

DÉLIO EULÁLIO MARTINS FILHO

**Densidade de células metabolicamente ativas nos
discos intervertebrais lombares de humanos e sua
relação com a vascularização da placa terminal**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2014

DÉLIO EULÁLIO MARTINS FILHO

**Densidade de células metabolicamente ativas nos
discos intervertebrais lombares de humanos e sua
relação com a vascularização da placa terminal**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. Dr. FLÁVIO FALOPPA
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. EDUARDO B. PUERTAS
Prof. Dra. VALQUÍRIA P. DE MEDEIROS

SÃO PAULO

2014

Martins, Délio Eulálio.

Densidade de células metabolicamente ativas nos discos intervertebrais lombares de humanos e sua relação com a vascularização da placa terminal./

Délio Eulálio Martins.--São Paulo, 2014.

xix, 148f

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Density of viable cells in humans lumbar intervertebral discs and their relationship with the vascularization of the endplate.

1.Sobrevivência celular. 2. Disco intervertebral. 3. Permeabilidade 4. Cartilagem. 5. Porosidade. 6. Processos nutricionais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSLACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais Délio Eulálio Martins (*in memoriam*) e Maria do Socorro Albuquerque Martins, que foram responsáveis pela minha formação pessoal e profissional e sempre me incentivaram a ousar, questionar e, principalmente, ser curioso em relação a tudo.

À minha amada Esposa, que sempre esteve ao meu lado, incondicionalmente, nos momentos mais difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, sempre me fazendo acreditar que essa etapa chegaria ao fim e de forma gratificante. Sou grato por cada gesto carinhoso, cada sorriso, e ansioso por estar ao seu lado o resto da minha vida. Obrigado Cris, meu amor, minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos de trabalho que resultaram nesta tese, pessoas e instituições ajudaram-me, ensinando-me e apoiando-me. Agora que alcanço meus objetivos não poderia deixar de reconhecê-las.

Ao **Prof. Dr. Flávio Faloppa**, Professor Titular Livre-Docente do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela seriedade que encara a pesquisa e pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Barros Puertas**, Professor Associado Livre-Docente da Disciplina de Ortopedia do Departamento de Ortopedia e Traumatologia e Chefe do Grupo de Coluna Vertebral da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, por todos os ensinamentos e pelas constantes demonstrações de sabedoria, humildade e amizade.

À **Prof^a. Dra. Valquíria Pereira de Medeiros**, Professora Adjunta do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos transmitidos, pelos estímulos ao longo de todo o trabalho, pela competência e exemplo de perseverança, e, principalmente, pela amizade construída.

À **Prof^a. Dra. Rejane Daniele Reginato**, Professora Adjunta da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética e Chefe da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela colaboração inestimável, pelas proveitosas discussões e pelo apoio constante na execução desse trabalho.

À **Prof^a. Dra. Helena Bonciani Nader**, Professora Titular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela oportunidade, confiança e exemplo de seriedade no tratamento da ciência e pesquisa no País.

Ao **Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino**, Professor Titular Livre-Docente do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade do início desse estudo, no qual não existiria sem a sua colaboração.

À **Prof^a. Dra. Jill Urban** do “Department of Physiology, Anatomy and Genetics” da Universidade de Oxford, Inglaterra e à **Prof^a. Dra. Sally Roberts** do “Centre for Spinal Studies (Keele University) and Robert Jones & Agnes Hunt Orthopaedic Hospital”, Oswestry, Inglaterra pelo acolhimento e dias que passei nos seus laboratórios, pelas ideias e estruturação deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero**, Professor Afiliado do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelas inúmeras correções, discussões e análises significativas de métodos e resultados e também pela constante disponibilidade e disposição para ajudar.

Ao **Prof. Dr. Valdeci Manoel de Oliveira**, Professor Adjunto da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, pelo constante apoio desde o início dessa jornada com o projeto para obtenção do título de Mestre, pela amizade e colaboração para a concretização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Wajchenberg**, Professor Afiliado do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelas discussões enriquecedoras de resultados e pela grande amizade.

De forma coletiva, preciso registrar meus agradecimentos a todos os amigos que fiz no Laboratório de Biologia Molecular da UNIFESP/EPM, em especial a **Elsa Yoko Kobayashi, Aline Mendes, Camila Accardo, Gabriela Demerov, Isabel dos Santos, Marcelly Palladino, Prof Dr. Marcelo Lima, Maria Cecilia Meneghetti, Marcus Vinícius Buri e Renan Cavalheiro**, e aos amigos do Laboratório de Histologia da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, em especial à **Prof^ª. Dra. Rita de Cássia Lapa, a Patrícia Gonçalves, Rafael Pacheco da Costa e Mariana Freitas de Jesus**, que tanto me ajudaram em diferentes etapas deste estudo e, principalmente, pela amizade criada.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico por Imagem da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina pela ajuda na aquisição das imagens de Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada.

Aos funcionários do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo, por todo o apoio e ajuda na captação das amostras.

Às famílias dos pacientes que concordaram gentilmente em participar da pesquisa, doando as colunas de seus entes queridos.

Às secretárias da Pós-Graduação, **Patrícia Precioso, Sandra da Silva, Roseli Paschoa**, pela presteza admirável em administrar as inúmeras questões burocráticas.

À FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo fomento concedido para a realização deste projeto (2009/54793-6).

À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Ensino Superior, pelo apoio financeiro como bolsista de doutorado.

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única,
e nenhuma substitui outra.

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos
deixa sós.

Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.

Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada.

Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada.

Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que nada
é ao acaso”.

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xv
Resumo	xix
1. Introdução	1
2. Objetivo	9
3. Literatura	11
4. Métodos	39
5. Resultados	61
6. Discussão	89
7. Conclusão	102
8. Referências	104
Normas Adotadas	113
Abstract	115
Apêndices	117
Anexos	142
Fontes Consultadas	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho de uma unidade funcional da coluna lombar de humanos	02
Figura 2: Esquema representativo do agregam e do condroitim sulfato.....	04
Figura 3: Representação esquemática da vascularização do disco intervertebral	05
Figura 4: Representação da classificação de degeneração de discos intervertebrais lombares de acordo com Pfirrmann	42
Figura 5: Exemplo de imagem de Ressonância Magnética de coluna do grupo 1	43
Figura 6: Exemplo de imagem de Tomografia Computadorizada de coluna do grupo 1	44
Figura 7: Fotografia de uma coluna lombar sendo preparada para as análises	45
Figura 8: Vista lateral do fragmento após incubação com MTT	46
Figura 9: Vista lateral de fragmento para análise histológica	47
Figura 10: Imagem representativa da análise de viabilidade celular no disco intervertebral	49
Figura 11: Imagem dos orifícios vasculares no núcleo pulposo	50
Figura 12: Imagem binária de orifícios vasculares no núcleo pulposo ...	50
Figura 13: Cromatograma dissacarídeos de padrões de condroitim sulfato	54
Figura 14: Cromatograma de padrões de ácido hialurônico	56
Figura 15: Viabilidade celular das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2	64

Figura 16: Distribuição da percentagem de células metabolicamente ativas nas diferentes regiões dos discos intervertebrais	65
Figura 17: Imagens representativas dos orifícios vasculares na placa terminal	66
Figura 18: Número de orifícios vasculares por região nos discos intervertebrais do Grupo 1	67
Figura 19: Gráfico da distribuição do número de orifícios vasculares por região no disco intervertebral do Grupo 2	68
Figura 20: Número de orifícios vasculares nas diferentes regiões da placa terminal superior nos grupos 1 e 2	68
Figura 21: Comparação do número de células estimado nas diferentes regiões do disco nos grupos 1 e 2	70
Figura 22: Lâminas de eletroforese em gel de PDA	71
Figura 23: Comparação da quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados nos grupos 1 e 2	71
Figura 24: Lâminas de eletroforese em gel de PDA após incubação para degradação enzimática	72
Figura 25: Distribuição de dissacarídeos nas diferentes regiões do disco intervertebral no grupo 1	73
Figura 26: Distribuição de dissacarídeos formados pela ação das enzimas condroitinase AC e condroitinase ABC nas diferentes regiões do disco intervertebral no grupo 2	74
Figura 27: Distribuição da porcentagem de dissacarídeos formados pela ação das enzimas condroitinase AC e condroitinase ABC nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 (G1) e 2 (G2) ...	74

