lâminas previamente preparadas com 3-aminopropiltietoxi-silano (Sigma Chemical, Saint Louis, MO, EUA).

Secções realizadas em três cadáveres por grupo, escolhidos de maneira aleatória, foram submetidas à técnica de coloração por hematoxilina e eosina para o estudo das características morfológicas gerais do tecido discal de acordo com as faixas etárias utilizadas. Estas lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol e xilol e montadas com Permout (Mounting Medium, Fischer Scientific, SP15-500, Waltham, MA, EUA) e lamínula.

Com intuito de proporcionar maior confiabilidade aos resultados, foi elaborada nessa etapa uma metodologia de mascaramento antecipadamente à fase de reação imuno-histoquímica. Desta maneira, foi eleito um pesquisador do LAFACC, o qual não fazia parte desta pesquisa, para realizar dentro de cada grupo (GJ e GI) uma divisão aleatória e equitativa dos espécimes em 3 subgrupos. Esse critério impediu que o pesquisador principal do projeto identificasse o grupo ao qual pertencia o espécime, como também, a sua classificação na escala de Thompson. O procedimento foi mantido até o momento de análise dos dados para tratamento estatístico.

5.4.1 Técnica Imuno-histoquímica

Com base em literatura específica^{20,32,39,122}, foram selecionados 9 anticorpos, sinalizadores de estados fisiopatológicos de uma determinada estrutura, no caso da presente pesquisa, os DIVs. Esses anticorpos primários foram adquiridos por meio comercial através de empresas respeitadas no segmento de investigações biomédicas (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA; Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA; R & D System, Minneapolis, EUA). Além disso, todo esse material biológico foi cuidadosamente selecionado, dentre as diversas opções existentes hoje, tendo chegado, ao final, apenas à escolha daqueles anticorpos com taxa de pureza superior à 95%, de acordo com os fabricantes.

Segundo a bula disponibilizada por essas empresas, todos os anticorpos foram certificados com relação ao seu peso molecular através da espectrometria de massa ou da técnica de eletroforese (*Western Blot*). Ademais, para efetiva comparação imuno-histoquímica e análise quantitativa, tomou-se especial atenção em selecionar anticorpos monoclonais contra-humano originados de uma única espécie, que no caso foi o rato, garantindo-se assim um único sistema de ligação com o anticorpo secundário. O detalhamento das características de cada anticorpo, código do fabricante, clone, diluição, substrato e forma de reconhecimento estão dispostos na (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Características das moléculas e anticorpos primários utilizados no estudo.

Substância					Molécula (anticorpo)		
Sigla	Nome	Gene humano	Peso da molécula	Substrato/Função	Fabricante	Diluição alvo	Deteção forma
MMP-1	Colagenase-1	11q22.3	52kDa	Degradação dos colágenos I, II e III.	Santa Cruz® sc-21731	1:50	Ativa
MMP-2	Gelatinase A	16q13	72 e 63 kDa*	Degradação dos colágenos IV, V, VII e X, além da gelatina 1.	Santa Cruz® sc-71595	1:50	Latente e ativa
MMP-3	Estromelisin-1	11q22.3	57kDa	Degradação dos colágenos II, III, IV, V, X, proteoglicanas, elastina, fibronectina, laminina e ativar outras pró-MMPs.	Santa Cruz® sc-80202	1:50	Ativa
TIMP -1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>	Xp11.3-p11.23	22kDa	Inibidora da MMP-1, -2, -3 e -4.	Santa Cruz® sc-80365	1:50	Latente e ativa
IL-1 β	<i>Interleukin-1 β</i>	2q13	31 e 17 kDa*	Citocina reguladora da resposta imune e inflamatória. Atua na ativação de linfócito, T, B e de célula NK (<i>natural killer</i>). Importante na proliferação, diferenciação e apoptose.	Santa Cruz® sc-130323	1:50	Latente e ativa
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor – α</i>	6p21.33	26 e 17 kDa*	Citocina que modula respostas imunes e inflamatórias, além de estimular apoptose.	Santa Cruz® sc-130349	1:50	Latente e ativa
VEGF -A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	6p21.1	21 e 42 kDa*	Glicoproteína que atua especificamente no desenvolvimento de células endoteliais.	Santa Cruz® sc-57496	1:50	Latente e ativa
NGF- β	<i>Nerve Growth Factor – β</i>	1p22.1	27 e 13 kDa*	Proteína neurotrófica relacionada com o desenvolvimento, suporte e diferenciação de neurônios sensitivos, simpáticos e periféricos, regulação positiva da axonogênese e de funções neuronais mediadas por dor e inflamação.	Sigma Aldrich® N3279	1:100	Ativa
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>	11p14.1	32 e 14 kDa*	Proteína neurotrófica envolvida na axonogênese, crescimento dendrítico e de sinapses, manutenção de subpopulações neuronais e neuroplasticidade.	R&D System® MAB248	25 μ g/ml ou 1:100	Ativa

Respeitando-se as características funcionais e biomoleculares dos anticorpos, em cada grupo experimental (**GJ** e **GI**), os mesmos foram incluídos em subgrupos específicos. (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Relação dos subgrupos experimentais e dos agrupamentos de anticorpos testados em cada um deles.

Denominação	Anticorpos	GJ	GI	Número de espécimes	Total de DIVs
Subgrupo 1	MMP -1, -2, -3 e TIMP-1	5 espécimes	5 espécimes	n=10	40 DIVs
Subgrupo 2	IL-1 β , TNF- α , VEGF	5 espécimes	5 espécimes	n=10	40 DIVs
Subgrupo 3	BDNF e NGF- β	5 espécimes	5 espécimes	n=10	40 DIVs
Total espécimes		15	15	n=30	120 DIVs

O método imuno-histoquímico selecionado foi o indireto, para se conferir específica imunoexpressão, utilizando-se da detecção do polímero HRP (*horseradish peroxidase* – EnVision Flex, K8012, DAKO, Carpinteria, EUA). Com relação a essa decisão, o método de detecção avidina–biotina não foi optado pelo fato da avidina ser uma glicoproteína com ponto isoeletrico específico, o que a deixa propensa a executar ligações não específicas aumentando os artefatos da técnica. Além disso, o reagente ligante presente no kit comercial utilizado (EnVision, Dako), é capaz de amplificar a visualização do anticorpo primário em torno de 4-5 vezes¹⁵⁹, facilitando a ligação do anticorpo secundário. Sendo assim, esses elementos formam um complexo de alta afinidade de maneira específica através de ligação não-covalente^{159,160}. Essa escolha foi devesas importante, pois nos trabalhos consultados pôde-se constatar a característica tênue da imunoexpressão dessas moléculas no tecido discal^{20,32,39,122}.

O protocolo foi adaptado de pesquisas prévias^{14,20,148} e de informações técnicas do fabricante¹⁵⁹. Desta maneira, todos os experimentos foram agrupados por anticorpo primário, impedindo assim a contaminação cruzada dos tipos diferentes de anticorpo.

Durante todas as reações foram realizados dois controles negativos por experimento (por anticorpo): um controle duplo-negativo (sem anticorpo primário nem secundário, doravante aqui denominado 00) e um controle simples-negativo (apenas sem anticorpo primário, denominado 0AC2). Desta maneira, pode-se controlar o experimento para marcação de fundo (ou *background*), como também o estudo de alguma marcação de outra natureza que por ventura pudesse ocorrer. No controle duplo-negativo foi investigado fatores inespecíficos de marcação (por exemplo, presença de peroxidase endógena ou superexposição ao cromógeno), enquanto que o controle simples negativo se investigou a marcação inespecífica pelo anticorpo secundário (que seria a mais semelhante à marcação real pelo anticorpo primário). Estas etapas foram especialmente importantes quando da quantificação da marcação.

Em virtude da utilização de cadáveres humanos, fixados em formalina e estudados após descalcificação e cortes de congelamento, infelizmente não existe possibilidade de se reproduzir um controle positivo ótimo. Até mesmo na literatura é difícil achar o padrão ou detalhamento das imunomarcações dessas moléculas, o que configurou trabalho adicional no projeto piloto para se estabelecer o protocolo experimental. Os trabalhos publicados pelo grupo inglês orientado por JA Hoyland são os que mais se aproximam do observado em experimento^{20,36,114}.

A técnica foi executada em dois dias denominados *etapa 1* e *2*. Sendo assim, na *etapa 1* as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida, lado-a-lado e equalizadas em temperatura ambiente, procedendo-se a primeira lavagem com solução de tampão fosfato-salino Tris-PBS (*phosphate buffered saline*) com Tween 20 (20x, diluído em 1:20) em pH 7,6 por 5 minutos, para em seguida bloquear a peroxidase endógena do tecido com solução específica (PBS com peróxido de hidrogênio, 15mmol/l de azida de sódio (NaN₃) e detergente por 10 minutos) seguido de lavagens em Tris-PBS (3 x 3 minutos). Em destaque, segundo o fabricante (DAKO), essa solução de bloqueio dispensa outros bloqueios, como por exemplo o preparado para bloquear resíduos formólicos.

Logo após foi realizado o desmascaramento antigênico (pré-tratamento) com solução de pepsina a 0,4% em HCl (ácido clorídrico) a 0,01N por 30 minutos, por se tratar de material previamente formolizado. Em seguida procedeu-se com lavagens em Tris-PBS e incubação do soro de cabra (1,5% diluído em PBS) por 60 minutos. O soro de

cabra foi adotado por ser tratar do modelo animal utilizado para produção do anticorpo secundário; sendo assim, essa fase evita ligação inespecífica do anticorpo secundário. Desta maneira, as amostras foram incubadas com anticorpos primários, respeitando a sua disposição no subgrupo determinado sendo, no final da primeira etapa, armazenados em refrigerador a 4° C por pelo menos 12 horas.

No *etapa 2* essas lâminas foram lavadas com Tris-PBS para possibilitar a incubação de solução para específica ligação com o anticorpo secundário (*LINKER*) por 30 minutos, com ulterior lavagem. Para identificação do complexo antígeno-anticorpo foi feita a incubação por 20 minutos da solução de peroxidase HRP, no qual consistia de dextran (polissacarídeo como principal substrato), anticorpo secundário produzido em cabra e peroxidase HRP. Ao final foi realizada a etapa de revelação das marcações com incubação do cromógeno por 1 minuto em 3,3' diaminobenzidina (DAB) e lavagem em Tris-PBS 3 x 2 minutos. Sendo assim essas lâminas passaram por uma desidratação em série crescente de etanol (EtOH 95% 2x5min; EtOH 100% 2x5min) e xilol (2x5min), para serem montadas com Permount (Mounting Medium, Fischer Scientific, SP15-500, Waltham, MA, EUA) e lamínula.

5.4.2 Análises qualitativa e quantitativa

A **análise qualitativa** foi procedida em microscópio convencional, trinocular e de bancada (Olympus AX70, Tóquio, Japão – Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo), acoplado a um sistema digital de aquisição de imagem (câmera ERc 5s e Axiovision 6.3, Carl Zeiss, Jena, Alemanha - UFES). Os aspectos morfológicos gerais do tecido foram analisados com as amostras coradas em HE e por método comparativo entre GJ e GI.

As lâminas que sofreram reação imuno-histoquímica foram analisadas seguindo o observado na literatura^{19,37,161} e por método comparativo para detectar as seguintes características (**Figura 3**):

- 1) Localização da marcação na célula;
- 2) Localização da marcação na estrutura discal;
- 3) Proximidade com lesões histológicas.

Figura 3 - Representação da análise qualitativa. Observar em **A** a imunoexpressão no citoplasma da célula localizada na placa vertebral e a densidade de células no campo de estudo. Nota-se em **B** aglomerado celular demonstrando imunopositividade próximo a fissura ou fenda (*). Verificar em **C** a imunoexpressão de VEGF nas células localizadas profundamente no arranjo ou trama fibro-colágena do DIV. Em **D** percebe-se a marcação citoplasmática e também na matriz extracelular de TIMP-1.

A metodologia da quantificação (**análise quantitativa**) consistiu na obtenção de 10 fotomicrografias apenas em campos ou áreas imunopositivas, entretanto, sujeito ao acaso de obtenção dessas áreas, sob objetiva de 100x, de cada **peça** (item 5.3), de acordo com as seguintes etapas:

- 1) As imagens foram acessadas no programa computacional denominado ImageJ 1.44 (*National Institutes of Health*, Estados Unidos, disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>);
- 2) Foi realizada uma separação da imagem em três canais de cor RGB (*red-green-blue*), sendo assim um canal escolhido com maior distinção entre a marcação e o fundo/artefato, gerando assim uma imagem em tons de cinza;
- 3) Na sequência, foi estabelecido o valor mínimo (*threshold*) para constituir marcação positiva;
- 4) O programa responde, após essa determinação, com um valor em termos de percentual de área marcada para aquela imunoexpressão conferida no valor mínimo.