Figura 28: Comparação da distribuição de dissacarídeos formados pela ação da condroitinase AC nas diferentes regiões do disco intervertebral no grupo 1 e 2	75
Figura 29: Comparação da dosagem de ácido hialurônico nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2	77
Figura 30: Cromatograma da análise de peso molecular do ácido hialurônico	78
Figura 31: Perfil dos íons sódio e potássio nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2	80
Figura 32: Comparativo da relação entre fibras colágenas esverdeadas/avermelhadas nos discos intervertebrais nos grupos 1 e 2 .	82
Figura 33: Fotomicrografias de cortes histológicos das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2 evidenciados com pico-sírius red	83
Figura 34: Fotomicrografias de cortes histológicos das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2 submetidos a imunohistoquímica para colágeno tipo II	84
Figura 35: Fotomicrografias de cortes histológicos das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2 submetidos a imunohistoquímica com anticorpo anti CD-31	86
Figura 36: Fotomicrografias de cortes histológicos das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2 submetidos a imunohistoquímica com anticorpo anti PGP9.5	87
Figura 37: Fotomicrografias de cortes histológicos de controle e ânulo fibroso posterior do disco intervertebral do grupo 2 submetidos a imunohistoquímica com anticorpo anti PGP9.5	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos indivíduos por grupo etário	62
Tabela 2: Descrição dos orifícios vasculares nas placas terminais inferior e superior nos grupos 1 e 2	67
Tabela 3: Descrição do número de orifícios vasculares nas diferentes regiões das placas terminais nos grupos 1 e 2	69
Tabela 4: Relação entre os dissacarídeos formados pela ação da condroitinase AC nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2	76
Tabela 5: Análise comparativa da dosagem de ácido hialurônico nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2	77
Tabela 6: Análise comparativa da distribuição iônica nas diferentes regiões do disco intervertebral em cada grupo	79
Tabela 7: Análise de correlações de Pearson entre as variáveis analisadas	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFa	ânulo fibroso anterior
AFp	ânulo fibroso posterior
bit	dígito binário
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
Cetavlon	brometo de cetiltrimetilamônia
cm	centímetro
CS	condroitim sulfato
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> (4',6-diamidino-2-fenilindol)
ΔDi-0S	2-acetamido-2deoxi-3-O-(ácido β-D-gluco-4-enepiranosilurônico)-D-galactose
ΔDi-4S	(2-acetamido-2deoxi-3-O-(ácido β-D-gluco-4-enepiranosilurônico)-4-O-sulfo-D-galactose)
ΔDi-6S	2-acetamido-2deoxi-3-O-(ácido β-D-gluco-4-enepiranosilurônico)-6-O-sulfo-D-galactose
DIC	<i>differential interferencial contrast</i> (contraste de interferência diferencial)
D-MEM	meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMMB	<i>dimethyl methylene blue</i> (azul de dimetilmetileno)
DNA	ácido desoxidoribonucleico
DS	dermatam sulfato
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiamino tetraacético)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio imuno enzimático)

EPM	Escola Paulista de Medicina
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (e outros)
FOV	<i>field of view</i> (campo de visão)
GAGs	glicosaminoglicanos
°C	grau Celsius
HA	ácido hialurônico
HCl	ácido clorídrico
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> (4-(2-hidroxietyl)1-ácido piperazinetanosulfônico)
Hoechst	família de corantes fluorescentes para marcar DNA
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
IMC	índice de massa corpórea
kDa	quilo Dalton
KS	queratam sulfato
kV	quilovolt
l	litro
L1	primeira vértebra lombar
L2	segunda vértebra lombar
L3	terceira vértebra lombar
L4	quarta vértebra lombar
L5	quinta vértebra lombar
<	menor que
>	maior que
M	molar
mA	miliampere
mAU	unidades de mili absorvância

min	minuto
mg	miligrama
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
N	normal
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetros
NP	núcleo pulposo
°C	graus Celsius
p	nível de significância
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia de polimerase)
PDA	1,3 diamino propano acetato
PGs	proteoglicanos
pH	potencial hidrogênionico
®	marca registrada
r	coeficiente de correlação
R ²	coeficiente de determinação
RM	ressonância magnética
rpm	rotações por minuto
S1	primeira vértebra sacral
TC	tomografia computadorizada
TCLE	termo de consentimento livre esclarecido
TE	tempo de emissão
TR	tempo de relaxamento

Tris	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> (tris(hidroximetil) aminometano)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> (Terminal deoxinucleotídeo transferase mediado pela 5' desoxiuridina trifosfato)
µg	microgramas
µm	micrômetros
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
V	volt

RESUMO

Introdução: O disco intervertebral é avascular e não se sabe se apresenta capacidade de manter células ativas no seu interior ao longo dos anos. A vascularização da placa terminal tem influência direta no aporte de nutrientes para essas células. **Objetivo:** Analisar a vascularização da placa terminal e sua relação com a densidade de células metabolicamente ativas nos discos intervertebrais lombares de humanos adultos jovens e senis. **Métodos:** Foram utilizados 28 discos intervertebrais lombares de humanos divididos em dois grupos: Grupo 1 (n=15; menos de 50 anos de idade; \leq grau 3 de Pfirrmann) e Grupo 2 (n=13; maior ou igual a 80 anos, \geq grau 4 de Pfirrmann). A vascularização das placas terminais foi analisada utilizando Stereo Microscope Discovery[®] V.8. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. A densidade celular total foi quantificada por técnica de PicoGreen[®] utilizando a quantidade de DNA como estimativa do número total de células. **Resultados:** As células mantiveram-se estáveis em percentual de viabilidade celular em relação ao seu número total. A placa terminal inferior apresentou maior quantidade de orifícios ($p < 0,05$). A maior quantidade de células foi encontrada nas regiões do ânulo fibroso ($p < 0,05$). Houve correlação positiva ($p < 0,05$) entre a densidade de células metabolicamente ativas e a quantidade de orifícios vasculares da placa terminal inferior. **Conclusão:** A placa terminal inferior é a principal região de aporte de vasos sanguíneos para a nutrição do disco intervertebral e tem relação direta no número de células metabolicamente ativas.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

As vértebras da coluna vertebral são intercaladas por um disco intervertebral formando a articulação entre os corpos vertebrais, compondo, assim, uma unidade funcional. O disco é uma estrutura altamente organizada e complexa que permite movimento e resistência entre os corpos vertebrais. Estruturalmente constituído por: núcleo pulpos, ânulo fibroso e placa terminal do planalto vertebral (figura 1).

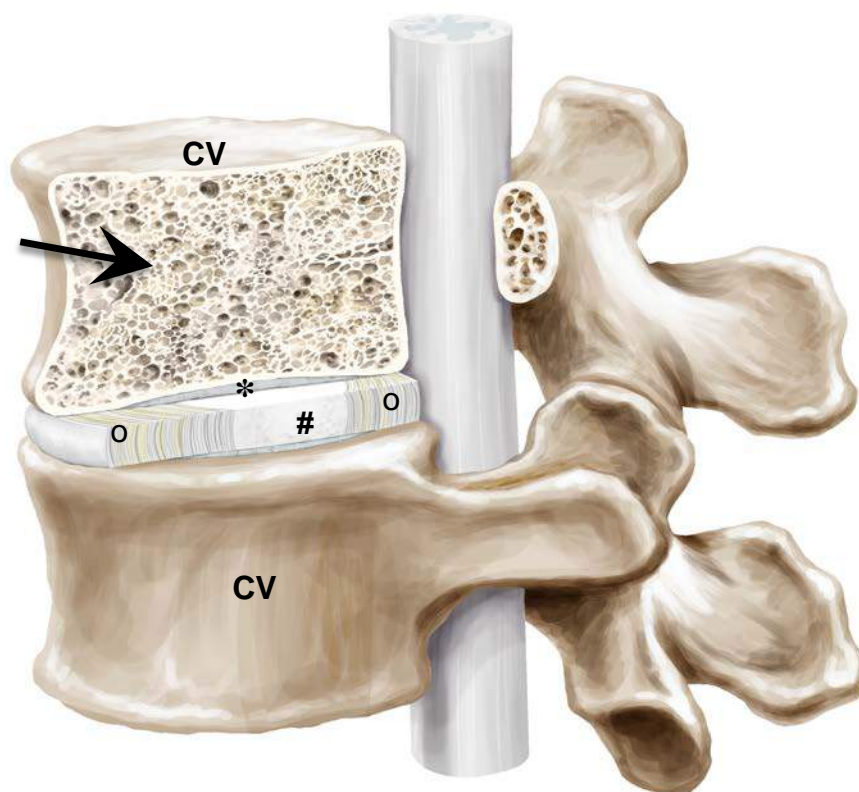


Figura 1: Desenho de uma unidade funcional da coluna lombar de humanos. Composta por dois corpos vertebrais adjacentes (CV), sendo que o superior encontra-se seccionado no plano sagital demonstrando a porosidade do osso (seta). Entre os corpos vertebrais, encontra-se o disco intervertebral com as regiões: placa terminal (*), núcleo pulposo (#) e ânulo fibroso (o).

O núcleo pulposo é formado por proteoglicanos e água envoltos frouxamente em uma fina rede de colágeno, principalmente do tipo II, elastina e células que se assemelham a condrócitos (ROBERTS *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2011). O ânulo fibroso é formado por lamelas concêntricas de colágeno, principalmente do tipo I, e por células alongadas semelhantes a fibroblastos (ROUGHLEY, 2004; CHAN *et al.*, 2011).

O agrecom é o proteoglicano mais abundante em todo o disco intervertebral, contendo principalmente condroitim sulfato (CS) e queratam sulfato (KS) ligados a uma proteína central. O agrecom apresenta três domínios (unidades funcionais tridimensionais da proteína), sendo dois deles próximos à região amino terminal e o terceiro na região carboxi terminal da proteína central. Entre o segundo e o terceiro domínio existem cerca de 100 cadeias laterais de CS e, próximo ao domínio 2, há aproximadamente 30 cadeias de KS. Um único ácido hialurônico liga-se a aproximadamente 100 moléculas de agrecom por meio de uma proteína de ligação próximo ao domínio 1 (figura 2).

Os glicosaminoglicanos são moléculas lineares compostas por unidades dissacarídicas repetitivas contendo uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um ácido urônico (glucurônico ou idurônico) ou uma galactose (figura 2). Excetuando-se o ácido hialurônico, todos os outros glicosaminoglicanos (condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato e queratam sulfato) podem ter um grupamento sulfato nas posições 2, 3, 4 e 6 do componente hidroxil. O disco intervertebral contém várias isoformas sulfatadas de CS, principalmente condroitim 4-sulfato (C4S) e condroitim 6-sulfato (C6S), sendo este último o mais abundante. (MOURÃO *et al.*, 1976; SIVAN *et al.*, 2014). Dessa forma, resultam cadeias carregadas negativamente que atraem e retêm água, promovendo

resistência à compressão (ROUGHLEY, 2004; CHAN *et al.*, 2011; SIVAN *et al.*, 2014).

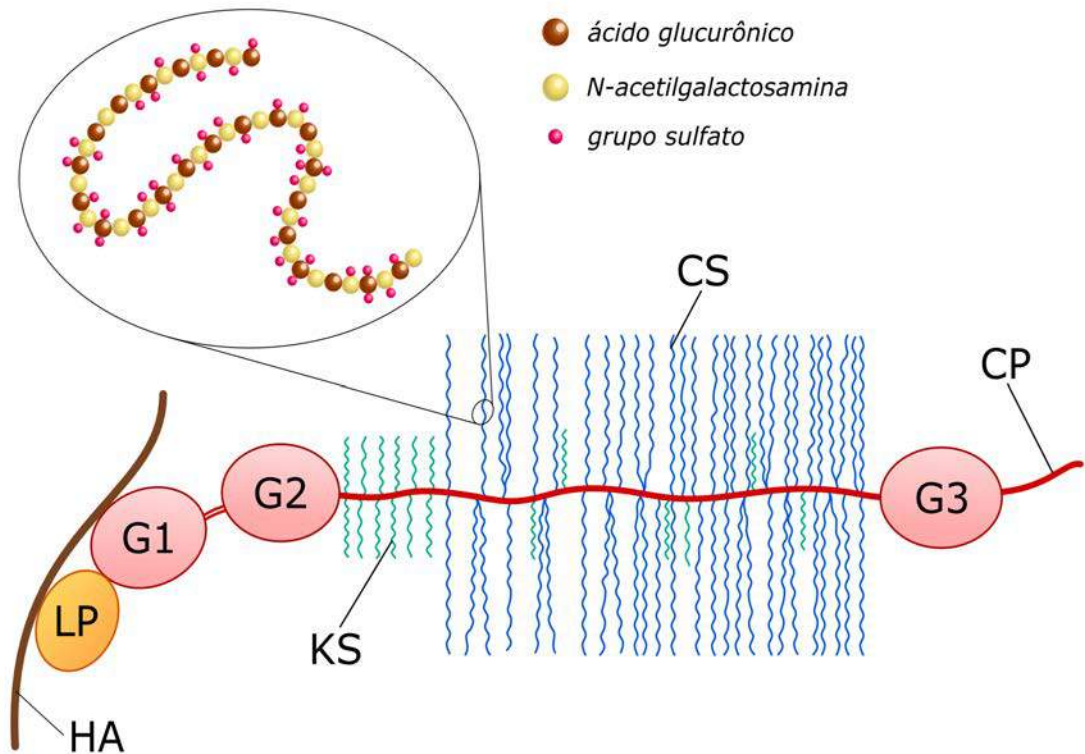


Figura 2: Esquema representativo do agregado de condroitina sulfato. A proteína central (CP) encontra-se ligada ao ácido hialurônico (HA) por meio da proteína de ligação (LP). Os domínios da região amino-terminal estão representados por G1 e G2; e na região carboxi terminal encontra-se o terceiro domínio (G3). As cadeias de queratana sulfato (KS) estão ligadas à proteína central logo após o segundo domínio e as cadeias de condroitina sulfato (CS), em maior quantidade, localizadas um pouco antes de G3. No destaque, representação esquemática do CS formado por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido glucurônico e N-acetilgalactosamina.

A degradação dos proteoglicanos no disco intervertebral tem início precoce, assim como a diminuição de água, principalmente na região do núcleo pulposo (ANTONIOU *et al.*, 1996). O disco intervertebral

desenvolve-se com alguns vasos sanguíneos, sendo que estes provêm das terminações vasculares advindas do arcabouço ósseo do corpo vertebral, as quais atravessam o tecido pericondral circundante ao disco intervertebral (placa vertebral terminal rudimentar) e terminam entre as lamelas de colágeno do ânulo fibroso (CROCK & YOSHIZAWA, 1975) (figura 3). No entanto, na idade adulta, passa a ser considerado a maior estrutura avascular do corpo humano.

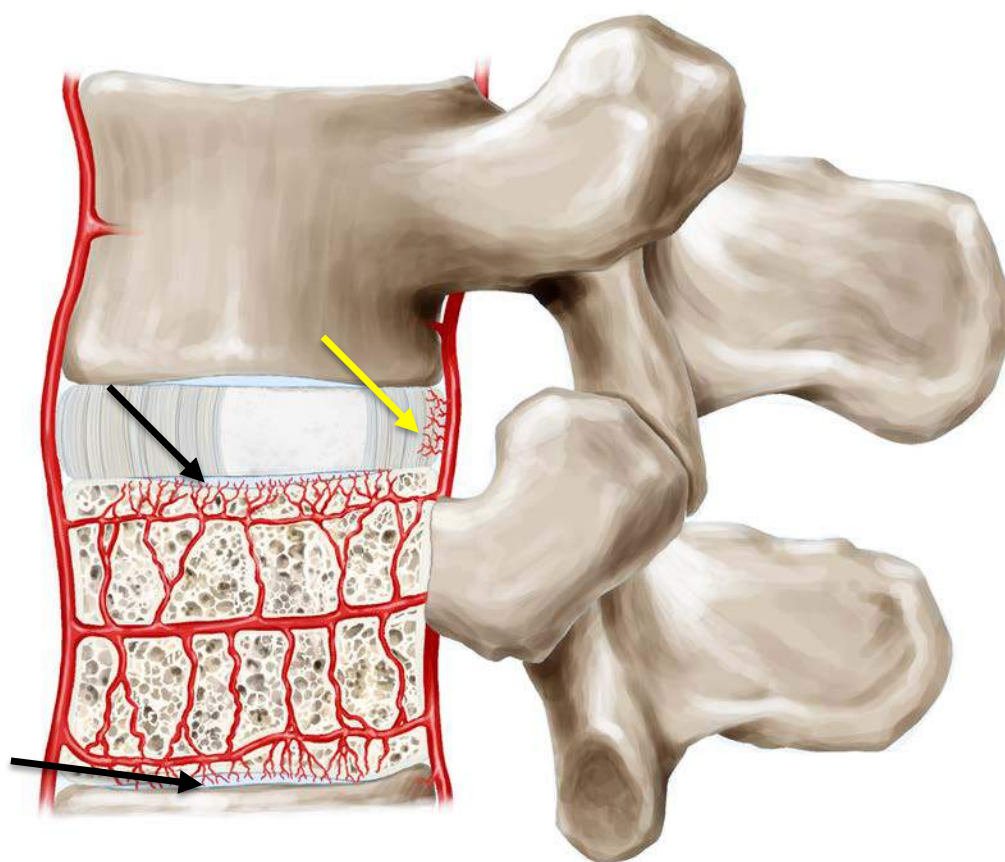


Figura 3: Representação esquemática da vascularização do disco intervertebral. As terminações vasculares penetram a placa terminal do disco intervertebral (setas pretas) e o terço externo do ânulo fibroso (seta amarela).

Essa peculiaridade da vascularização do disco contribui para a baixa concentração de células, principalmente no núcleo pulposo (ROBERTS *et al.*, 2006). A densidade celular varia nas diferentes regiões do disco intervertebral e diminui com a idade, em parte, decorrente do abundante crescimento de matriz extracelular (ROBERTS, MENAGE, URBAN, 1989). Na fase adulta, estima-se que o número de células seja de 4×10^6 células/cm³ no núcleo pulposo e 9×10^6 no ânulo fibroso (MAROUDAS *et al.*, 1975). Além disso, há um elevado índice de apoptose e as células remanescentes produzem matriz extracelular modificada (GRUBER & HANLEY, 1998).

A viabilidade celular depende da sua nutrição que, no disco intervertebral, ocorre principalmente por transporte passivo do tipo difusão. A região central da placa terminal é o principal sítio anatômico de ocorrência deste processo (ROBERTS, MENAGE, URBAN, 1989). A composição bioquímica da placa terminal é semelhante ao das cartilagens articulares e a matriz extracelular é a mesma que no núcleo pulposo, porém, as cadeias de CS são mais longas e o colágeno, mais horizontalizado e organizado (ROBERTS *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2011).

Com a ocorrência do processo degenerativo discal, a concentração de proteoglicanos na região central da placa terminal é reduzida, ocasionando diminuição gradual do fluxo de entrada de solutos que deveriam se deslocar para o interior do disco intervertebral (ROBERTS, MENAGE, URBAN 1989).

O transporte de nutrientes depende das características da placa terminal que permite a comunicação do suprimento sanguíneo proveniente do corpo até o disco intervertebral (ROBERTS *et al.*, 1996). A oclusão de capilares na região da placa terminal diminui a nutrição das células do disco, dificultando a manutenção da matriz (BENNEKER *et al.*, 2005b).

Outro fator importante para a manutenção das células do disco é a compressão que, quando realizada de forma intermitente, pode favorecer a viabilidade dessas células por mecanismo de fluxo de líquido ou mesmo por estímulo ao metabolismo da matriz (ROUGHLEY, 2004). No entanto, altas cargas axiais diárias, às quais são submetidos os discos da região lombar, podem prejudicar o metabolismo celular (HUTTON *et al.*, 1999; LOTZ & CHIN, 2000).