A **Figura 4** ilustra passo-a-passo as etapas do processo de quantificação.

Figura 4 – Representação esquemática das etapas do protocolo de quantificação da imuno-histoquímica.

Foram ainda fotomicrografadas e avaliadas as lâminas dos controles 00 e 0AC2 por cadáver e reação, para que houvesse modo de contabilizar também o artefato de fundo

gerado pela técnica imuno-histoquímica (controle duplo-negativo) e por eventual marcação inespecífica do anticorpo secundário (controle simples-negativo).

Ao final do protocolo de quantificação aproximadamente 10.800 medidas foram realizadas para obtenção da porcentagem de área da imunoexpressão (**Anexo A**).

5.5 Tratamento estatístico

A metodologia estatística foi conduzida sob nível de significância de 0,05⁴⁸. Os dados tratados estatisticamente foram: idade, graduação da escala de Thompson, e porcentagem da área marcada na imuno-histoquímica. Decidiu-se adotar testes paramétricos com variáveis contínuas, como o teste *T* de Student ou ANOVA (*Analysis of Variance*), para se obter maior rigor científico, já que com exceção da escala de Thompson, todas as outras variáveis são de natureza contínua, porém, podendo-se obter valores extremos (**Anexo B**).

Para análises simples, envolvendo apenas dois grupos (idade, parâmetros antropométricos e análise da área marcada quando comparando **GJ** contra **GI** ou entre segmentos), foi utilizado o teste *T* de Student. As análises de área marcada dentro de cada setor discal, por outro lado, envolveram comparações entre 4 ou 5 variáveis, de acordo com o segmento: os 2 controles negativos e setores anterior, posterior e, no caso do segmento lombar o segmento médio também. Assim, foi utilizado ANOVA como teste paramétrico ideal seguido, em caso de diferença significativa, do teste de Tukey para localizar a diferença entre os grupos. Por se tratar de variável ordinal, no caso da graduação de Thompson, foi utilizado o teste de Mann-Whitney com os demais parâmetros mantidos conforme supracitado (**Anexo B**).

6.1 Análise da amostra

Com relação ao tratamento estatístico das características antropológicas dos indivíduos dos grupos GJ e GI, não foram avaliadas as variáveis **idade** e **sexo**; esta, por ser passível de viés de seleção, já que o gênero masculino é mais suscetível a mortalidade na faixa etária jovem.

Ao se analisar os fatores altura e peso, muito embora os indivíduos do **GI** tenham demonstrado uma tendência para menor altura, não foi verificada diferença estatística entre os grupos ($p = 0,055$). (Tabela 1 e Figura 5).

FONTE: adaptado de FONTES RBV, 2011¹

Figura 5 - Gráficos das variáveis antropológicas tratadas estatisticamente entre GJ e GI. Não se observa diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (A, altura e B peso). Barras horizontais demonstram as médias, as quais também podem ser observadas na Tabela 1.

6.2 Análise macroscópica

Todos os DIVs ($n = 120$) foram diagnosticados segundo Thompson et al.¹⁵⁸ (**Anexo C**), uma vez que todos os graus e elementos constantes dessa classificação foram identificados nos espécimes estudados. As **Figuras 6 e 7** demonstram claramente essa análise. Desta forma, foi possível distinguir nas amostras, desde uma pequena proeminência do NP ou a diminuição/indistinção AF/NP, até a esclerose difusa e fissuras entre o AF e NP. Uma relação geral sobre o número de discos classificados segundo essa observação está na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Distribuição dos espécimes dos grupos Jovem e Idoso, diagnosticados de acordo com a escala de Thompson.

Graduação Thompson	GJ		GI	
	Cervical	Lombar	Cervical	Lombar
<u>Thompson 1</u>	2	6	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>Thompson 2</u>	<u>11</u>	7	3	5
<u>Thompson 3</u>	9	<u>10</u>	4	4
<u>Thompson 4</u>	7	7	6	9
<u>Thompson 5</u>	1	<u>0</u>	<u>17</u>	<u>12</u>
Total de discos	60		60

FONTE: adaptado de FONTES RBV, 2011¹.

Figura 6 – Demonstração fotográfica dos diferentes graus de Thompson nos blocos vertebrais cervicais do **GJ** e **GI**. Não foram encontrados discos grau 1 no **GI**.

FONTE: adaptado de FONTES RBV, 2011¹.

Figura 7 – Demonstração fotográfica dos diferentes graus de Thompson nos blocos vertebrais lombares do **GJ** e **GI**. Não foram encontrados discos grau 5 no GJ e grau 1 no GI.

Os discos cervicais do GI concentraram-se na graduação 5 (57%), enquanto que no GJ, a maioria dos espécimes dessa região (67%) concentrou-se nas graduações 2 e 3. Em relação aos discos da região lombar, foi evidente o predomínio das graduações 4 e 5 (70%) nos espécimes do GI, enquanto que o GJ exibiu prevalência nas graduações 2 e 3 (57%). Deve-se ressaltar, a distribuição de espécimes na graduação 4, onde se observa uma equivalência entre os grupos e as regiões, ou seja, de 23 a 25% das amostras.

Ao se analisar a degeneração discal entre os DIVs da mesma região vertebral (por exemplo, entre C4C5 e C5C6), não foram verificadas diferenças estatísticas na região cervical (GJ: $p=0,572$; GI: $p=0,836$), nem lombar (GJ: $p=0,731$; GI: $p=0,844$). Assim, observou-se que a classificação é similar, ou em progressão/regressão *pari passu*. Apenas 5% dos DIVs (6 de 120) ascenderam ou descenderam em duas classificações; ou seja, os espécimes 2781 (GJ), 321 (GI) e 478 (GI) da região lombar (**Anexo C**).

Sendo assim, as principais comparações foram feitas agrupando-se os discos **por região**, o que permitiu identificar que os discos do GI são significativamente mais degenerados que os do GJ (**Figura 8**). A diferença média de idade entre os indivíduos do GJ e do GI (45 anos), foi o fator principal de ampliação na classificação degeneração para os segmentos cervical e lombar (1,4 e 1,3 pontos, respectivamente) (**Anexo C**).

FONTE: adaptado de FONTES RBV, 2011¹.

Figura 8 – Gráficos demonstrando a média ± desvio padrão do grau de degeneração nas regiões e grupos avaliados. Observar que os discos do GI são significativamente mais degenerados que os do GJ, tanto na região cervical quanto no lombar.

6.3 Análise microscópica

A realização do mascaramento (item 5.4), divisão dos grupos em subgrupos seguindo as suas faixas etárias, e a segmentação dos anticorpos a serem testados (item 5.4.1), permitiu dividir e sistematizar a amostra, além de evitar viés de resultado pelo observador quando da aquisição dos dados qualitativos e quantitativos. Tal procedimento foi mantido até a análise dos resultados. Na **Tabela 6** estão listados, em números sequenciais, quais espécimes foram selecionados como participantes de cada subgrupo e respectivos anticorpos testados. Deve-se ainda, ressaltar que, comparativamente ao **Anexo A**, os espécimes foram aleatoriamente divididos nos subgrupos, respeitando-se a faixa etária.

Tabela 6 – Alocação dos cadáveres e anticorpos nos subgrupos experimentais.

Subgrupo 1 MMP-1, -2, -3 e TIMP-1		Subgrupo 2 IL-1 β , TNF- α e VEGF		Subgrupo 3 NGF- β e BDNF	
GJ	GI	GJ	GI	GJ	GI
1) 314	6) 2786	11) 2788	16) 321	21) 300	26) 320
2) 6040	7) 2787	12) 11250	17) 323	22) 479	27) 478
3) 9386	8) 5981	13) 1767	18) 8354	23) 2780	28) 482
4) 4410	9) 6042	14) 5050	19) 8356	24) 2781	29) 2789
5) 4413	10) 4411	15) 5091	20) 8358	25) 11243	30) 2790

Isto posto, a critério de organização, optou-se por descrever os resultados microscópicos em aspectos **morfológicos** e **imuno-histoquímicos**.

6.3.1 Morfologia

Em linhas gerais, os espécimes alocados nos **subgrupos 1, 2 e 3** demonstraram características relacionadas ao grau de degeneração de seus discos, e não em decorrência da idade. Em todos os espécimes pode-se observar os elementos constituintes do disco, tais como a placa vertebral, o arranjo fibrocolágeno e a região de transição entre essas duas (**Figura 9**).

Cervical

Lombar

FONTE: adaptado de FONTES RBV, 2011¹.

Figura 9 - Fotomicrografias de discos intervertebrais corados por hematoxilina e eosina. Observar em A e E as regiões distintas do tecido discal: (*) Placa Vertebral; (**) Arranjo fibro-colágeno; (***) área de interseção PV/arranjo fibro-colágeno.

Entretanto, dentre os grupos estudados, algumas diferenças puderam ser observadas. Foram detectados aglomerados de células (**Figura 15, E**), proliferação do componente cartilágneo hialino (**Figura 13, B**) e adensamento das fibras colágenas (**Figura 11, C**), que se apresentaram mais expressivos no segmento cervical. Com relação à diferenciação entre os grupos, os espécimes do GI caracterizaram-se por exibir células com dimensões variadas, com aspecto alongado ou irregular e distribuídas de maneira esparsa; aglomerados também foram identificados, constituídos por células de menor diâmetro (**Figura 12, E; Figura 16, E; Figura 12, comparar A e B; Figura 17, comparar A e B**).

Mesmo com morfologia bem preservada, os DIVs com graduação de Thompson 2, independentemente do grupo etário ou do segmento, exibiram uma ou outra característica compatível com processo de degeneração, como pode ser observado na **figura 9, letra C**, um adensamento de fibrilas colágenas e proliferação do componente cartilágneo.

6.3.2 Imuno-histoquímica

A fim de ratificar os resultados obtidos com essa metodologia, analisou-se inicialmente os controles, que não exibiram marcação anômala, muito embora tenha-se observado pouco artefato de técnica de fundo, tanto nos experimentos com ausência dos dois anticorpos (primário e secundário, 00), quanto naqueles onde se omitiu apenas o anticorpo primário (0AC2) (**Figura 18, F**).

Desta forma, a metodologia empregada permitiu evidenciar com precisão, tanto nos espécimes da região cervical como nos da lombar, o perfil das moléculas responsáveis pelo processo inflamatório, angiogênico, axonogênico e de remodelamento da matriz extracelular, como pode ser comprovado nas **Figuras 10 a 18**.

6.3.2.1 Aspectos qualitativos

Respeitando os diferentes subgrupos (subgrupo 1, 2 e 3), no mesmo espécime, nem sempre a marcação foi detectada em todos os setores de um determinado DIV, sobretudo nos subgrupos 2 e 3.

A marcação mais frequente foi detectada no citoplasma das células do DIV (**Figura 10, B**) e, em alguns casos, também na membrana plasmática (**Figura 11, D**). No AF, tanto na região anterior quanto na posterior, a localização, no eixo sagital, apresentou-se mais próxima do NP do que dos ligamentos longitudinais

Dentre as regiões da estrutura discal dispostas no eixo longitudinal (PV, interseção PV/arranjo fibro-colágeno (AFC), e AFC ou NP) (**Figura 9**), a prevalência de detecção imuno-histoquímica foi na interseção PV/AFC dos setores discais (**Figura 14, D** no NP; **Figura 16, A** no AF posterior, **B** no AF anterior e **D** no NP). Comparativamente às demais proteínas, a detecção do NGF- β e BDNF era profunda no eixo longitudinal (mais relacionada ao AFC), e difundida no eixo sagital, sendo detectadas tanto nas regiões média e central do DIV, como no LLA e no LLP (**Figura 18, B**).

A expressão dessas moléculas foram também detectadas em grupos isógenos mergulhados no AFC (**Figura 10, E; Figura 11, B**); na matriz extracelular (**Figura 13, A; Figura 14, B, Figura 15, B**); em regiões de remodelamento da PV (**Figura 11, E; Figura 12, A e E**) e do AFC (**Figura 12, B**), e próximo às lesões em fenda ou fissura do tecido discal (**Figura 12, B; Figura 13, E; Figura 14, A e E; Figura 15, A; Figura 16, E; Figura 17, B e E**).