A perda da homeostase e consequente alteração do metabolismo e viabilidade das células do disco intervertebral promovem a doença degenerativa discal, que pode estar relacionada com a lombalgia (ROUGHLEY, 2004; ADAMS & ROUGHLEY, 2006; CHAN *et al.*, 2011). Entretanto, a origem da dor lombar ainda está sob investigação, pois, nos discos intervertebrais, existem poucos nociceptores e estes se encontram sempre localizados no ânulo fibroso (ROBERTS *et al.*, 1995; OLIVEIRA, 2001; OLIVEIRA, 2005).

As bases biológicas para o bom funcionamento do disco saudável fundamentam-se na função celular, mas pouco se sabe sobre como essas células cruzam a linha entre o envelhecimento e a degeneração. Compreender o funcionamento normal de um disco intervertebral é o primeiro passo para entender o processo de artrose e da origem da dor lombar.

Terapias atuais focam o tratamento da dor lombar na artrodese ou remoção de tecido discal, porém, não se sabe se o disco tem capacidade de autorreparação, ou se, na ausência de um mecanismo próprio, estímulos biológicos pelos quais células, fatores de crescimento ou outras substâncias possam ser introduzidos com alguma chance de sucesso. Dessa forma, a investigação da vascularização da placa terminal como forma de aporte de

nutrientes e retirada de catabólitos das células metabolicamente ativas foi o principal interesse do nosso estudo.

OBJETIVO

Objetivo

Analisar a vascularização da placa terminal e sua relação com a densidade de células metabolicamente ativas nos discos intervertebrais lombares normais de humanos adultos jovens e degenerados de adultos senis.

LITERATURA

3. Literatura

MAROUDAS *et al.* (1975) buscando conhecer melhor sobre a permeabilidade da placa terminal na região central do disco intervertebral e através da região do ânulo fibroso, realizaram estudo quantitativo *in vitro* da difusão de glicose relacionando com a celularidade do disco. Utilizaram discos entre a quarta e a quinta vértebras lombares (L4-L5) obtidos de necropsia de três pacientes (15, 18 e 56 anos de idade) que, após descalcificação, foram preparados em blocos de parafina e corados com hematoxilina/eosina. Os autores avaliaram a celularidade por quantificação do número de núcleos entre a placa terminal superior e inferior e entre a região anterior e posterior do disco. Para o estudo de difusão utilizaram dez discos de indivíduos com idade entre 18 e 80 anos que, colocados em uma câmara de difusão, permitiram a visualização de vasos sanguíneos somente na margem externa do ânulo fibroso, de forma homogênea, em todo o disco, porém, como se distribuem de forma horizontal, não foi possível quantificar. As células da cartilagem da placa terminal são arredondadas, as do ânulo fibroso alongadas e as células do núcleo pulposo apresentam formas variadas, com núcleos esferoides, de forma individual ou em grupos de seis ou mais células. A celularidade foi baixa e heterogênea nas diversas regiões, sendo mais numerosa nas áreas próximas à placa terminal e ao ânulo fibroso e menor no núcleo pulposo. Observaram que no ânulo fibroso havia duas vezes mais células e na placa terminal quatro vezes mais células do que no núcleo pulposo. A densidade estimada no núcleo pulposo foi de 4000 células/mm³ e no ânulo fibroso 9000 células/mm³. A permeabilidade da placa terminal foi inferior à do ânulo fibroso quando não foi considerada a região calcificada das placas que apresentou permeabilidade praticamente ausente. Quando a placa foi avaliada em sua totalidade, os coeficientes

foram semelhantes. Os autores concluem que as células do disco intervertebral estão bem adaptadas às diferenças de permeabilidade e ao suprimento nutricional de cada área.

CROCK & YOSHIZAWA (1976) preocupados com a falta de conhecimento adequado sobre a vascularização da coluna lombar e com os efeitos que isso pudesse gerar durante procedimentos cirúrgicos dessa região, fizeram uma descrição detalhada do suprimento vascular. Sabendo que cada artéria lombar origina três ramos importantes sendo direcionados para a parede do corpo vertebral, canal vertebral e elementos posteriores, os autores descreveram o padrão de vascularização no interior dos corpos vertebrais, onde as artérias se concentram na região central do corpo e arteríolas emergem verticalmente em direção às placas terminais superior e inferior na região mais central do disco intervertebral. As áreas periféricas são nutridas por arteríolas provenientes de artérias arqueadas da parede anterior do canal vertebral que penetram e cruzam o disco intervertebral na região do terço externo.

HARDINGHAM & ADAMS (1976) descreveram método para determinação de ácido hialurônico (AH) na presença de outros glicosaminoglicanos (GAGs) e sua aplicação no disco intervertebral humano. Utilizaram apenas dois discos, sendo um de uma criança de cinco anos de idade e outro de mulher adulta de 65 anos de idade. Após desidratadas, as amostras foram digeridas em papaína e tiveram os GAGs extraídos por precipitação com cloreto de cetilpiridínio. Por meio de cromatografia, tiveram a quantidade de ácido urônico determinada. Demonstraram uma grande quantidade de AH presente no disco

intervertebral, principalmente no núcleo pulposo, acompanhando o mesmo padrão de distribuição dos GAGs.

MOURÃO *et al.* (1976) interessados em compreender o papel do grau do condroitim 4-sulfato e do condroitim 6-sulfato na formação de cartilagem e osso em humanos, avaliaram vértebras torácicas e epífises de tíbia e fêmur de dez cadáveres entre 1 e 46 anos de idade. Após caracterização, os dissacarídeos foram quantificados por densitometria. Observaram grande quantidade de Δ Di-4S (2-acetamido-2deoxy-3-O-(β -D-gluco-4-enepyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose e Δ Di-6S (2-acetamido-2deoxy-3-O-(β -D-gluco-4-enepyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose em todas as cartilagens avaliadas. Nas vértebras torácicas observaram, em todas as idades estudadas, maior concentração de Δ Di-6S (86,6 %) em relação ao Δ Di-4S (13,4 %). Também observaram que o Δ Di-6S foi o principal condroitim sulfato de cartilagens articulares de crianças e adultos, enquanto Δ Di-6S e Δ Di-4S ocorrem em iguais proporções na placas de crescimento de ossos longos de humanos, sugerindo que essas características são de espécies específicas, pois diferem de resultados encontrados em bovinos.

URBAN & MAROUDAS (1979) estudaram como cargas iônicas em discos jovens e velhos influenciam a perda de GAGs, desenvolvendo técnica para avaliar experimentalmente a distribuição da densidade de cargas no disco intervertebral. Analisaram discos de cadáveres quanto à quantidade de água, concentração de ácido urônico, hexosamina. Consideraram que apenas existia condroitim sulfato (CS) e queratam sulfato (KS), e o KS foi estimado como sendo a diferença entre o número

total e a quantidade de CS. Encontraram também em torno de 4% de ácido hialurônico que não foi levado em consideração nas análises. Usaram marcadores radioativos para calcular a carga iônica. Observaram que a densidade de carga variou abruptamente da região mais interna do ânulo para a área mais externa. A área com maior quantidade de água foi o núcleo pulposo, com 4,5 mg/g de massa seca (82%) e o ânulo fibroso mais externo com 1,5 mg/g de massa seca. O efeito de carga do disco intervertebral aumenta a penetração de cátions, principalmente o Na^+ em proporção direta que os GAGs, enquanto ânions como sulfato e cloro são parcialmente excluídos. Concluem que os íons afetam a nutrição dos discos da seguinte forma: solutos sem carga, como oxigênio e glicose, penetram no disco pela periferia do ânulo fibroso e pela placa terminal de formas iguais; para solutos carregados negativamente, como íons sulfato, devido à grande carga negativa no núcleo pulposo, a entrada seria principalmente pela periferia do ânulo fibroso, evitando a placa terminal e, para solutos carregados positivamente, como sódio e cálcio, a placa terminal é a rota preferencial.

JUNQUEIRA, MONTES, SANCHEZ (1982) estudaram a influência da espessura do corte histológico na cor e birrefringência do colágeno marcado com método de picro-sirius. Observaram cortes com espessuras variando de 0,25 a 11 μm e notaram que a intensidade da birrefringência aumenta com a espessura do corte, podendo haver pequenas mudanças nas tonalidades observadas. Referem que a cor e intensidade da birrefringência são decorrentes da espessura da fibra de colágeno. Afirmam que a grande maioria das fibras de colágeno tipo I formam fibras espessas, pois são compostas por fibrilas bem compactas e, portanto, são vistas, por essa técnica, na luz polarizada com tons variando de amarelo a vermelho. O

colágeno tipo III é formado por fibras reticulares com fibras finas e frouxas e, por isso, aparecem com tons esverdeados. O colágeno tipo II não forma fibras e está disposto de forma frouxa e desorganizada, resultando em uma baixa birrefringência de cor variada, dependendo da interação com a matriz.

COLE *et al.* (1985) interessados na caracterização e quantificação de proteoglicanos no disco intervertebral, estudaram disco, de seis cães após marcação radioativa 24 horas e 60 dias antes da eutanásia, com sulfato de sódio em quatro animais e dois servindo de controle. Retiraram dois discos lombares por animal. Avaliaram os proteoglicanos por cromatografia e observaram que a região do núcleo pulposo apresentava maior quantidade de condroitim sulfato do que o ânulo fibroso. No entanto, não observaram diferenças na quantidade de condroitim sulfato e queratam sulfato nas regiões do disco nem nas proporções de condroitim 6-sulfato e condroitim 4-sulfato detectadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Identificaram a presença de dermatam sulfato, sugerindo que este glicosaminoglicano estivesse associado ao colágeno na matriz do disco intervertebral.

KRAEMER, KOLDITZ, GOWIN (1985) considerando a importância do sistema osmótico para a nutrição do disco intervertebral, avaliaram a concentração de água, sódio e potássio em diferentes regiões de 69 discos lombares de coluna humana antes e após carga. Os autores avaliaram os discos entre as vértebras L4-L5 colocando-os em um dispositivo de pressão com 6 kg/cm² ou 12 kg/cm² em câmara com umidade controlada por 24 horas. Utilizaram como controle os discos entre a segunda e terceira vértebras lombares (L2-L3) que não foram submetidos

a carga. No final do experimento, cinco fragmentos de diferentes regiões foram removidos, o conteúdo de água aferido e a quantidade de sódio e potássio medida em um fotômetro de chama. Dessa forma, foi observado que, sob carga, o ânulo fibroso (AF) perdeu 11% de água e o núcleo pulposo (NP) 8% e, em ambas as regiões, aumentaram o teor de sódio e potássio. Os autores concluíram que, após uma grande carga aplicada no disco, a concentração de eletrólitos eleva-se, aumentando a força osmótica de absorção, forçando o disco a reter água, mesmo sob carga intensa. Ao retirar a carga, há aumento de altura e volume do disco decorrente da absorção da água. O mecanismo de bomba, devido à carga axial intermitente ao longo do dia, mantém a nutrição e função biomecânica do disco intervertebral.

DAYAN *et al.* (1989) procurando esclarecer se a coloração de picro-sirius para colágeno é determinada unicamente pela espessura das fibras, realizaram estudo com 12 colágenos purificados dos tipos I, II, III e V. Os autores fixaram as amostras e coraram com técnica habitual e mensuraram com auxílio de microscópio calibrado o tamanho das fibras, considerando fibras finas as que apresentavam espessura de 0,8 μm ou menos e fibras espessas as que apresentavam entre 1,6 a 2,4 μm . No mínimo 50 fibras de cada tamanho, em cada amostra de colágeno, foram avaliadas por dois avaliadores independentes. Observaram que todas as fibras finas foram marcadas por tons de verde e as fibras espessas foram marcadas em tons de vermelho, entretanto, todos os pró-colágenos foram marcados em tons de verde. Os autores concluem que a espessura das fibras contribuem para determinar os diferentes comprimentos de onda vistos na luz polarizada após marcação com picro-sirius, porém, a organização das fibras também contribui na definição das cores observadas.

ROBERTS, MENAGE, URBAN (1989) procuraram avaliar a cartilagem da placa terminal conhecida por importância na nutrição do disco intervertebral e possível envolvimento na etiologia da dor lombar, descrevendo propriedades, bioquímicas e histológicas na coluna lombar de humanos jovens. Foram coletadas amostras de necropsia de pacientes com idades de 17, 25 e 35 anos. As colunas foram mantidas a -20°C até serem processadas. Foram realizadas secções das unidades funcionais na região central e os fragmentos foram divididos em pequenas amostras, alternando uma área para histologia e outra para bioquímica. Foram realizados blocos em parafina e resina e as lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina; azul de toluidina e pela técnica de Von Kossa, nos quais avaliaram: densidade celular da placa terminal, vascularização, estado de degeneração e calcificação. Foram avaliados bioquimicamente a quantidade de hidroxiprolina (colágeno) e proteoglicanos por azul de dimetilmetileno (DMMB). A densidade de células foi maior, mas não estatisticamente significativa, na região central da placa terminal em relação ao núcleo pulposo. A frequência de vasos sanguíneos foi significativamente maior na região central, quando comparada com a região anterior ou posterior do disco. Os autores observaram que a placa terminal diminuiu de tamanho na direção antero-posterior. Não houve diferença significativa na espessura da placa superior e inferior de cada disco. Houve diferença da quantificação bioquímica dependendo da região avaliada. A quantidade de hidroxiprolina diminuiu enquanto a de proteoglicanos e porcentagem de água aumentaram na direção do centro da placa terminal, da mesma forma que no disco intervertebral em direção ao núcleo. Não houve diferenças na quantificação de colágeno e proteoglicanos entre os diferentes níveis dos discos e placas terminais de L1 a S1. Nas regiões nas quais foram observados nódulos de

Schmorl foi identificado uma diminuição significativa do conteúdo de proteoglicanos.

OLCZYK (1994) avaliou as alterações da composição de glicosaminoglicanos (GAGs) em 301 discos intervertebrais de necropsias ou de cirurgias e observou que os GAGs diminuem ao longo dos anos, tanto no ânulo fibroso quanto no núcleo pulposo. Ainda observou que o Δ Di-6S é o dissacarídeo mais abundante no disco. Os discos com prolapso apresentavam quantidades menores de GAGs do que os discos coletados de cadáveres da mesma idade. Notou ainda diminuição linear de Δ Di-4S durante as primeiras seis décadas de vida. E que, durante o envelhecimento, há um aumento da relação Δ Di-6S/ Δ Di-4S. A diminuição da relação entre GAGs/colágeno foi mais evidente com o avançar da idade e, em discos adquiridos de cirurgias, teve relação duas vezes menor do que nas espécimes de cadáveres. Conclui que as alterações na composição dos GAGs podem ser importantes na predisposição para hérnia de disco.

ROBERTS *et al.* (1995) estudaram os discos intervertebrais e ligamentos longitudinais de bovinos e humanos para investigar a distribuição e a morfologia dos receptores mecânicos presentes nesta região e também relacionar com a dor lombar e com a escoliose. Por meio de marcadores imunológicos de nervos e neuropeptídios, os pesquisadores demonstraram a existência de receptores mecânicos no ânulo fibroso e ligamento longitudinal anterior das espécies bovina e humana. Sua morfologia assemelhava-se ao corpúsculo de Pacini, terminações de Ruffini e mais frequentemente com órgãos tendinosos de Golgi, que foram encontrados em 50% dos discos intervertebrais de pacientes com dor

lombar e em 15% dos pacientes portadores de escoliose. Os autores concluíram que os receptores mecânicos estão presentes na parte externa do ânulo fibroso do disco intervertebral e no ligamento longitudinal anterior de humanos. Estudos fisiológicos em outros tecidos indicam que os receptores de Pacini e Ruffini fornecem ao paciente propriocepção e movimento e os órgãos tendinosos de Golgi fornecem nocicepção. Os receptores mecânicos têm um papel adicional de manter o tônus muscular e os reflexos. Sua presença no disco intervertebral e no ligamento longitudinal anterior pode ter implicações clínicas e fisiológicas.

ANTONIOU *et al.* (1996) interessados em estudar a remodelação da matriz extracelular em diferentes regiões do disco intervertebral, utilizaram 25 colunas lombares (idades entre 12 semanas a 79 anos), num total de 121 discos, retiradas de cadáveres com até 18 horas de óbito. As colunas foram seladas a vácuo e mantidas a -20°C até as análises. As unidades funcionais foram separadas utilizando serra de alta velocidade a fim de diminuir a perda de tecido. Utilizaram a classificação morfológica de cinco categorias de Thompson para classificar os discos. Utilizaram lâmina de bisturi para retirar o restante do disco e separar em cinco regiões: ânulo fibroso anterior, região intermediária anterior, núcleo pulposo, região intermediária posterior e ânulo fibroso posterior. Essas áreas foram, ainda, cortadas em três fragmentos para obter uma secção em torno de 50 mg de massa e cada uma destas foi submetida a um ensaio bioquímico. Avaliaram o conteúdo total de colágeno desnaturado e de colágeno tipo II utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA). A determinação de nova síntese de agregam (epitopo 846) e procolágenos tipo I e tipo II foi realizada utilizando um radioimunoensaio e ELISA. A quantidade de água foi avaliada por desidratação. A dosagem total de colágeno foi avaliada pela quantificação

de hidroxiprolina e os GAGs foram analisados utilizando o método do DMMB. Observaram que a síntese de agregam, colágeno tipo I e tipo II são mais abundantes nos neonatos e entre 2 e 5 anos de idade. Nos discos degenerados e no grupo com idade entre 60 e 80 anos houve um aumento significativo nos níveis de epitopo de colágeno tipo I e colágeno tipo II. Concluíram que existem três fases de renovação de matriz: fase I (crescimento), caracterizada por síntese ativa de moléculas de matriz e desnaturação do colágeno tipo II; fase II (maturação e envelhecimento), apresentando queda progressiva na atividade de síntese e redução da desnaturação do colágeno e fase III (degeneração e fibrose), ausência de nova síntese de agregam e procolágeno tipo II, aumento na desnaturação do colágeno tipo II e do procolágeno tipo I, dependendo da idade e do grau de degeneração.

KIKUCHI, YAMADA, SHIMMEI (1996) investigaram a ação do ácido hialurônico (AH) de alto e baixo peso molecular na degeneração de cartilagem. Após provocarem degeneração da cartilagem de joelhos de coelhos, realizaram tratamento comparando soluções de AH de alto ($1,9 \times 10^6$ Da) e baixo ($0,8 \times 10^6$ Da) peso molecular. Cada solução foi aplicada de forma intra-articular duas vezes por semana. As alterações degenerativas foram avaliadas e graduadas de acordo com alterações histológicas duas e quatro semanas após o procedimento cirúrgico. Os autores observaram que o AH de alto peso molecular em joelhos de coelhos foi mais efetivo do que o de baixo peso molecular em inibir a degeneração da cartilagem.