Assim, no geral, o GI exibiu, principalmente nos discos lombares, características de degeneração mais evidentes do que o GJ, devido à imunoexpressão de citocina na MEC, e em células próximas às regiões com lesões teciduais (em fissura ou fenda) e de remodelamento. Quando presentes no GJ, essas características foram detectadas predominantemente nos discos cervicais.

Figura 10 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para MMP-1 na PV (A-D, F) e AFC (E) de DIVs. Observar a marcação citoplasmática (A, B e D) e o grupo isógeno (E), bem como a ausência de marcação nos controles (C e F).

Figura 11 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para MMP-2 na PV (A, C, E, F), na interseção PV/AFC (B) e AFC (D) de DIVs. Observar a imunomarcagem no citoplasma com aspecto granulado (A), na membrana (B, D) e em área de remodelamento da MEC (E). (C e F: ausência de marcação nos controles).

Figura 12 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para MMP-3 na interseção PV/AFC (A, B, C, D, F) e PV (E) de DIVs. Observar a imunomarcagem no citoplasma das células em área de remodelamento da MEC (A, E) e próximo a fissuras (B). Comparar a morfologia da célula entre (B) e (A). (C e F: ausência de marcação nos controles).

Figura 13 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para TIMP-1 no AFC (A), na PV (C, D, F) e na interseção PV/AFC (B, D) de DIVs. Notar a imunomarcção na MEC (A), no citoplasma das células (A, B, D, E) e próximo a fissura (E). (C e F: ausência de marcação nos controles).

Figura 14 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para IL-1 β na interseção PV/AFC (A, C, D, E, F) e na PV (B) de DIVs. Observar a imunomarcção em citoplasma e membrana plasmática das células (A, B, D), na MEC (B), e próximo a fissuras (A, E). Comparar a morfologia da célula (A, D). (C e F: ausência de marcação nos controles).

Figura 15 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para TNF- α na interseção PV/AFC (A, B, E) e na PV (C, D, F) de DIVs. Verificar a imunoexpressão em células próximas a fissura (A), na MEC (B) e aglomerado celular (E). (C e F: ausência de marcação nos controles).

Figura 16 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para VEGF na interseção PV/AFC (A, D, E) e na PV (B, C, F) de DIVs. Notar a imunoexpressão no citoplasma da célula (B, D), em grupos isógenos (A) e próximo a fenda (E). (C e F: ausência de marcação nos controles).

Figura 17 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para NGF- β na PV (A) e na interseção PV/AFC (B, C, D, E, F) de DIVs. Observar a marcação no citoplasma e membrana de células (A, B, D), e próximo a fissuras (B, E). Comparar a morfologia das células (B, E). (C e F: ausência de marcação nos controles).

Figura 18 - Fotomicrografias de imuno-histoquímica para BDNF na interseção PV/AFC (A, C, D, E), no LLP (B) e na PV (F) de DIVs. Verificar a marcação em grupos isógenos (A, D), no LLP (B) e citoplasma e membrana de células (E), e próximo a fissuras (B, E). Comparar a morfologia das células (B, E). (C, F: ausência de marcação nos controles).

6.3.2.2 Aspectos quantitativos

As **figuras 19 e 20** ilustram a quantificação média de todas as moléculas, nos discos cervicais e lombares dos grupos GJ e GI, contidos no **Anexo D**.

Em uma análise geral de todos os espécimes, tanto de GJ como de GI, muito embora não avaliado estatisticamente, as moléculas que mais se expressaram foram a MMP-2, -3, IL-1 α , VEGF e NGF- β .

Figura 19 - Representação gráfica da quantificação imuno-histoquímica nas regiões cervicais anterior (A) e posterior (B) dos grupos GJ e GI. Destaque para as moléculas de MMP-2, -3, IL-1 α , VEGF e NGF- β .

Figura 20 - Representação gráfica da quantificação imuno-histoquímica nas regiões lombares anterior (A), médio (B) e posterior (C) dos grupos GJ e GI. Destaque para as moléculas de MMP-2, -3, IL-1 α , VEGF e NGF- β .

Assim, comparando-se os grupos experimentais e a quantidade de imunomarcação, verifica-se que na região cervical do GJ a MMP-1 e o TIMP-1 foram os mais detectados (**Anexo D**); as demais predominaram nos discos do GI (**Figura 19**). Na região lombar, todas as moléculas expressaram-se prevalentemente no GI, com exceção do BDNF; este, maior no GJ (**Figura 20**).

As comparações estatísticas realizadas em GJ e GI, entre os **setores discais** (*cervicais anterior e posterior; lombares anterior, médio e posterior*), permitiram verificar que não houve diferenças entre os grupos no setor *anterior cervical*, relativas à expressão de MMP-1, TIMP-1 e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α). A maior expressão de MMP-2, -3, VEGF, NGF- β e BDNF nesse setor, foi detectada no GI.

No setor *posterior cervical*, com exceção de MMP-2, com maior expressão no GJ (embora muito próximo do limiar estatístico estabelecido), detectou-se equivalência das demais moléculas entre os grupos.

Na região lombar todos os remodeladores da MEC, seu inibidor (TIMP-1) e o VEGF, foram significativamente mais expressos no GI em todos os setores (*anterior, médio e posterior*), com exceção de TIMP-1, que não revelou diferença, apenas no setor *anterior* para com o GJ. Relativamente às citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 β foi detectada em maior quantidade no setor *anterior* de GI; o TNF- α no setor *posterior* de GI e *anterior* de GJ. No setor *médio* não houve diferença entre GJ e GI.

Com relação à expressão das neurotrofinas nessa região, os resultados foram divergentes, ou seja, o NGF- β destacou-se significativamente no setor *médio* do GI, enquanto que a expressão de BDNF foi maior no setor *posterior* do GJ.

Figura 21 - Representação gráfica da análise estatística dos remodeladores da matriz extracelular MMP-1 (A), MMP-2 (B), MMP-3 (C) e TIMP-1 (D). Observar, entre os grupos e regiões, as diferentes expressões.

Figura 22 - Representação gráfica da análise estatística dos agentes pró-inflamatórios e angiogênico: IL-1 β (A), TNF- α (B) e VEGF (C). Notar as diferentes expressões entre os grupos e regiões.

Figura 23 - Representação gráfica da análise estatística das neurotrofinas NGF- β (A) e BDNF (B). Notar as diferentes expressões nos grupos e regiões, com destaque para o NGF- β no setor médio do GI.

Embora alguma das abordagens da presente pesquisa possam ter sido relatadas em publicações acerca do tema^{20,28,31,32,133,163}, o material, a metodologia e os tipos de análises aqui empregadas permitiram a obtenção de dados ainda não relatados sobre as características do envelhecimento normal dos DIVs.

De fato, comparar regiões diferentes da coluna vertebral humana, quer seja sob o aspecto morfológico como funcional, entre indivíduos jovens e idosos, assintomáticos, delineando o perfil de moléculas apontadas na literatura como características da doença degenerativa discal, é ainda assunto inédito.

A maior parte da literatura pertinente utiliza espécimes doentes, portanto sintomáticos, obtidos em cirurgias de hérnia discal (protrusão, extrusão e sequestro)^{23,37,124,133,156}; espondilólise/espondilolistese^{28,39}; escoliose¹⁶¹ e cervicalgia/lombalgia (dissectomia)^{22,123,153,164}. Trabalhos que relacionam indivíduos sintomáticos x assintomáticos admitindo esses últimos como controle normal, exibem um número menor desses espécimes, por serem de origem cadavérica^{20,22,31,36}.

Relativamente às regiões da coluna, bem como à idade, muitos estudos são realizados utilizando apenas os diferentes níveis da região lombar e com faixa etária variando entre a primeira e a nona décadas de vida^{19,25,32,39,85,95,97}, sendo reduzido o número de trabalhos relacionando análises estruturais simultâneas entre discos assintomáticos cervicais e lombares, com o decorrer da idade^{13,79,163,165–167}. Além disso, exceto Scott et al.⁷⁹ e Weiler et al.¹⁶³ que utilizaram espécimes obtidos de cadáveres, as demais pesquisas avaliaram indivíduos vivos, assintomáticos, empregando a RNM.

A interpretação para esse fato pode estar relacionada aos seguintes erros, ou limitações: a habitual extrapolação de dados obtidos em DIVs lombares para os DIVs cervicais, induzindo à falta de interesse dos cientistas por essa região^{7,8,168}; a complicada tarefa de se avaliar discos com estrutura sabidamente diferente¹; a ausência de uma escala de avaliação confiável capaz de abranger, simultaneamente, as características das duas regiões^{97,157} e, por último e atual no campo da Anatomia Humana, a escassez cada vez maior de material humano para a realização de estudos em laboratório.

Essa última assertiva, que dificulta sobremaneira a obtenção e a sistematização de espécimes para a realização de estudos morfológicos nos mais diferentes níveis (macroscópicos, ultra-estruturais, imuno-histoquímicos e bioquímicos), mormente em indivíduos assintomáticos, não constituiu empecilho para a presente pesquisa, uma vez que estes, obtidos do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC/São Paulo), foram previamente coletados e organizados em um protocolo com número suficiente que permitisse análises comparativas importantes entre os grupos etários aqui estudados¹.

Todavia, mesmo considerando-se falhas no protocolo relativas à entrevista com os familiares, com eventual omissão de episódios de cervicalgia ou lombalgia, pode-se admitir que o material cadavérico aqui utilizado, constitui-se numa alternativa de muita importância para pesquisar a degeneração discal em indivíduos "presumivelmente assintomáticos".

Neste caso específico, o termo presumível deve ser considerado, pois a única maneira de se evitar tal viés, seria a elaboração de um programa institucional com o cadastramento de pessoas de maneira prospectiva, onde esses indivíduos, além de fornecerem dados precisos acerca da não manifestação de dores ou procedimentos na região da coluna vertebral, concordassem em participar de estudos dessa natureza após o óbito.

Mesmo investigando uma população presumivelmente assintomática, todos os graus de degeneração foram diagnosticados, tendo sido verificadas em indivíduos jovens características macroscópicas capazes de atribuir-lhes as graduações 4 e 5 de Thompson, muito embora a predominância tenha sido entre 2 e 3. Tais espécimes foram assim classificados dada a presença de fissuras e/ou osteófitos adjacentes, sendo raro, entretanto, a presença de esclerose total. Essas observações foram previamente relatadas como alterações degenerativas comuns em indivíduos assintomáticos^{163,165,167,169-171}. O reduzido número de espécimes do GJ que receberam a classificação 1 de Thompson (8/60), também reforça essa afirmação. Dessa forma, não se pode assumir como sendo "normal" ou com ausência de degeneração, um DIV oriundo de cadáveres ou dito assintomático, como preconizado por autores como Freemont et al., Purmessur et al. e Uchiyama^{18,20,140}.

O fator etário efetivamente determinou alterações estruturais compatíveis com degeneração nos DIVs do GI, uma vez que praticamente a metade deles (29/60) exibiu o grau 5 na escala de Thompson. A principal diferença entre DIVs do GJ e GI classificados no mesmo grau de degeneração, é que enquanto nesse último há tendência ao colapamento, o GJ exibe aspecto mais preservado do seu arranjo estrutural. Esse tipo de correlação foi implementado em nosso meio por Fontes¹, utilizando-se dos mesmos espécimes aqui avaliados.

Uma observação que merece ser destacada, foi o número equivalente de indivíduos de ambos grupos classificados com grau 4, permitindo sugerir que essa elevada ocorrência no GJ possa estar relacionada ao maior número de indivíduos do sexo masculino (11/15) comparativamente ao GI (8/15), fator que levou os indivíduos jovens a apresentarem uma "tendência" ao maior peso ($p = 0,056$). Reforçam essa teoria, os trabalhos que demonstram que quanto maior a carga sobre os condrocito que já exibe aspectos degenerativos, mais estimulada será a via catabólica no disco (produção de MMP-3, -13 e ADAMTS-4)^{119,172,173}.

Considerando-se que, quanto ao gênero avaliado na presente amostra, muito embora tenha ocorrido uma equivalência entre o número de indivíduos do sexo masculino e feminino no GI, há um nítido predomínio de indivíduos do sexo masculino no GJ, uma fase da vida onde o homem está mais susceptível a ações do meio externo (carregar peso, exercício extenuante e postura incorreta). Esse fato pode ter colaborado para a obtenção de amostras com grau mais degenerado no GJ, o que não necessariamente corrobora com boa parte dos estudos onde a amostra é predominantemente do sexo masculino, uma vez que os espécimes cirúrgicos foram obtidos de indivíduos sabidamente sintomáticos^{15,86,92,95,97,113,123,172}.

Quando avaliada tanto intra como inter-segmento, a degeneração discal exibe um padrão homogêneo, o que corrobora com as descrições em trabalhos recentes utilizando tanto cadáveres como indivíduos vivos^{13,163,165,167}. Tal assertiva pode ser comprovada quando se analisa minuciosamente os graus de degeneração dos DIVs (**Anexo C**), onde se comprova que a uniformidade é tal, que não é incomum um determinado espécime apresentar o mesmo grau nos 4 DIVs (8/30). Desta forma, Okada et al.¹⁶⁵ também observaram essa homogeneidade ao compararem com o uso de RNM discos cervicais de

indivíduos assintomáticos, com pacientes submetidos a cirurgia de hérnia de disco lombar, demonstrando maior degeneração nos discos cervicais destes últimos.

Os dados aqui apresentados relativos à homogeneidade, não permitem concordar com alguns trabalhos que sugerem ser o fator genético determinante no processo degenerativo^{163,174,175}, a não ser de forma pontual. Os subsídios morfológicos apontam, isso sim, para fatores sistêmicos adquiridos, como desequilíbrio biomecânico entre DIVs e processo articulares¹⁷⁶ e citocinas pró-inflamatórias^{131,177}, as quais serão discutidas adiante.

A análise macroscópica da amostra estudada revelou que, em ambos os grupos, a região cervical exibiu grau de degeneração relativamente maior (acentuando-se para o GI), o que pode estar relacionado com a amplitude de movimento que o segmento motor cervical permite^{166,167,178}. Todavia, Weiler et al.¹⁶³ afirmam em seus espécimes histológicos, que são os discos lombares aqueles que apresentam caracteres degenerativos quando comparados aos discos torácico e cervical. No entanto seus dados revelam, assim como Matsumoto et al.¹³ através da RNM, que tais caracteres destacam-se apenas no NP dos DIVs lombares e, embora tenham realizado um grande número de análises, omitem resultados mais abrangentes envolvendo as demais regiões do disco.

Como se depreende, avaliar comparativamente os discos intervertebrais de diferentes regiões da coluna vertebral é tarefa complexa, uma vez que alguma característica sempre é negligenciada, como por exemplo, a diferença na dimensão de seus NPs, e a fase da vida em que se perde a distinção AF/NP^{75,78,82,95}.

As características morfológicas traduzem o aspecto funcional. Assim, pelo fato de o DIV cervical ser formado por aproximadamente 1/3 de NP e 2/3 de AF (sem distinção nítida entre ambas), o mesmo destina-se a suportar cargas de tensão, distração e rotação; já o disco lombar, constituído por NP e AF na mesma proporção, está bem adaptado para suportar cargas axiais estáticas e dinâmicas. Tais particularidades, ratificadas por trabalhos que verificaram que ao passo que o AF é a primeira região a sofrer degeneração no DIV cervical, no DIV lombar, isso ocorre no NP^{97,163}, serviram de base para que se justificasse a metodologia empregada para o estudo do disco cervical, dividindo-o somente nas partes anterior e posterior.

Relativamente às diferentes escalas de degeneração, inclusive a aqui estabelecida, não se pode aplicar ao DIV cervical as características que as mesmas utilizam para o DIV lombar, ou seja, tomar como base o que ocorre com o NP, uma vez que, comparativamente, espécimes da região cervical sempre exibirão aspecto mais degenerado. Considerando-se tal premissa, não se realizou no presente trabalho comparações estatísticas entre os dois segmentos em ambos os grupos, uma vez que estudos que estabeleçam padrões exclusivos para DIVs da região cervical, ainda constituem assunto em aberto.

Os trabalhos que utilizam amostras cirúrgicas analisam apenas a parte anterior do DIV, dividindo-o nas partes superficial e profunda do AF e NP, omitindo sua parte posterior^{19,22,31-34,179-181}, mesmo já tendo sido evidenciado que a carga sobre disco presente em curvatura secundária é maior na parte posterior¹⁷⁶. Em virtude disso, a técnica de preparação dos espécimes da presente pesquisa consistiu na divisão do DIV em setores menores (cervicais anterior e posterior; lombares anterior, médio e posterior), permitindo para cada parte do disco, a obtenção de resultados nos eixos sagital e longitudinal, respeitando a biomecânica de toda a estrutura.

Relativamente à técnica imuno-histoquímica, não optou-se pela detecção através do complexo avidina-biotina, pelo fato da avidina ser uma glicoproteína com ponto isoelétrico específico, tornando-a propensa a executar ligações não específicas, incrementando os artefatos da técnica; além disso, o método de detecção pelo polímero HRP (*horseradish peroxidase*) intensifica a marcação em torno de 4-5 vezes¹⁵⁹. Assim, a metodologia ora empregada mostrou-se eficiente, uma vez que as imunoexpressões das moléculas são de tênue visualização^{14,20}.

Dentre os diferentes métodos de quantificação imuno-histoquímica empregados, o mais frequente é o que avalia, em porcentagem, a proporção entre células marcadas e não-marcadas no DIV (geralmente estabelecidas num padrão variável entre um mínimo de 100 e máximo de 200 células)^{21,24,25,32,113,122}, sem contudo analisarem variações na densidade celular decorrente de alterações estruturais que porventura o disco possa apresentar em diferentes regiões.

Também não considerou-se aqui o método da análise semi-quantitativa utilizado por alguns pesquisadores^{37,122,161}, uma vez que permitem uma avaliação baseada principalmente em critérios subjetivos adaptados conforme os critérios específicos estabelecidos por cada grupo de pesquisa, gerando dados controversos entre os trabalhos, dificultando sobremaneira o confronto dos resultados entre si³⁹.

No presente trabalho adaptou-se um método de quantificação fundamentado em pesquisas que se dedicaram em padronizar, através de modernos programas de computador, medidas de intensidade (energia) do cromógeno (cor) por área (pixel), com o mínimo viés¹⁸²⁻¹⁸⁵. Como essa análise utiliza-se de separação de cores na escala RGB (*red-green-blue*), não se empregou nas reações a contra-colaração que, além de permitir melhor diferenciação entre marcações anômalas e reais, evitou contabilizar artefatos. Acrescente-se, ainda, a quantificação por setores do DIV e por campo microscópico, que respeitam a morfologia do tecido na área de estudo, mesmo em alta resolução.

Esse método, que respeita no corte a extensão da área de tecido ocupada pela imunexpressão de uma determinada molécula (mais/menos imunopositiva), também permite ratificar sob o aspecto estatístico a expressão real, mesmo que sutil, livre de artefato de técnica.

Os diferentes autores não são acordes acerca da alteração da densidade celular quando se avalia o envelhecimento e a degeneração do DIV. Desta forma, tem sido descrito como um dos primeiros comprometimentos do DIV, como aqui observado, o aumento do componente cartilágneo e a proliferação de aglomerados de condrócitos^{21,25,97,100}, ao passo que os que utilizam-se de técnicas biomoleculares modernas sustentam a hipótese de que a diminuição na síntese de Cols, GAGs e PGs ocorre em razão da apoptose celular^{100,120,186-188}.

A técnica imuno-histoquímica aqui empregada constitui-se em uma nova vertente de avaliação, uma vez que propõe-se a quantificar, não um número determinado de células, mas áreas de imunomarcação. Desta maneira, para haver consideração à modificação da idade/degeneração que o tecido em questão sofre, a quantificação deve ser sempre por campo e região do disco aleatorizado¹⁸⁹.

Após o exposto acerca das amostras e da metodologia aqui utilizadas, convém ressaltar que, na literatura à qual se teve acesso, muito embora os resultados de alguns trabalhos tenham sido discutidos, não foram observados experimentos que permitissem confrontos diretos com os resultados da presente pesquisa, sobretudo pela gama de moléculas testadas. Desta forma, para o segmento cervical foram considerados os trabalhos de Kang et al.³³, Kokubo et al.²⁸, Kanemoto et al.⁸, Furusawa et al.¹⁹⁰ e Baba et al.¹⁹¹ enquanto que, para o segmento lombar, apesar do extenso o número de referências, todos utilizaram-se de discos obtidos de indivíduos sintomáticos.

Exceção feita ao NGF- β e BDNF, que apresentaram-se distribuídos de forma esparsa no tecido discal, em ambos os grupos, a imunoexpressão foi predominantemente detectada no citoplasma das células nativas do DIV mais próximo ao NP (ou seja, na parte profunda do AF e NP), conforme previamente relatado^{31,32,36,37,113}, sugerindo que o DIV possui um centro ativo não limitado pelo NP e/ou AF¹⁷⁶, capaz de sintetizar tais proteínas. No entanto, essas assertivas não são corroboradas pelos diversos autores, que verificaram desde a não detecção de NGF- β no citoplasma de células de DIVs, até discrepâncias acerca da maior ou menor imunoexpressão nas diferentes regiões do disco^{19,20,148}, justificando desta forma, a realização da presente pesquisa.

No eixo longitudinal do DIV, a região onde mais se verificou imunoexpressão de todas as moléculas, foi na interseção PV/AFC. Essa área ainda não havia sido apontada em publicações específicas sobre o assunto em questão, uma vez que pelo fato da amostra ser de origem cirúrgica, as avaliações não puderam ser sistematizadas, como aqui proposto^{15,20,122,140}. O estudo detalhado de Boos et al.⁹⁷ empregando técnicas rotineiras de histologia, destaca que com a idade, a primeira região do disco a ser comprometida é a PV, antes mesmo dos elementos do NP; por sua vez, o AF só degenera com a senectude. Na presente pesquisa, embora não tenha sido realizada quantificação celular, os dados permitem concordar com Boos et al., uma vez que essa região destacou-se como o sítio principal de detecção das imunomarcações.

A detecção da MMP-2, -3, TNF- α , VEGF e NGF- β foi destacada nos dois grupos estudados; todavia, revelaram ser particularmente atuantes no processo de envelhecimento dos DIVs cervicais e lombares, uma vez que comparativamente ao GJ revelaram maior expressão no GI. Esses resultados, confirmados por aqueles descritos em

pacientes sintomáticos^{14,19,22,28,112,113}, são compatíveis com o perfil dos DIVs dos indivíduos do GI.

Acerca dos experimentos delineados no **subgrupo 1**, o disco cervical do GI exibiu as maiores diferenças no setor anterior, onde observou-se desproporção entre a expressão de MMP-2, -3 e TIMP-1, como relatado em espécimes com hérnia ou prolapso^{8,190,191}, mesmo em estudos com técnicas bioquímicas³³, resultando em desequilíbrio no remodelamento de Cols II, III, IV, V, VII e X. Utilizando-se dos mesmos espécimes da presente pesquisa, Fontes¹ observou a diminuição do perfil de Cols II e VI no DIV cervical dos espécimes do GI, correspondente ao aqui descrito sobre as metaloproteinases.

Ainda, o setor posterior cervical revelou menor expressão de MMP-2 no GI, o que pode explicar os resultados de Fontes¹, que não detectou nessas mesmas amostras, o aumento de Col IV, V, VII e X. Por outro lado, no GI, em virtude do aumento quantitativo (não confirmado estatisticamente) de MMP-2 e -3 desproporcional ao de TIMP-1, houve uma diminuição de Col II, III, IV, VI e IX¹.

Provavelmente em virtude dos diferentes tipos de cargas e funções desempenhadas em todos os setores do DIV lombar¹⁶⁷, o remodelamento da MEC foi mais amplo nesses discos em GI pois, além do verificado nos discos cervicais, ocorreu uma significativa expressão de MMP-1, -2, -3 e TIMP-1. Ainda assim, a expressão de MMP-1, -3 e TIMP-1 não foi proporcional, revelando que ocorreu um desequilíbrio na manutenção dessa matriz, culminando na degradação de seus elementos em todos os setores discais do GI. Reforçam essas afirmações, as observações de Fontes¹, que detectou, respectivamente nos setores anterior, médio e posterior dos DIVs lombares do GI, uma diminuição de Col II, III, IV e V, Col V, VI e IX, e Col I, III e X. Deve-se também acrescentar que, nos trabalhos com espécimes sintomáticos esses mesmos resultados são apresentados, sobretudo na desproporção MMP-3/TIMP-1^{25,39}, propondo que essa mudança na MEC diminui a hidratação, a habilidade de suportar cargas, e a integridade estrutural dos DIVs, resultando em um fenótipo de degeneração^{21,32,34,112,113,113}.