ROBERTS *et al.* (1996) avaliaram as propriedades da placa terminal cartilaginosa no processo de transporte de nutrientes. Utilizaram 88 fragmentos de placa terminal provenientes de cirurgia ou de cadáveres e analisaram as propriedades de difusão com solutos radio-marcados, analisaram a quantidade de GAGs pelo método de DMMB e a quantidade de colágeno pela quantificação de hidroxiprolina. A calcificação foi medida utilizando imagens de radiografias e calculando a massa do sobrenadante após digestão com papaína. Observaram que a forma e o tamanho dos solutos afetam o seu transporte através da matriz, sendo as moléculas maiores as que apresentam difusão mais lenta. Moléculas redondas penetraram mais facilmente do que longas cadeias de polímeros. Quanto maior a hidratação, maior a facilidade de difusão dos solutos e, com aumento de proteoglicanos, colágeno ou calcificação, observou-se restrição ao transporte dos solutos. Os autores concluíram que os proteoglicanos presentes na placa terminal regulam o movimento dos solutos no disco intervertebral e que uma das funções da placa é prevenir a saída desses proteoglicanos osmoticamente ativos do interior do disco.

GRUBER & HANLEY (1998) avaliaram a distribuição e a quantidade de apoptose no ânulo fibroso de 33 discos provenientes de pacientes cirúrgicos e compararam os resultados com 39 discos provenientes de banco de tecidos, recentemente doados. Fragmentos do ânulo fibroso foram incluídos em parafina ou congelados para serem avaliados pela coloração de hematoxilina/eosina e pelas técnicas TUNEL, imuno-histoquímica e tricrômio de Goldner. Foi observada uma incidência significativamente maior de apoptose no grupo controle que foi associada à idade mais avançada desse grupo. Os autores concluíram que novos

avanços foram descobertos e que são necessários mais estudos para entender o processo de apoptose nas células do ânulo fibroso.

MOBASHERI (1998) estudou o mecanismo de retroalimentação entre o ambiente da matriz extracelular rica em GAGs e a regulação da bomba de Na^+/K^+ em cartilagem articular, avaliando cartilagens articulares de novilhos entre 18 e 24 meses de idade. A densidade fixa de carga no tecido foi realizada utilizando radioisótopo de Na^+ . A quantidade de GAGs foi medida por DMMB e a quantidade de DNA foi mensurada utilizando método fluorimétrico. A bomba de Na^+/K^+ foi medida utilizando técnica de ligação com a ouabaína (inibidor orgânico específico da bomba de Na^+/K^+). Observou correlação significativa entre a concentração de GAGs e Na^+ assim como com a bomba de Na^+/K^+ no tecido. Sugeriu relação direta entre a concentração de sódio extracelular (relacionado diretamente como os GAGs) e a densidade da bomba de Na^+/K^+ , indicando que os condrócitos são sensíveis ao ambiente iônico e respondem às variações locais de Na^+ com alteração direta na bomba de Na^+/K^+ .

URBAN *et al.* (1998) destacaram a possibilidade de avaliar a densidade de células por técnica de mensuração de DNA e, utilizando discos intervertebrais bovinos e cartilagem articular humana, avaliaram a fluorescência dos reagentes, nas amostras puras e também após digestão com nucleases. Os autores sugeriram que, para a realização das dosagens de discos intervertebrais e outros tecidos como ligamentos e tendões, o grau de autofluorescência do tecido deveria ser avaliado antes da utilização do Hoechst® 33258 para se ter uma estimativa real.

HUTTON *et al.* (1999) avaliaram a hipótese de que a pressão hidrostática afeta diretamente a síntese de colágeno e proteoglicanos pelas células do disco intervertebral. Utilizaram cultura de células de disco de cães e expuseram-nas a pressões controladas por até nove dias. Foram avaliadas as células do ânulo e do núcleo, observando a produção de colágeno (hidroxiprolina), proteoglicanos (radioatividade), proliferação celular (Hoechst® 33258). Avaliaram também, por reação em cadeia de polimerase (PCR), os colágenos tipo I e tipo II e o agregam. Os autores observaram que colágeno e proteoglicanos foram estimulados nas células do núcleo e inibidos no ânulo e que não houve variação na quantidade de células. Concluíram que a pressão hidrostática afeta diretamente as células do disco intervertebral.

INKINEN *et al.* (1999) avaliaram a distribuição do ácido hialurônico (AH) no disco intervertebral de humanos e cães. Utilizaram dez discos intervertebrais humanos de coluna lombar de cadáveres e seis discos de coluna torácica (análise quantitativa) e coluna lombar (análise histoquímica) de cães. Para a identificação do AH utilizaram sonda específica preparada de cartilagem bovina. Para a quantificação, o AH foi extraído e quantificado de acordo com a quantidade de ácido urônico na amostra. Observaram AH em todo o disco humano, mas principalmente na área do núcleo pulposo. A placa terminal de humanos também foi marcada, mas em menor intensidade que a placa terminal canina. O AH também foi abundante entre as lamelas de colágeno do ânulo fibroso de cães, sugerindo contribuição na plasticidade do tecido.

BORENSTEIN (2000) fez revisão narrativa sobre os principais aspectos da lombalgia, envolvendo epidemiologia, etiologia, critérios de diagnóstico, síndromes clínicas, tratamentos atuais e perspectivas.

LOTZ & CHIN (2000), interessados em determinar a relação da magnitude e duração de carga compressiva sobre a vitalidade celular, utilizaram 21 ratos em três grupos: carga constante compressiva por sete dias com um compressor percutâneo; compressão por um ou três dias; e um grupo não foi submetido a nenhuma carga. As pressões utilizadas foram similares e proporcionais às de humanos em ortostase, em deambulação e ao levantar uma pequena carga. Após a eutanásia dos animais, os discos foram avaliados para apoptose utilizando a técnica de TUNEL e os resultados foram relacionados com a carga aplicada. Os autores concluíram que a apoptose foi relacionada com a magnitude e a duração da carga.

PFIRRMANN *et al.* (2001) estabeleceram uma classificação da degeneração do disco intervertebral lombar por ressonância magnética (RM) em aparelho de 1 Tesla da Siemens. Foram analisadas a RM de 60 pacientes com média de idade de 40 anos (de 10 a 80 anos). Todos os exames foram avaliados por três examinadores e a degeneração discal foi graduada em cinco grupos (I a V), sendo que o grupo I apresenta estrutura homogênea do núcleo de cor branca e brilhante, a distinção entre o núcleo e ânulo é bem clara e o sinal hiperintenso; a altura do disco vertebral está normal. No grupo II, a estrutura é heterogênea com ou sem uma banda horizontal, o sinal é hiperintenso e a altura normal. O grupo III tem estrutura heterogênea de cor cinza, a distinção entre o núcleo e o ânulo é imprecisa, o sinal é intermediário e altura pode estar normal ou

ligeiramente reduzida. O grupo IV apresenta estrutura heterogênea com imagem cinza ou preta, a distinção entre o núcleo e o ânulo não existe; o sinal é hipointenso e a altura pode estar normal ou reduzida. O grupo V apresenta estrutura heterogênea preta, com sinal hipointenso e altura colapsada. Foi obtido um coeficiente de confiabilidade inter-examinadores de 0,69- 0,81 e intra-examinadores de 0,84 – 0,90. Os autores concluíram que o grau de degeneração discal pode ser graduado de forma confiável por RM ponderadas em T2.

McGOWAN *et al.* (2002) compararam os resultados das técnicas utilizando o Hoechst[®] 33258 e o PicoGreen[®] para quantificar DNA em cartilagem articular de côndilo femoral humano, de cadáveres jovens e senis e em cartilagens de septo nasal, retirados durante procedimento cirúrgico de septoplastia na mesma faixa etária. As cartilagens femorais foram avaliadas macroscopicamente e consideradas normais no grupo jovem e moderadamente degeneradas (grau 3, por Noyes e Stabler) no grupo velho. Após digestão em proteinase K, as amostras foram avaliadas quanto à fluorescência intrínseca dos digeridos, com excitação entre 250-500 nm e emissão entre 270-600 nm utilizando um fluorímetro Hitachi F-2000; foram avaliadas também a sensibilidade dos ensaios para detectar o realce da fluorescência após digestão com nucleases e a comparação dos testes nos grupos jovens e senis. Os autores observaram que o PicoGreen[®] pode ser utilizado para quantificar pequenas quantidades de DNA na cartilagem humana (0,9 ng DNA/ml) de forma rápida e mais sensível do que o Hoechst[®] 33258 (6 ng DNA/ml).

OLIVEIRA *et al.* (2001) estudaram terminações nervosas existentes na coluna lombar de humanos, utilizando cinco colunas de cadáveres de adultos jovens. Discos intervertebrais da L1 até L5 foram retirados, em um total de 25 discos. O material foi colhido e imediatamente fixado em formalina 10%. Foram feitos cortes de quatro micrômetros, submetidos à técnica de imuno-histoquímica para o anticorpo policlonal anti-proteína S100. Foi avaliada, de maneira interativa, toda a circunferência do disco intervertebral, com aumento de 400 vezes, com auxílio de um sistema de análise digital de imagem. Os autores encontraram terminações nervosas em toda a superfície externa e camada superficial do ânulo fibroso. Não foram encontradas terminações nervosas na camada interna do ânulo fibroso nem no núcleo pulposo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o número de terminações nervosas nas regiões laterais e posteriores do disco intervertebral.