Ao se avaliar as moléculas do **subgrupo 2**, foi ainda no GI que as características de degeneração foram mais exacerbadas, expressas pela maior detecção de VEGF nos

setores anteriores dos discos cervicais, corroborando com resultados obtidos em discos sintomáticos²⁸. Embora sem diferença entre os grupos, esses DIVs expressaram IL-1 β e TNF- α , fato comprovado estatisticamente em discos herniados, em comparação com os controles^{28,191}. Desta maneira, Kokubo et al.²⁸ revelam que o perfil de degeneração do disco cervical aqui descrito demonstra estreita relação entre MMP-3, TNF- α e VEGF, sugerindo porém, que isso ocorra em virtude de um processo de reabsorção da hérnia ou regeneração. Embora haja uma similaridade entre os resultados, não é possível corroborar com essas afirmações, uma vez que, como já salientado, o fator etário isoladamente propiciou, no GI, caracteres compatíveis com degeneração.

O TNF- α se mostrou a citocina primária no processo de degeneração discal, pois, embora destacando-se estatisticamente nos setores anterior e posterior, também sinalizou um aumento no setor médio dos DIVs lombar do GI. Muito embora Le Maitre et al.²² e Hoyland et al.¹⁹² apontem com bastante segurança que a IL-1 β é mais importante no processo de degeneração do DIV, e que experimentos utilizando o seu inibidor (IL-1Ra)^{30,36,131} tenham alcançado relativo sucesso terapêutico, o TNF- α não parece ter apenas um papel determinante no tecido durante o envelhecimento e degeneração³⁷, mas também é apontado como a citocina mais catabólica e anti-anabólica no tecido discal¹⁷⁷, além de atuar na origem da dor discogênica através da desmielinização ou inflamação dos terminais nervosos do DIV^{20,29,177,193}. Desta forma, considerando-se os resultados acerca da IL-1 β , pode-se afirmar que a mesma é secundária nesse processo, uma vez que foi diferenciada apenas no setor anterior desses espécimes.

O VEGF corrobora os dados acerca da maior degeneração do disco lombar de GI, uma vez que exibiu intensa expressão nesses espécimes^{35,133}, com relativa correspondência em relação à expressão de TNF- α , como relatado por alguns pesquisadores^{14,194}.

É interessante notar que ambas moléculas demonstraram maior quantitativo no setor posterior, diminuindo à medida que se alcança o setor anterior do DIV. Desta maneira, os dados permitem presumir que o crescimento de vasos para o DIV ocorra a partir do setor posterior, proposição já referenciada por outros autores ao avaliarem o possível mecanismo de reabsorção de hérnias lombares^{133,137,138}.

Admite-se que o tecido discal expressa o VEGF como um mecanismo para realização de metabolismo glicolítico, uma vez que o microambiente discal é essencialmente anaeróbico, e a GAG mais importante da matriz, o sulfato de condroitina^{77,79}, necessita de oxigênio e glicose para ser metabolizado^{79,195}. Essas assertivas foram verificadas em experimento por Scott et al.⁷⁹, sobre a alteração das GAGs durante o envelhecimento de DIVs cervicais e lombares humanos. Esses autores observaram que o sulfato de condroitina é hidrofílico e diminui com a idade, ao contrário do sulfato de queratana, que mesmo aumentando não possui característica hidrofílica o bastante para suporta as modificações decorrentes do processo de envelhecimento, contribuindo para a desidratação do DIV. Sugeriram, ainda, que a diminuição de oxigênio leva ao aumento de lactato no tecido, induzindo a modificação de síntese do sulfato de condroitina para o de queratana. Desta maneira, o VEGF atua no tecido discal como agente catabólico, em virtude do ambiente discal ser avascular após a primeira década de vida^{6,9,18,34}, sinalizando o crescimento de vasos para aquela região^{23,135}.

Partindo do princípio que o disco cervical, comparado ao lombar, exibe mais características compatíveis com o processo de degeneração, e equivalência na expressão dessas citocinas, pode-se presumir que nos DIVs em geral, a IL-1 β e o TNF- α são os agentes que orquestram os eventos catabólicos nessas estruturas, sendo capazes de desorganizar o remodelamento da MEC e induzir à angiogênese (VEGF)^{14,31,36,130,131,191,192,132}.

Estudos em DIVs sintomáticos detectaram a expressão de neuropeptídeos, relacionando-os com o estímulo ou origem da dor discogênica^{17,19,140}, e que os neurofilamentos profundos na estrutura discal somente ocorrem na presença de NGF- β e BDNF, geralmente acompanhando os vasos neoformados através da PV ou do setor posterior^{14,133,137,138}. Yamauchi et al.¹⁴⁵ observaram que essas neurotrofinas também atuam regulando a expressão de Substância P, sinalizando nocicepção aberrante, podendo ser interpretado como um fator de proteção contra futuras lesões à estrutura discal¹⁹. Os achados acerca das neurotrofinas testadas nos espécimes do **subgrupo 3**, permitem inferir que os indivíduos do GI exibiram um fenótipo degenerativo, compatível com o descrito por esses autores, uma vez que o NGF- β destacou-se sobremaneira no setor anterior do disco cervical (onde também ocorreu a maior expressão de BDNF) e no setor médio do disco lombar.

Muito embora não se tenha verificado na literatura dados que corroborem com a maior expressão de BDNF no setor posterior do DIV lombar do grupo GJ, as correlações de Purmessur et al.²⁰ entre um disco mais degenerado e a maior expressão de BDNF levam a presumir que esse fator possa explicar o porque de um indivíduo jovem manifestar episódios de dor discogênica, mesmo não exibindo, ainda, as características morfológicas de um disco idoso.

Também não foram encontrados estudos que tenham investigado a expressão do BDNF em discos cervicais; porém, em virtude da expressão do NGF- β ter se mostrado quantitativamente maior nas análises aqui empreendidas, presume-se que esse seja a principal neurotrofina envolvida no processo de degeneração discal.

Assim, com o envelhecimento, considerando-se as peculiaridades biológicas próprias de cada região, os disco cervicais e lombares são submetidos a um extenso remodelamento da MEC, muito provavelmente em virtude da ação catabólica do TNF- α . Os dados também sugerem que essas moléculas estimulam expressão de VEGF e NGF- β nos indivíduos idosos, sinalizando para um processo de vascularização e inervação de regiões avasculares e aneurais do DIV. Embora os resultados da presente pesquisa não sejam conclusivos o suficiente para afirmar que essas proteínas são as causadoras da doença degenerativa discal, estudos com DIVs doentes apontam nessa direção^{19,22,140,177}.

Finalizando, ao traçar o perfil de moléculas relacionadas à inflamação, angiogênese, axonogênese e remodelamento da matriz extracelular este trabalho teve como escopo detectá-las em indivíduos assintomáticos, surpreendendo o fato de as mesmas terem sido evidenciadas em indivíduos jovens.

Considerando-se que a incidência da cervicalgia e lombalgia são altas em todas as sociedades do mundo^{2,3,40,41}; os custos diretos e indiretos são elevados, e vêm sendo ampliados ao longo dos anos com a introdução de novos fármacos e aumento da expectativa de vida da população^{5,42,43,49}; e ainda, que a degeneração discal geralmente é apontada como a principal causa, espera-se que os dados aqui apresentados possam auxiliar no delineamento de pesquisas futuras subsidiando uma proposta terapêutica preventiva¹⁹⁶⁻¹⁹⁹ visando solucionar um dos maiores males crônicos da sociedade atual.

Considerando-se os objetivos aqui propostos, a metodologia empregada e face aos resultados obtidos, é lícito concluir-se que:

1) Os DIVs cervicais e lombares humanos dos grupos jovem (GJ) e idoso (GI) expressaram as moléculas envolvidas nos processos inflamatório, angiogênico, axonogênico e de remodelamento da matriz extracelular;

2) O envelhecimento de DIVs cervicais e lombares caracterizou-se por exibir um processo catabólico com extensivo remodelamento da MEC, e estímulos angiogênico e axonogênico;

3) A expressão de nocicepção anormal em discos lombares pode ocorrer em fase precoce.

Anexo A

Tabela A.1 - Cálculo da quantificação total da imuno-histoquímica

Parâmetro	Cálculo		
Cadáver: GJ ou GI	$\frac{1}{(Cada\ cadáver\ é\ submetido\ ao\ mesmo\ protocolo)}$		
Nº de peças ou lâminas/cadáver + 2 controles	$\frac{12}{(C4A, C4P, L5A, L5M\ e\ L5P\ por\ exemplo) + 2\ controles/cadáver}$		
Nº de anticorpos/ subgrupo	$\frac{4}{4\ anticorpos\ de\ 9\ no\ total}$ Subgrupo 1	$\frac{3}{3\ anticorpos\ de\ 9\ no\ total}$ Subgrupo 2	$\frac{2}{4\ anticorpos\ de\ 9\ no\ total}$ Subgrupo 3
Nº de imagens/ cadáver	$\frac{X}{10}$ =		
Total medidas / cadáver	480	360	240
Número de cadáveres em cada subgrupo	$\frac{X}{10}$ =		
Total de medidas por subgrupo	4.800	3.600	2.400
	=		
Somatória	10.800 quantificações		

Anexo B

Tabela B.1 - Representação da análise estatística adotada.

Variáveis	Tipo	Análise	Teste
Idade			
Peso	Contínua	GJ x GI	<i>T</i> Student
Altura			
Thompson	Ordinal	GJ x GI	Mann-Whitney
Área de marcação (IHQ)	Contínua	AC x 00 x 0AC2	ANOVA, <i>post-hoc</i> Turkey
		GJ x GI	<i>T</i> Student

Anexo C**Tabela C.1** - Graduação de Thompson para os espécimes do GJ e GI.

Espécime	Disco			
	C4C5	C5C6	L4L5	L5S1
Grupo jovem				
300/08	4	4	2	3
314/08	3	3	3	3
479/08	4	4	4	4
2780/08	3	2	4	3
2781/08	2	2	1	3
2788/08	2	1	2	1
6040/08	2	1	1	1
9386/08	2	2	3	2
11243/08	3	3	3	4
11250/08	4	3	3	4
1767/09	2	2	1	1
4410/09	2	2	3	4
4413/09	5	4	2	2
5050/09	3	4	2	2
5091/09	3	3	4	3
Média +/- DP	2,93 +/- 0,96	2,67 +/- 1,05	2,53 +/- 1,06	2,67 +/- 1,11
Média segmento +/- DP	2,80 +/- 1,00		2,6 +/- 1,07	
Grupo idoso				
320/08	5	5	3	4
321/08	4	5	5	3
323/08	2	2	2	2
478/08	3	3	2	4
482/08	4	3	2	2
2786/08	5	5	3	4
2787/08	4	5	4	4
2789/08	5	5	5	5
2790/08	4	4	4	4
5981/08	5	4	5	4
6042/08	5	5	5	5
8354/08	5	5	4	3
8356/08	2	3	5	5
8358/08	5	5	5	5
4411/09	5	5	5	5
Média +/- DP	4,20 +/- 1,08	4,27 +/- 1,03	3,93 +/- 1,22	3,93 +/- 1,03
Média segmento +/- DP	4,23 +/- 1,04		3,93 +/- 1,11	

FONTE: Fontes RBV, 2011¹

Anexo D

Tabela D.1 - Tabela com médias gerais da quantificação imuno-histoquímica.