ROUGHLEY (2004) realizou revisão sobre conhecimentos atuais acerca de alterações biológicas durante o desenvolvimento, amadurecimento e degeneração do disco intervertebral. Concluiu que, embora as pesquisas tentem restaurar a integridade da matriz extracelular, até o momento, não há consenso sobre em qual estrutura se deve atuar ou como pode ser alcançado o seu reparo.

BENNEKER *et al.* (2005a) avaliaram 39 discos intervertebrais de 8 cadáveres, entre 19 e 86 anos de idade, que foram removidos em até 48 horas após o óbito, minimizando alterações decorrentes da degradação enzimática na matriz celular. As imagens de ressonância magnética foram obtidas em até 12 horas após a retirada das colunas em um aparelho de 1,5 Tesla da General Electrics e foram classificadas por um radiologista de

acordo com a perda de sinal na ponderação em T2, como normal, moderada, severa e ausência de sinal. As unidades funcionais foram seccionadas com serra e os elementos posteriores, removidos. Quatro discos foram seccionados em cinco regiões: (AF externo anterior e posterior; AF interno anterior e posterior e NP). Para análises bioquímicas de colágeno e GAGs foram utilizadas as técnicas de mensuração da hidroxiprolina e DMMB, respectivamente. Para análise das placas terminais, os remanescentes das vértebras tiveram os discos seccionados transversalmente e todo o tecido mole foi digerido com papaína a 2% e, após preparo da superfície óssea com 30 nm de Ouro/Paládio, foram observadas em microscópio com foco estendido Zeiss Axiotech Vario 100 e quantificado o número de orifícios com mais de 10 μm nas placas terminais superior e inferior. Os autores encontraram uma forte correlação entre os GAGs e a densidade de orifícios no núcleo pulposo, além de demonstrarem uma alta correlação indireta desses orifícios da placa terminal com o grau de degeneração dos discos intervertebrais, sugerindo que a oclusão desses orifícios diminui a nutrição celular e dificulta a manutenção da matriz, levando à degeneração do disco.

BENNEKER *et al.* (2005b) preocupados com a pouca relação nos trabalhos entre os exames utilizados na prática diária e alterações morfológicas e bioquímicas dos discos intervertebrais, estudaram 39 discos de 8 cadáveres, com média de idade de 54 anos. As colunas foram coletadas em até 48 horas após o óbito e foram mantidas a 4°C, com os tecidos adjacentes intactos para preservar de desidratação e melhorar o contraste nas imagens de RM que foram obtidas em até 48 horas após a coleta. As imagens de RM foram obtidas em equipamento de 1,5 Tesla da General Electric e os exames foram avaliados por três observadores para os

seguintes parâmetros: intensidade do sinal em T2; alterações da placa terminal de acordo com Modic; integridade da placa terminal; extensão do disco adiante do espaço intervertebral; lesões do ânulo fibroso; osteófitos; forma do núcleo pulposo e perda da cartilagem da placa terminal. Imagens de radiografias em antero-posterior e sagital foram obtidas e os mesmos avaliadores analisaram: altura do disco; esclerose da placa terminal; osteófitos; nódulos de Schmorl; calcificações no interior do disco e forma das placas terminais. As unidades funcionais foram separadas com auxílio de uma serra com duas lâminas e fotografias dos discos foram obtidas para classificar as alterações morfológicas de acordo com Thompson. Uma região central do NP foi separada e realizada mensuração do grau de hidratação e a dosagem de GAGs foi realizada por DMMB. Os autores concluem que os parâmetros radiográficos, principalmente, a altura dos discos intervertebrais, se correlacionaram-se melhor com os diferentes estágios de degeneração do que somente as imagens da ressonância magnética.

OLIVEIRA (2005) avaliou e determinou diferentes tipos de fibras nervosas no disco intervertebral normal e degenerado de humanos. Foram utilizadas dez colunas lombares de cadáveres com aproximadamente 48 a 72 horas de óbito. As peças foram submetidas ao exame de radiografia simples e ressonância magnética. Após o exame, os discos foram classificados em normais e degenerados. Foram dissecados, divididos em região anterior e posterior, incluídos em parafina e realizado estudo por imuno-histoquímica com a proteína S100. As fibras nervosas tiveram seu diâmetro aferido e foram classificadas de acordo com tamanho e morfologia. Foram encontrados quatro tipos de fibras nervosas nas diferentes regiões discais. O número e o tipo de fibras variaram de acordo

com a região e o grau de degeneração do disco. Concluíram que as fibras do tipo III são mais frequentes na região anterior, as fibras do tipo II e IV são mais frequentes na região posterior e as fibras do tipo I não tiveram diferenças entre a região anterior e posterior do disco.

WILLENEGGER *et al.* (2005) investigaram a presença de fibras nervosas no disco intervertebral de cães. Utilizaram discos entre a segunda vértebra lombar e o sacro de cães de diversas raças. As amostras foram fixadas, descalcificadas e incluídas em parafina. Cortes de 8 a 12 μm de espessura foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica com o PGP 9,5. Os autores observaram a presença de nervos somente na região mais externa do ânulo fibroso, sugerindo ser esta a única região fonte de dor para o disco intervertebral.

WILLIAMS *et al.* (2005) preocupados com a viabilidade de tecidos utilizados para transplante em lesões cartilaginosas, avaliaram a manutenção da integridade e função de condrócitos após 14, 21 e 28 dias da captação. Utilizaram cêndilos femorais de cães removidos utilizando uma serra de osso após procedimento de eutanásia e ressecaram todos os tecidos moles. O grupo utilizado para padronizar os resultados foi imediatamente analisado. Os demais grupos foram colocados em recipientes esterilizados com 60 ml de solução, contendo D-MEM, soro fetal bovino, aminoácidos essenciais, antibacterianos e antifúngicos, e mantidos a 4°C, por 14, 21 e 28 dias até serem processados. A viabilidade celular foi avaliada por microscopia confocal e pelo método de calceína/homodímero de etídio. A quantidade de GAGs foi analisada utilizando o método de DMMB. Observaram que a viabilidade celular manteve-se acima de 95%, aos 14 dias, entre 75-98%, aos 21 dias e entre

65-90%, aos 28 dias. A quantidade de GAGs não variou estatisticamente ao longo do período, mas apresentou uma tendência de declínio após os 21 dias. Os autores concluíram que os bancos de tecidos podem guardar por até 28 dias os enxertos osteocondrais.

ADAMS & ROUGHLEY (2006) revisaram e apresentaram uma nova interpretação para dados da literatura, propondo uma definição para degeneração do disco intervertebral e relataram que o maior fator de risco para a doença degenerativa do disco é a herança genética. Fatores ambientais que realmente se mostraram como fator de risco foram a sobrecarga mecânica repetitiva e o tabagismo. Os autores propõem a seguinte definição: “Degeneração do disco é uma resposta aberrante mediada por células a uma falência progressiva da estrutura do disco”. A falência estrutural do disco é irreversível e está associada com alterações mecânicas e dor. A herança genética, idade, transporte inadequado de metabólitos e sobrecarga mecânica contribuem diretamente para o enfraquecimento do disco até promoverem a sua lesão estrutural durante as atividades diárias. Um disco degenerado é, portanto, aquele com falência de sua estrutura combinado com sinais avançados de envelhecimento e a doença degenerativa do disco pode ser definida quando há dor, além de discos degenerados.

GRUNHAGEN *et al.* (2006) revisando sobre a nutrição do disco intervertebral sadio e degenerado, discutiram sobre terapias celulares para reparação. O disco é avascular e a energia do seu metabolismo provém, principalmente, de glicólise, gerando uma grande quantidade de ácido

lático. O oxigênio é necessário para a atividade das células, mas não para a sua sobrevivência; essa nutrição depende da vascularização das margens do disco que vêm dos corpos vertebrais que penetram o osso subcondral e terminam na interface disco/osso. Pequenos solutos como glicose e oxigênio alcançam as células por difusão, da mesma forma que metabólitos como o ácido lático são removidos. A mensuração desses solutos no tecido humano não é fácil, mas pode ser estimada e estes resultados têm se mostrado similares aos valores encontrados em pacientes cirúrgicos.

ROBERTS *et al.* (2006) fizeram uma revisão extensa sobre histologia e patologia do disco intervertebral, descrevendo alterações histológicas notadas nos diferentes períodos da vida. Apresentam as características do disco durante o desenvolvimento embrionário, nascimento, idade adulta e envelhecimento.

SINGH *et al.* (2009) com o objetivo de caracterizar alterações decorrentes da idade, estudaram 24 discos intervertebrais entre a vértebra torácica número 11 e L5 de cadáveres de ambos os gêneros, entre 40 e 80 anos de idade, com até 24 horas após o óbito. Embora tenham obtido 46 discos, apenas 24 foram considerados para o estudo, sendo 6 discos abaixo de 50 anos. Os discos foram separados em três regiões: (AF externo anterior e posterior; AF interno anterior e posterior e NP). As amostras foram analisadas quanto à quantidade de DNA, utilizando o método de PicoGreen[®]. A dosagem total de GAGs foi realizada pelo método do DMMB e comparada com os valores de DNA. A dosagem de hidroxiprolina foi aferida por meio de HPLC e normalizada para os valores de DNA. Avaliaram proteoglicanos, tais como biglican, decorin, lumican e

fibromodulina de forma semiquantitativa, pela técnica de *Western blot* e normalizados para a massa seca das amostras. Observaram que o conteúdo de DNA foi muito similar em todas as regiões do disco (0,8 µg/mg de tecido seco), sendo que no grupo entre 51 e 70 anos de idade, a quantidade foi maior do que nos demais grupos. O conteúdo de colágeno foi maior nas regiões dos ânnulos fibrosos e diminuiu com a idade em todas as regiões. A dosagem de GAGs foi maior na região do NP e AF interno (500 µg/µg DNA) e demonstrou uma diminuição com a idade. Quanto aos proteoglicanos, observaram que, no AF externo, o decorin diminuiu com a idade, enquanto o biglican e a fibromodulina aumentaram. No AF interno e NP o biglican apresentou ligeiro aumento com a idade. Os autores concluíram que o colágeno e os proteoglicanos variam dependendo da idade, com tendência a diminuir com o passar dos anos. No entanto, alguns proteoglicanos, como a fibromodulina (AF externo) e o biglican (AF interno e NP), acumulam de forma significativa com a idade.