Setor discal	MMP-1	MMP-2	MMP-3	TIMP-1	IL1	TNF	VEGF	NGF	BDNF	0AC2	00
Cervical anterior GJ	0,2957	0,2367	0,5435	0,3577	0,2741	0,1341	0,1822	0,1295	0,08282	0,00895	0,02688
Cervical anterior GI	0,2422	0,6013	0,8516	0,3206	0,3938	0,1845	0,3917	0,4816	0,2674	0,02783	0,01509
Cervical posterior GJ	0,3976	0,7209	0,5839	0,3701	0,3321	0,1906	0,4551	0,2451	0,2163	0,00895	0,02688
Cervical posterior GI	0,2901	0,479	0,6243	0,3185	0,2726	0,2666	0,3899	0,3778	0,2519	0,02783	0,01509
Média geral das Moléculas	0,3064	0,509475	0,650825	0,341725	0,31815	0,19395	0,354725	0,3085	0,204605	0,01839	0,020985
Média da Molécula no GJ	0,34665	0,4788	0,5637	0,3639	0,3031	0,16235	0,31865	0,1873	0,14956	0,00895	0,02688
Média da Molécula no GI	0,26615	0,54015	0,73795	0,31955	0,3332	0,22555	0,3908	0,4297	0,25965	0,02783	0,01509
Setor discal	MMP-1	MMP-2	MMP-3	TIMP-1	IL1	TNF	VEGF	NGF	BDNF	NEG	DUPLO N
Lombar anterior GJ	0,1467	0,1529	0,1584	0,2016	0,09789	0,04931	0,08904	0,1579	0,08285	0,00895	0,02688
Lombar anterior GI	0,2743	0,5231	0,4141	0,2373	0,1867	0,1273	0,3519	0,1514	0,08482	0,02783	0,01509
Lombar médio GJ	0,1211	0,1288	0,32	0,186	0,2069	0,08705	0,2004	0,1037	0,08001	0,00895	0,02688
Lombar médio GI	0,2393	0,3629	0,5766	0,3466	0,2038	0,184	0,4961	0,1519	0,09762	0,02783	0,01509
Lombar posterior GJ	0,1644	0,1583	0,1654	0,1673	0,173	0,07878	0,08831	0,1936	0,1818	0,00895	0,02688
Lombar posterior GI	0,2773	0,5949	0,5569	0,3384	0,1915	0,2488	0,5661	0,1803	0,1118	0,02783	0,01509
Média geral das Moléculas	0,20385	0,32015	0,365233	0,2462	0,176632	0,129207	0,298642	0,156467	0,106483	0,01839	0,020985
Média da Molécula no GJ	0,144067	0,146667	0,2146	0,184967	0,159263	0,071713	0,125917	0,151733	0,114887	0,00895	0,02688
Média da Molécula no GI	0,263633	0,493633	0,515867	0,307433	0,194	0,1867	0,471367	0,1612	0,09808	0,02783	0,01509

REFERÊNCIAS^a

1. Fontes RBV. O disco intervertebral nas regiões cervical e lombar: morfologia e envelhecimento [tese]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2011.
2. Côté P, van der Velde G, Cassidy JD, et al. The burden and determinants of neck pain in workers: results of the Bone and Joint Decade 2000-2010 Task Force on Neck Pain and Its Associated Disorders. *J Manipulative Physiol Ther*. 2009;32(2 Suppl):S70–86. doi:10.1016/j.jmpt.2008.11.012.
3. Côté P, van der Velde G, Cassidy JD, et al. The burden and determinants of neck pain in workers: results of the Bone and Joint Decade 2000-2010 Task Force on Neck Pain and Its Associated Disorders. *Spine*. 2008;33(4 Suppl):S60–74. doi:10.1097/BRS.0b013e3181643ee4.
4. Hogg-Johnson S, van der Velde G, Carroll LJ, et al. The burden and determinants of neck pain in the general population: results of the Bone and Joint Decade 2000-2010 Task Force on Neck Pain and Its Associated Disorders. *Spine*. 2008;33(4 Suppl):S39–51. doi:10.1097/BRS.0b013e31816454c8.
5. Martin BI, Deyo RA, Mirza SK, et al. Expenditures and health status among adults with back and neck problems. *JAMA*. 2008;299(6):656–664. doi:10.1001/jama.299.6.656.
6. Roh JS, Teng AL, Yoo JU, Davis J, Furey C, Bohlman HH. Degenerative disorders of the lumbar and cervical spine. *Orthop Clin North Am*. 2005;36(3):255–262. doi:10.1016/j.ocl.2005.01.007.
7. Connell MD, Wiesel SW. Natural history and pathogenesis of cervical disk disease. *Orthop Clin North Am*. 1992;23(3):369–380.
8. Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, Katsuura A, Nishioka J. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 human intervertebral discs. *Spine*. 1996;21(1):1–8.
9. Vora AJ, Doerr KD, Wolfer LR. Functional anatomy and pathophysiology of axial low back pain: disc, posterior elements, sacroiliac joint, and associated pain generators. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2010;21(4):679–709. doi:10.1016/j.pmr.2010.07.005.
10. Grönblad M, Weinstein JN, Santavirta S. Immunohistochemical observations on spinal tissue innervation. A review of hypothetical mechanisms of back pain. *Acta Orthop Scand*. 1991;62(6):614–622.
11. McCarthy PW, Carruthers B, Martin D, Petts P. Immunohistochemical demonstration of sensory nerve fibres and endings in the intervertebral discs of the rat. *Spine*. 1991;16:653–655.

^a De acordo com:

American Medical Association (AMA).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

12. Chan WCW, Sze KL, Samartzis D, Leung VYL, Chan D. Structure and biology of the intervertebral disk in health and disease. *Orthop Clin North Am.* 2011;42(4):447–464, vii. doi:10.1016/j.ocl.2011.07.012.
13. Matsumoto M, Okada E, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Takahata T. Tandem age-related lumbar and cervical intervertebral disc changes in asymptomatic subjects. *Eur Spine J.* 2012. doi:10.1007/s00586-012-2500-z.
14. Lee JM, Song JY, Baek M, et al. Interleukin-1beta induces angiogenesis and innervation in human intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res.* 2010. doi:10.1002/jor.21210.
15. Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 4):652–655. doi:10.1042/BST0350652.
16. Testut L. *Traité D'Anatomie Humaine*. 1st ed. Paris: Octave Doin; 1905.
17. Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(1):5–10. doi:10.1093/rheumatology/ken396.
18. Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, Jeziorska M, Hoyland JA. Current understanding of cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy. *J Pathol.* 2002;196(4):374–379. doi:10.1002/path.1050.
19. Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, et al. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J Pathol.* 2002;197(3):286–292. doi:10.1002/path.1108.
20. Purmessur D, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression and regulation of neurotrophins in the nondegenerate and degenerate human intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):R99. doi:10.1186/ar2487.
21. Bachmeier BE, Nerlich A, Mittermaier N, et al. Matrix metalloproteinase expression levels suggest distinct enzyme roles during lumbar disc herniation and degeneration. *Eur Spine J.* 2009;18(11):1573–1586. doi:10.1007/s00586-009-1031-8.
22. Le Maitre C, Hoyland J, Freemont AJ. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1 β and TNF α expression profile. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):R77. doi:10.1186/ar2275.
23. Haro H, Kato T, Komori H, Osada M, Shinomiya K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in herniated disc resorption. *J Orthop Res.* 2002;20(3):409–415. doi:10.1016/S0736-0266(01)00150-4.
24. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Human disc degeneration is associated with increased MMP 7 expression. *Biotech Histochem.* 2006;81(4-6):125–131. doi:10.1080/10520290601005298.
25. Weiler C, Nerlich AG, Zipperer J, Bachmeier BE, Boos N. 2002 SSE Award Competition in Basic Science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption. *Eur Spine J.* 2002;11(4):308–320. doi:10.1007/s00586-002-0472-0.

26. Podichetty VK. The aging spine: the role of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2007;53(5):4–18.
27. Maroudas A, Stockwell RA, Nachemson A, Urban J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J Anat*. 1975;120(Pt 1):113–130.
28. Kokubo Y, Uchida K, Kobayashi S, et al. Herniated and spondylotic intervertebral discs of the human cervical spine: histological and immunohistological findings in 500 en bloc surgical samples. Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery Spine*. 2008;9(3):285–295.
29. Igarashi T, Kikuchi S, Shubayev V, Myers RR. 2000 Volvo Award winner in basic science studies: Exogenous tumor necrosis factor- α mimics nucleus pulposus-induced neuropathology. Molecular, histologic, and behavioral comparisons in rats. *Spine*. 2000;25(23):2975–2980.
30. Phillips KLE, Jordan-Mahy N, Nicklin MJH, Le Maitre CL. Interleukin-1 receptor antagonist deficient mice provide insights into pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Ann Rheum Dis*. 2013. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202266.
31. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R732–745. doi:10.1186/ar1732.
32. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol*. 2004;204(1):47–54. doi:10.1002/path.1608.
33. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Evans CH. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine*. 1995;20(22):2373–2378.
34. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF, Evans CH. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine*. 1996;21(3):271–277.
35. Tolonen J, Grönblad M, Virri J, Seitsalo S, Rytömaa T, Karaharju EO. Platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor expression in disc herniation tissue: and immunohistochemical study. *Eur Spine J*. 1997;6(1):63–69.
36. Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Interleukin-1 receptor antagonist delivered directly and by gene therapy inhibits matrix degradation in the intact degenerate human intervertebral disc: an in situ zymographic and gene therapy study. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(4):R83. doi:10.1186/ar2282.
37. Weiler C, Nerlich AG, Bachmeier BE, Boos N. Expression and distribution of tumor necrosis factor α in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls. *Spine*. 2005;30(1):44–53; discussion 54.
38. Boos N, Nerlich AG, Wiest I, von der Mark K, Aebi M. Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration. *Histochem Cell Biol*. 1997;108(6):471–480.

39. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine*. 2000;25(23):3005–3013.
40. Rubin DI. Epidemiology and risk factors for spine pain. *Neurol Clin*. 2007;25(2):353–371. doi:10.1016/j.ncl.2007.01.004.
41. Fejer R, Kyvik KO, Hartvigsen J. The prevalence of neck pain in the world population: a systematic critical review of the literature. *Eur Spine J*. 2006;15(6):834–848. doi:10.1007/s00586-004-0864-4.
42. Wielage R, Bansal M, Wilson K, Klein R, Happich M. The Cost-Effectiveness of Duloxetine in Chronic Low Back Pain: a Quebec Societal Perspective. *Spine*. 2012. doi:10.1097/BRS.0b013e31828264f9.
43. Ivanova JI, Birnbaum HG, Kantor E, Schiller M, Swindle RW. Duloxetine use in chronic low back pain: treatment patterns and costs. *Pharmacoeconomics*. 2012;30(7):595–609. doi:10.2165/11598130-000000000-00000.
44. Helfenstein Junior M, Goldenfum MA, Siena C. Lombalgia ocupacional. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010;56(5):583–589. doi:10.1590/S0104-42302010000500022.
45. Walker BF. The prevalence of low back pain: a systematic review of the literature from 1966 to 1998. *J Spinal Disord*. 2000;13(3):205–217.
46. Hansson EK, Hansson TH. The costs for persons sick-listed more than one month because of low back or neck problems. A two-year prospective study of Swedish patients. *Eur Spine J*. 2005;14(4):337–345. doi:10.1007/s00586-004-0731-3.
47. Ståhl M, Mikkelsen M, Kautiainen H, Häkkinen A, Ylinen J, Salminen JJ. Neck pain in adolescence. A 4-year follow-up of pain-free preadolescents. *Pain*. 2004;110(1-2):427–431. doi:10.1016/j.pain.2004.04.025.
48. Müller-Schwefe G, Freytag A, Höer A, et al. Healthcare utilization of back pain patients: results of a claims data analysis. *J Med Econ*. 2011;14(6):816–823. doi:10.3111/13696998.2011.625067.
49. Martin BI, Turner JA, Mirza SK, Lee MJ, Comstock BA, Deyo RA. Trends in health care expenditures, utilization, and health status among US adults with spine problems, 1997-2006. *Spine*. 2009;34(19):2077–2084. doi:10.1097/BRS.0b013e3181b1fad1.
50. Côté P, Cassidy JD, Carroll L. The Saskatchewan Health and Back Pain Survey. The prevalence of neck pain and related disability in Saskatchewan adults. *Spine*. 1998;23(15):1689–1698.
51. Croft PR, Lewis M, Papageorgiou AC, et al. Risk factors for neck pain: a longitudinal study in the general population. *Pain*. 2001;93(3):317–325.
52. Müller-Schwefe G, Freytag A, Höer A, et al. Healthcare utilization of back pain patients: results of a claims data analysis. *Journal of Medical Economics*. 2011;14(6):816–823. doi:10.3111/13696998.2011.625067.

53. Borghouts J. Cost-of-illness of neck pain in The Netherlands in 1996. *Pain*. 1999;80(3):629–636. doi:10.1016/S0304-3959(98)00268-1.
54. Driessen MT, Lin C-WC, van Tulder MW. Cost-effectiveness of conservative treatments for neck pain: a systematic review on economic evaluations. *Eur Spine J*. 2012;21(8):1441–1450. doi:10.1007/s00586-012-2272-5.
55. Kreling MCGD, Cruz D de ALM da, Pimenta CA de M. Prevalence of chronic pain in adult workers. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2006;59(4):509–513. doi:10.1590/S0034-71672006000400007.
56. Novaes FS, Shimo AKK, Lopes MHB de M. Low back pain during gestation. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2006;14(4):620–624. doi:10.1590/S0104-11692006000400022.
57. Fernandes R de CP, Carvalho FM, Assunção AÁ. Prevalence of musculoskeletal disorders among plastics industry workers. *Cadernos de Saúde Pública*. 2011;27(1):78–86. doi:10.1590/S0102-311X2011000100008.
58. Malateaux JM, Ricci FR, Fragoso YD. Investigation of low back pain in a non-hospital population of the coastline of the State of São Paulo. *Revista Dor*. 2011;12(1):19–22. doi:10.1590/S1806-00132011000100005.
59. Toscano JJ de O, Egypto EP do. A influência do sedentarismo na prevalência de lombalgia. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2001;7(4):132–137. doi:10.1590/S1517-86922001000400004.
60. Varela CD da S, Ferreira SL. Perfil das trabalhadoras de enfermagem com diagnóstico de LER/DORT em Salvador-Bahia 1998-2002. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2004;57(3):321–325. doi:10.1590/S0034-71672004000300013.
61. Carugno M, Pesatori AC, Ferrario MM, et al. Physical and psychosocial risk factors for musculoskeletal disorders in Brazilian and Italian nurses. *Cad Saude Publica*. 2012;28(9):1632–1642.
62. Sá K, Baptista AF, Matos MA, Lessa I. Prevalence of chronic pain and associated factors in the population of Salvador, Bahia. *Revista de Saúde Pública*. 2009;43(4):622–630. doi:10.1590/S0034-89102009005000032.
63. Ferreira GD, Silva MC, Rombaldi AJ, Wrege ED, Siqueira FV, Hallal PC. Prevalence and associated factors of back pain in adults from southern Brazil: a population-based study. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. 2011;15(1):31–36. doi:10.1590/S1413-35552011005000001.
64. Andrusaitis SF, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Study of the prevalence and risk factors for low back pain in truck drivers in the state of São Paulo, Brazil. *Clinics*. 2006;61(6):503–510. doi:10.1590/S1807-59322006000600003.
65. Sobral MKM de, Silva PG da, Vieira RAG, Siqueira GR de. A efetividade da terapia de liberação posicional (TLP) em pacientes com cervicalgia. *Fisioterapia em Movimento*. 2010;23(4):513–521. doi:10.1590/S0103-51502010000400002.
66. Siqueira FV, Facchini LA, Hallal PC. Epidemiology of physiotherapy utilization among adults and elderly. *Revista de Saúde Pública*. 2005;39(4):662–668. doi:10.1590/S0034-89102005000400022.

67. Shapiro IM, Vresilovic EJ, Risbud MV. Is the spinal motion segment a diarthrodial polyaxial joint: what a nice nucleus like you doing in a joint like this? *Bone*. 2012;50(3):771–776. doi:10.1016/j.bone.2011.12.004.
68. Gardner ED, O’Rahilly R, Müller F, Gardner ED. *Gardner-Gray-O’Rahilly anatomy : a regional study of human structure*. Philadelphia: Saunders; 1986.
69. Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract*. 2008;8(1):18–44. doi:10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x.
70. Inoue N, Espinoza Orías AA. Biomechanics of intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am*. 2011;42(4):487–499, vii. doi:10.1016/j.ocl.2011.07.001.
71. Moore KL, Agur AMR, Dalley AF. *Essential clinical anatomy*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
72. Brismée J-M, Sizer PS Jr, Dedrick GS, Sawyer BG, Smith MP. Immunohistochemical and histological study of human uncovertebral joints: a preliminary investigation. *Spine*. 2009;34(12):1257–1263. doi:10.1097/BRS.0b013e31819b2b5d.
73. Schmorl C, Junghanns H. *Die gesunde und kranke Wirbelsäule in Röntgenbild und Klinik*. 5th ed. Stuttgart: Thieme; 1968.
74. Kirkaldy-Willis WH, Wedge JH, Yong-Hing K, Reilly J. Pathology and pathogenesis of lumbar spondylosis and stenosis. *Spine*. 1978;3(4):319–328.
75. Oda J, Tanaka H, Tsuzuki N. Intervertebral disc changes with aging of human cervical vertebra. From the neonate to the eighties. *Spine*. 1988;13(11):1205–1211.
76. Luschka H. *Die Halbegelenke des Menschlichen Körpers*. 2nd ed. Berlin: Reimer; 1858.
77. Ross MH, Pawlina W. *Histology: a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
78. Pattappa G, Li Z, Peroglio M, Wismer N, Alini M, Grad S. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function. *J Anat*. 2012;221(6):480–496. doi:10.1111/j.1469-7580.2012.01521.x.
79. Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM, Taylor JR. The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus. *J Anat*. 1994;184 (Pt 1):73–82.
80. Singh K, Masuda K, Thonar EJ, An HS, Cs-Szabo G. Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and anulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(1):10–6. doi:10.1097/BRS.0b013e31818e5ddd 00007632-200901010-00004 [pii].
81. Coventry MB, Ghormley RK, Kernohan JW. The intervertebral disc: its microscopic anatomy and pathology. Part I: Anatomy, development and pathology. *J Bone Joint Surg Am*. 1945;27:105–112.
82. Mercer S, Bogduk N. The ligaments and annulus fibrosus of human adult cervical intervertebral discs. *Spine*. 1999;24(7):619–628.

83. Mwale F, Roughley P, Antoniou J. Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc. *Eur Cell Mater*. 2004;8:58–63; discussion 63–64.
84. Gruber HE, Norton HJ, Ingram JA, Hanley EN Jr. The SOX9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration. *Spine*. 2005;30(6):625–630.
85. Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. 1997 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine*. 1997;22(24):2781–2795.
86. Coventry MB, Ghormley RK, Kernohan JW. The intervertebral disc: its microscopic anatomy and pathology. Part II: Changes in the intervertebral disc concomitant with age. *J Bone Joint Surg Am*. 1945;27:233–247.
87. Bogduk N, Tynan W, Wilson AS. The nerve supply to the human lumbar intervertebral discs. *J Anat*. 1981;132(Pt 1):39–56.
88. Rooft PG. Innervation of the annulus fibrosus and posterior longitudinal ligament. *Archives of Neurology and Psychiatry*. 1940;44:100–103.
89. Roberts S, Eisenstein SM, Menage J, Evans EH, Ashton IK. Mechanoreceptors in intervertebral discs. Morphology, distribution, and neuropeptides. *Spine*. 1995;20(24):2645–2651.
90. Dimitroulias A, Tsonidis C, Natsis K, et al. An immunohistochemical study of mechanoreceptors in lumbar spine intervertebral discs. *J Clin Neurosci*. 2010;17(6):742–745. doi:10.1016/j.jocn.2009.09.032.
91. Cloward RB. Changes in the vertebra caused by ruptured intervertebral discs; observations on their formation and treatment. *Am J Surg*. 1952;84(2):151–160.
92. Coventry MB, Ghormley RK, Kernohan JW. The intervertebral disc: its microscopic anatomy and pathology. Part III: Pathological changes in the intervertebral. *Journal of Bone and Joint Surgery [Am]*. 1945;27:460–474.
93. Harris RI, MacNab I. Structural changes in the lumbar intervertebral discs; their relationship to low back pain and sciatica. *J Bone Joint Surg Br*. 1954;36-B(2):304–322.
94. Fardon DF, Milette PC. Nomenclature and classification of lumbar disc pathology. Recommendations of the Combined task Forces of the North American Spine Society, American Society of Spine Radiology, and American Society of Neuroradiology. *Spine*. 2001;26(5):E93–E113.
95. Coventry MB, Ghormley RK, Kernohan JW. The intervertebral disc: its microscopic anatomy and pathology. Part I: Anatomy, development and pathology. *J Bone Joint Surg Am*. 1945;27:105–112.
96. Okada E, Matsumoto M, Ichihara D, et al. Aging of the cervical spine in healthy volunteers: a 10-year longitudinal magnetic resonance imaging study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(7):706–12. doi:10.1097/BRS.0b013e31819c2003 00007632-200904010-00013 [pii].

97. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine*. 2002;27(23):2631–2644. doi:10.1097/01.BRS.0000035304.27153.5B.
98. Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine*. 2006;31(18):2151–2161. doi:10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c.
99. Adams MA, Pollintine P, Tobias JH, Wakley GK, Dolan P. Intervertebral disc degeneration can predispose to anterior vertebral fractures in the thoracolumbar spine. *J Bone Miner Res*. 2006;21(9):1409–1416. doi:10.1359/jbmr.060609.
100. Zhao C-Q, Wang L-M, Jiang L-S, Dai L-Y. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev*. 2007;6(3):247–261. doi:10.1016/j.arr.2007.08.001.
101. Takaishi H, Nemoto O, Shiota M, et al. Type-II collagen gene expression is transiently upregulated in experimentally induced degeneration of rabbit intervertebral disc. *J Orthop Res*. 1997;15(4):528–538. doi:10.1002/jor.1100150408.
102. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay. *PNAS*. 1962;48(6):1014–1022.
103. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J. *Cell biology*. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2008.
104. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genetics*. 1990;6:121–125. doi:10.1016/0168-9525(90)90126-Q.
105. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):221–233. doi:10.1038/nrm2125.
106. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(2):197–250.
107. Van Hove I, Lemmens K, Van de Velde S, Verslegers M, Moons L. Matrix metalloproteinase-3 in the central nervous system: a look on the bright side. *Journal of Neurochemistry*. 2012:n/a–n/a. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07900.x.
108. Welgus HG, Stricklin GP, Eisen AZ, Bauer EA, Cooney RV, Jeffrey JJ. A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 1979;254(6):1938–1943.
109. Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, et al. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985;318(6041):66–69.
110. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49(3):187–198. doi:10.1016/j.critrevonc.2003.09.008.
111. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):207–214. doi:10.1038/nrm763.

112. Nishida T. Kinetics of tissue and serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intervertebral disc degeneration and disc herniation. *Kurume Med J*. 1999;46(1):39–50.
113. Zigouris A, Batistatou A, Alexiou GA, et al. Correlation of matrix metalloproteinases-1 and -3 with patient age and grade of lumbar disc herniation. *J Neurosurg Spine*. 2011;14(2):268–272. doi:10.3171/2010.9.SPINE09935.
114. Sive JJ, Baird P, Jeziorski M, Watkins A, Hoyland JA, Freemont AJ. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *MP, Mol Pathol*. 2002;55(2):91–97.
115. Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, Tanzawa K, Okada Y. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Lett*. 2001;494(3):192–195.
116. Liang Q-Q, Cui X-J, Xi Z-J, et al. Prolonged Upright Posture Induces Degenerative Changes in Intervertebral Discs of Rat Cervical Spine. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010. doi:10.1097/BRS.0b013e3181d2dec2.
117. Nagano S, Kim SH, Tokunaga S, Arai K, Fujiki M, Misumi K. Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and spinal injury severity in dogs with intervertebral disc herniation. *Res Vet Sci*. 2010. doi:10.1016/j.rvsc.2010.09.009.
118. Rutges JPHJ, Nikkels PGJ, Oner FC, et al. The presence of extracellular matrix degrading metalloproteinases during fetal development of the intervertebral disc. *Eur Spine J*. 2010;19(8):1340–1346. doi:10.1007/s00586-010-1378-x.
119. Walter BA, Korecki CL, Purmessur D, Roughley PJ, Michalek AJ, Iatridis JC. Complex loading affects intervertebral disc mechanics and biology. *Osteoarthritis Cartil*. 2011;19(8):1011–1018. doi:10.1016/j.joca.2011.04.005.
120. Gruber HE, Hanley EN. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine*. 1998;23(7):751–757.
121. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J*. 1994;8(15):1314–1325.
122. Lee JM, Song JY, Baek M, et al. Interleukin-1 β induces angiogenesis and innervation in human intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res*. 2010. doi:10.1002/jor.21210.
123. Burke JG, Watson RWG, McCormack D, Dowling FE, Walsh MG, Fitzpatrick JM. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(2):196–201.
124. Specchia N, Pagnotta A, Toesca A, Greco F. Cytokines and growth factors in the protruded intervertebral disc of the lumbar spine. *Eur Spine J*. 2002;11(2):145–151. doi:10.1007/s00586-001-0361-y.
125. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487–501.

126. Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(427 Suppl):S27–36.
127. Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol*. 2006;21(5):557–566.
128. Brisby H. Pathology and possible mechanisms of nervous system response to disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:68–71. doi:10.2106/JBJS.E.01282.
129. Zhao C-Q, Liu D, Li H, Jiang L-S, Dai L-Y. Interleukin-1 β enhances the effect of serum deprivation on rat annular cell apoptosis. *Apoptosis*. 2007;12(12):2155–2161. doi:10.1007/s10495-007-0137-x.
130. Wang J, Markova D, Anderson DG, Zheng Z, Shapiro IM, Risbud MV. TNF- α and IL-1 β promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc. *J Biol Chem*. 2011;286(46):39738–39749. doi:10.1074/jbc.M111.264549.
131. Gorth DJ, Mauck RL, Chiaro JA, et al. IL-1 α delivered from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres attenuates IL-1 β -mediated degradation of nucleus pulposus in vitro. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):R179. doi:10.1186/ar3932.
132. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF Therapy, from Rationale to Standard of Care: What Lessons Has It Taught Us? *J Immunol*. 2010;185(2):791–794. doi:10.4049/jimmunol.1090051.
133. Koike Y, Uzuki M, Kokubun S, Sawai T. Angiogenesis and inflammatory cell infiltration in lumbar disc herniation. *Spine*. 2003;28(17):1928–1933. doi:10.1097/01.BRS.0000083324.65405.AE.
134. Herbert SP, Stainier DYR. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(9):551–564. doi:10.1038/nrm3176.
135. Afuwape AO, Kiriakidis S, Paleolog EM. The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol*. 2002;17(3):961–972.
136. Ilan N, Mahooti S, Rimm DL, Madri JA. PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *J Cell Sci*. 1999;112 Pt 18:3005–3014.
137. Komori H, Shinomiya K, Nakai O, Yamaura I, Takeda S, Furuya K. The natural history of herniated nucleus pulposus with radiculopathy. *Spine*. 1996;21(2):225–229.
138. Komori H, Okawa A, Haro H, Muneta T, Yamamoto H, Shinomiya K. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging in conservative management of lumbar disc herniation. *Spine*. 1998;23(1):67–73.
139. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):324–333.
140. Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, Hoyland JA, O'Brien J, Jayson MI. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet*. 1997;350(9072):178–181.
141. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677–736. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677.

142. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. *Science*. 2001;294(5548):1945–1948. doi:10.1126/science.1065057.
143. Calissano P, Matrone C, Amadoro G. Nerve growth factor as a paradigm of neurotrophins related to Alzheimer's disease. *Developmental Neurobiology*. 2010;70(5):372–383. doi:10.1002/dneu.20759.
144. Madduri S, Papaloizos M, Gander B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. *Neurosci Res*. 2009;65(1):88–97. doi:10.1016/j.neures.2009.06.003.
145. Yamauchi K, Inoue G, Koshi T, et al. Nerve growth factor of cultured medium extracted from human degenerative nucleus pulposus promotes sensory nerve growth and induces substance p in vitro. *Spine*. 2009;34(21):2263–2269. doi:10.1097/BRS.0b013e3181a5521d.
146. Abe Y, Akeda K, An HS, et al. Proinflammatory cytokines stimulate the expression of nerve growth factor by human intervertebral disc cells. *Spine*. 2007;32(6):635–642. doi:10.1097/01.brs.0000257556.90850.53.
147. Olmarker K. Neovascularization and neoinnervation of subcutaneously placed nucleus pulposus and the inhibitory effects of certain drugs. *Spine*. 2005;30(13):1501–1504.
148. Gruber HE, Ingram JA, Hoelscher G, Zinchenko N, Norton HJ, Hanley EN. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the human and the sand rat intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R82. doi:10.1186/ar2456.
149. Melrose J, Roberts S, Smith S, Menage J, Ghosh P. Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine anular lesion model of experimental disc degeneration. *Spine*. 2002;27(12):1278–1285.
150. Johnson WEB, Caterson B, Eisenstein SM, Hynds DL, Snow DM, Roberts S. Human intervertebral disc aggrecan inhibits nerve growth in vitro. *Arthritis Rheum*. 2002;46(10):2658–2664. doi:10.1002/art.10585.
151. Johnson WEB, Caterson B, Eisenstein SM, Roberts S. Human intervertebral disc aggrecan inhibits endothelial cell adhesion and cell migration in vitro. *Spine*. 2005;30(10):1139–1147.
152. Johnson WEB, Sivan S, Wright KT, Eisenstein SM, Maroudas A, Roberts S. Human intervertebral disc cells promote nerve growth over substrata of human intervertebral disc aggrecan. *Spine*. 2006;31(11):1187–1193. doi:10.1097/01.brs.0000217669.04903.61.
153. Tolofari SK, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression of semaphorin 3A and its receptors in the human intervertebral disc: potential role in regulating neural ingrowth in the degenerate intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R1. doi:10.1186/ar2898.
154. De Wit J, Verhaagen J. Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog Neurobiol*. 2003;71(2-3):249–267.
155. Richardson SM, Purmessur D, Baird P, Probyn B, Freemont AJ, Hoyland JA. Degenerate human nucleus pulposus cells promote neurite outgrowth in neural cells. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e47735. doi:10.1371/journal.pone.0047735.

156. Gruber HE, Ingram JA, Hoelscher G, Zinchenko N, Norton HJ, Hanley EN. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the human and the sand rat intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R82. doi:10.1186/ar2456.
157. Kettler A, Wilke HJ. Review of existing grading systems for cervical or lumbar disc and facet joint degeneration. *European Spine Journal*. 2006;15:705–718.
158. Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, Adams ME, Tsang IK, Bishop PB. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine*. 1990;15(5):411–415.
159. Boenisch T, Farmillo A. *Handbook of immunochemical staining methods*. 3rd ed. Carpinteria, Estados Unidos: Dako Corporation; 2001.
160. Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004;65(3):249–259.
161. Nerlich AG, Bachmeier BE, Boos N. Expression of fibronectin and TGF-beta1 mRNA and protein suggest altered regulation of extracellular matrix in degenerated disc tissue. *Eur Spine J*. 2005;14(1):17–26. doi:10.1007/s00586-004-0745-x.
162. Zar J. *Biostatistical analysis*. 4th ed. Upper Saddle River N.J.: Prentice Hall; 1999.
163. Weiler C, Schietzsch M, Kirchner T, Nerlich AG, Boos N, Wuertz K. Age-related changes in human cervical, thoracic and lumbar intervertebral disc exhibit a strong intra-individual correlation. *Eur Spine J*. 2012;21 Suppl 6:S810–818. doi:10.1007/s00586-011-1922-3.
164. Studer RK, Vo N, Sowa G, Ondock C, Kang J. Human Nucleus Pulposus Cells React to IL-6. *Spine*. 2011;36:593–599. doi:10.1097/BRS.0b013e3181da38d5.
165. Okada E, Matsumoto M, Fujiwara H, Toyama Y. Disc degeneration of cervical spine on MRI in patients with lumbar disc herniation: comparison study with asymptomatic volunteers. *Eur Spine J*. 2010;20(4):585–591. doi:10.1007/s00586-010-1644-y.
166. Lee TH, Kim SJ, Lim SM. Prevalence of Disc Degeneration in Asymptomatic Korean Subjects. Part 2 : Cervical Spine. *J Korean Neurosurg Soc*. 2013;53(2):89–95. doi:10.3340/jkns.2013.53.2.89.
167. Kim SJ, Lee TH, Yi S. Prevalence of disc degeneration in asymptomatic korean subjects. Part 3 : cervical and lumbar relationship. *J Korean Neurosurg Soc*. 2013;53(3):167–173. doi:10.3340/jkns.2013.53.3.167.
168. Gruber HE, Hanley EN. Ultrastructure of the human intervertebral disc during aging and degeneration: comparison of surgical and control specimens. *Spine*. 2002;27(8):798–805.
169. Berlemann U, Gries NC, Moore RJ. The relationship between height, shape and histological changes in early degeneration of the lower lumbar discs. *Eur Spine J*. 1998;7(3):212–217.
170. Matsumoto M, Okada E, Ichihara D, et al. Age-related changes of thoracic and cervical intervertebral discs in asymptomatic subjects. *Spine*. 2010;35(14):1359–1364. doi:10.1097/BRS.0b013e3181c17067.

171. Gries NC, Berlemann U, Moore RJ, Vernon-Roberts B. Early histologic changes in lower lumbar discs and facet joints and their correlation. *Eur Spine J*. 2000;9(1):23–29.
172. Le Maitre CL, Frain J, Fotheringham AP, Freemont AJ, Hoyland JA. Human cells derived from degenerate intervertebral discs respond differently to those derived from non-degenerate intervertebral discs following application of dynamic hydrostatic pressure. *Biorheology*. 2008;45(5):563–575. doi:10.3233/BIR-2008-0498.
173. Gilbert HTJ, Hoyland JA, Millward-Sadler SJ. The response of human annulus fibrosus cells to cyclic tensile strain is frequency-dependent and altered with disc degeneration. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(11):3385–3394. doi:10.1002/art.27643.
174. Battié MC, Videman T, Kaprio J, et al. The Twin Spine Study: contributions to a changing view of disc degeneration. *Spine J*. 2009;9(1):47–59. doi:10.1016/j.spinee.2008.11.011.
175. Hestbaek L, Iachine IA, Leboeuf-Yde C, Kyvik KO, Manniche C. Heredity of low back pain in a young population: a classical twin study. *Twin Res*. 2004;7(1):16–26. doi:10.1375/13690520460741408.
176. Adams MA, McNally DS, Dolan P. “stress” Distributions Inside Intervertebral Discs the Effects of Age and Degeneration. *J Bone Joint Surg Br*. 1996;78-B(6):965–972.
177. 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;433(1):151–156. doi:10.1016/j.bbrc.2013.02.034.
178. Kim SJ, Lee TH, Lim SM. Prevalence of Disc Degeneration in Asymptomatic Korean Subjects. Part 1 : Lumbar Spine. *J Korean Neurosurg Soc*. 2013;53(1):31–38. doi:10.3340/jkns.2013.53.1.31.
179. Park JY, Yoon YS, Park HS, Kuh SU. Molecular response of human cervical and lumbar nucleus pulposus cells from degenerated discs following cytokine treatment. *Genet Mol Res*. 2013;12(1):838–851. doi:10.4238/2013.March.15.4.
180. Pockert AJ, Richardson SM, Le Maitre CL, et al. Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(2):482–491. doi:10.1002/art.24291.
181. Richardson SM, Doyle P, Minogue BM, Gnanalingham K, Hoyland JA. Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(4):R126. doi:10.1186/ar2793.
182. Mosedale DE, Metcalfe JC, Grainger DJ. Optimization of immunofluorescence methods by quantitative image analysis. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(9):1043–1050.
183. Ruifrok AC. Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding. *Anal Quant Cytol Histol*. 1997;19(2):107–113.
184. Lehr HA, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM. Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J Histochem Cytochem*. 1999;47(1):119–126.

185. Matos LL de, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA da S. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(5):417–424.
186. Ding F, Shao Z-W, Xiong L-M. Cell death in intervertebral disc degeneration. *Apoptosis*. 2013. doi:10.1007/s10495-013-0839-1.
187. Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc. *Spine*. 2001;26(22):2414–2420.
188. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:10–14. doi:10.2106/JBJS.F.00019.
189. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96(5):379–394.
190. Furusawa N, Baba H, Miyoshi N, et al. Herniation of cervical intervertebral disc: immunohistochemical examination and measurement of nitric oxide production. *Spine*. 2001;26(10):1110–1116.
191. Baba H, Maezawa Y, Furusawa N, et al. Herniated cervical intervertebral discs: histological and immunohistochemical characteristics. *Eur J Histochem*. 1997;41(4):261–270.
192. Hoyland JA, Le Maitre C, Freemont AJ. Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(6):809–814. doi:10.1093/rheumatology/ken056.
193. De Souza Grava AL, Ferrari LF, Defino HLA. Cytokine inhibition and time-related influence of inflammatory stimuli on the hyperalgesia induced by the nucleus pulposus. *Eur Spine J*. 2012;21(3):537–545. doi:10.1007/s00586-011-2027-8.
194. Moon HJ, Kim JH, Lee HS, et al. Annulus fibrosus cells interact with neuron-like cells to modulate production of growth factors and cytokines in symptomatic disc degeneration. *Spine*. 2012;37(1):2–9. doi:10.1097/BRS.0b013e31820cd2d8.
195. Balduini C, De Luca G, Passi A, Rindi S, Salvini R, Scott JE. Effect of oxygen tension and lactate concentration on keratan sulphate and chondroitin sulphate biosynthesis in bovine cornea. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1115(3):187–191.
196. Vernengo J, Fussell GW, Smith NG, Lowman AM. Evaluation of novel injectable hydrogels for nucleus pulposus replacement. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2008;84(1):64–69. doi:10.1002/jbm.b.30844.
197. Lally S, Mackenzie P, LeMaitre CL, Freemont TJ, Saunders BR. Microgel particles containing methacrylic acid: pH-triggered swelling behaviour and potential for biomaterial application. *J Colloid Interface Sci*. 2007;316(2):367–375. doi:10.1016/j.jcis.2007.08.030.
198. Crevensten G, Walsh AJL, Ananthakrishnan D, et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng*. 2004;32(3):430–434.

199. Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, Freemont AJ, Hoyland JA. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials*. 2008;29(1):85–93. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.018.