CHAN *et al.* (2011) realizaram uma revisão sobre a estrutura e a biologia do disco intervertebral saudável e degenerado. Transcorreram sobre a origem embriológica do disco intervertebral, sobre a organização estrutural e sobre a função da matriz extracelular.

LIEBSCHER *et al.* (2011) procuraram elucidar a densidade celular e o número total de células em diferentes áreas do disco e alterações relacionadas com a idade e com sinais histológicos de degeneração. Utilizaram 49 segmentos lombares de coluna humana provenientes de 22

necropsias (neonato a 86 anos). Os segmentos foram fixados em formaldeído a 4%, descalcificados com ácido metileno-diamino-tetracético por 1 a 4 meses, incluídos em parafina e cortes de 5 μm de espessura foram corados com hematoxilina/eosina; van Gieson e Tricromio de Masson. Os autores observaram que a densidade celular na placa terminal, NP e AF diminuiu significativamente entre os recém-nascidos até os 16 anos e a maioria das mudanças ocorreu até os três anos de idade para o NP e AF, mantendo-se estável após esse período. Gênero e nível do disco não influenciaram a densidade celular. Concluíram que as informações sobre o número total de células nas diferentes regiões dos discos podem auxiliar terapias celulares.

RODRIGUEZ *et al.* (2011) interessados nas propriedades da placa terminal e sua relação com a degeneração dos discos intervertebrais, avaliaram 51 segmentos de 13 colunas lombares de cadáveres, entre 32 e 85 anos, provenientes de banco de órgãos que foram mantidas a -20°C até a realização de ressonância magnética e serem classificadas segundo a classificação de Pfirrmann *et al.* (2001). Medidas da altura dos discos foram realizadas nas regiões anterior, central e posterior de cada segmento, utilizando o *software* ImageJ[®]. Os discos foram retirados da região central e divididos em regiões superior, central e inferior. As placas terminais foram avaliadas quanto à porosidade, utilizando aparelho μTC40 . Os fragmentos do NP foram triturados e digeridos com papaína para análise da densidade celular, quantificando o DNA pela técnica do PicoGreen[®], e o conteúdo de GAGs pela técnica do DMMB. Os autores observaram aumento na densidade celular, com a diminuição da altura dos discos, mas

sem correlação com a porosidade do osso subcondral ou idade. A porosidade apresentou correlação positiva com a idade. Concluíram que, embora a densidade celular tenha aumentado com a degeneração, a função destas células (GAGs/células) diminuiu. Como a permeabilidade e a porosidade apresentaram-se aumentadas com a idade e a degeneração, os autores inferiram que a disfunção celular acelera a doença discal mais do que as barreiras físicas ao transporte de nutrientes.

WANG *et al.* (2011) buscando avaliar a viabilidade de células do disco intervertebral após efeito do uso da bupivacaína, realizaram experimentos em colunas de ratos com 10 semanas de idade retiradas após eutanásia por asfixia com gás carbônico. As unidades funcionais foram cultivadas em DMEM, suplementadas com 10% de soro fetal bovino por 0, 7, 14 e 28 dias. Três a quatro unidades funcionais foram cultivadas por três dias com DMEM antes da aplicação de 1 ml de bupivacaína ou solução salina como controle. Os autores utilizaram cortes histológicos de 7 μm em parafina, corados com hematoxilina/eosina e safranina-O para avaliar a integridade das unidades funcionais. A viabilidade celular foi avaliada após as unidades funcionais serem incubadas em 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolína (MTT) por duas horas, a 37°C, coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e observadas em microscópio de fluorescência. Os autores também avaliaram a síntese de proteoglicanos e colágeno utilizando marcação radioativa. Observaram que este modelo de cultura permite cultivar por até 4 semanas os discos intervertebrais de ratos com pouca alteração histológica, de viabilidade celular ou de síntese protéica. Concluíram também que a exposição à bupivacaína diminui a

viabilidade e a síntese de proteínas no disco intervertebral de forma dependente de tempo e dose.

BOUBRIAK *et al.* (2013) preocupados com o efeito da nutrição na densidade de células viáveis do disco intervertebral, avaliaram a influência da altura dos discos e do suprimento vascular nessas células em discos intervertebrais bovinos. Unidades funcionais de cauda de boi de cinco animais, entre 18 e 25 meses, foram dissecadas, cortadas no plano sagital e sua altura mensurada, utilizando compassos de calibração. Metade da unidade foi utilizada para análise bioquímica e a outra metade para análise histológica. O disco foi removido com bisturi, submetido ao congelamento rápido do NP com a parte cranial na região superior e cortes no criostato de 60 μm até obter entre 8 e 18 cortes, dependendo da altura do disco. Uma parte do NP foi digerida com papaína em tampão livre de sódio, após determinação das massas úmida e seca, foram quantificados os GAGs, pela técnica de DMMB, e o colágeno, pela técnica de dosagem de hidroxiprolina. A mensuração da taxa de produção de lactato foi verificada após incubação em DMEM, por 48 horas. A densidade celular foi medida pela técnica de Hoechst[®] 33258. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para analisar os orifícios nas áreas selecionadas, sendo excluídos os orifícios menores que 10 μm . As vértebras adjacentes foram fixadas em formalina 10% e descalcificadas com ácido fórmico. Após congeladas, cortes de 60 μm foram obtidos e marcados para detecção da atividade da peroxidase endógena em hemácias. Observaram que a altura dos discos não interferiu na densidade celular. A densidade de vasos e de poros que permitem sua penetração na placa terminal foi maior nos discos mais

espessos. Os autores concluíram que alterações nos vasos sanguíneos dos corpos vertebrais e da arquitetura da placa terminal influenciam a densidade das células nos discos intervertebrais.

QUERO *et al.* (2013) estudaram o efeito de fragmentos de AH como indutores e mediadores de inflamação nos discos intervertebrais. Coletaram amostras de disco intervertebral de pacientes durante cirurgias eletivas por doenças degenerativas e trauma. Células do disco intervertebral foram isoladas e cultivadas na presença de fragmentos de AH de alto peso molecular com 6 a 12 dissacarídeos e tiveram o seu efeito em citocinas e enzimas de degradação de matriz quantificados por PCR e ELISA. Concluíram que fragmentos de AH de alto peso molecular têm potencial para mediar a degeneração do disco e mecanismos de dor lombar por meio da ativação de vias de sinalização de receptores do tipo Toll-2.

ELMORSY *et al.* (2014) questionando as várias formas e tamanhos de ácido hialurônico disponíveis no mercado para tratamento de osteoartrite de joelho, que variam de 500 – 6000 kDa, e sabendo que em joelhos saudáveis de humanos o peso molecular do AH é de 6000 kDa, enquanto no joelho artrítico o peso molecular decai entre 500 – 3000 kDa, analisaram alterações histopatológicas na articulação de joelhos de coelhos após a aplicação de AH de alto peso molecular. Os autores observaram melhora das propriedades viscoelásticas e efeito protetor na cartilagem devido ao aumento dos coeficientes de fricção com o uso de AH com 6000 kDa de peso molecular, comparando com o de 800 kDa. Concluíram que a injeção

intra-articular de AH de alto peso molecular contribui para retardar a progressão da osteoartrite em joelhos de coelhos.

JEONG *et al.* (2014) analisaram géis compostos de ácido hialurônico-polietileno glicol com a finalidade de aplicar em regeneração tecidual de células de disco intervertebral. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de compostos com diferentes tipos de AH na síntese de matriz e no comportamento de células do núcleo pulposo e ânulo fibroso. Foram preparados oito tipos de géis e utilizados como substrato para o cultivo de células do disco intervertebral. Observaram que a quantidade de células tanto do núcleo pulposo quanto do ânulo fibroso foram maiores em géis com AH de baixo peso molecular e a produção de GAG sulfatados também foi mais abundante nestes géis. Concluíram que a incorporação de AH de baixo peso molecular (27 kDa) nestes compostos auxilia a produção de GAG e sobrevivência celular.

SIVAN *et al.* (2014) realizaram revisão narrativa ampla sobre a composição bioquímica da matriz extracelular do disco intervertebral e especificamente das proteases que envolvem o processo de remodelação do disco. Concluíram que a taxa de síntese de novas macromoléculas é lenta, principalmente para o colágeno, o que pode significar comprometimento da integridade estrutural do disco para o seu funcionamento normal.

MÉTODOS

4. Métodos

4.1 Desenho da pesquisa

O estudo é primário, experimental, observacional, transversal e realizado em centro único. O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob o número 0151/09 (Anexo I). Os familiares dos indivíduos investigados assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II). Exames de imagem foram realizados no Departamento de Diagnóstico por Imagens da Escola Paulista de Medicina (EPM) da UNIFESP. As análises histológicas por microscopia foram realizadas no Laboratório do Departamento de Morfologia e Genética, da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da EPM/UNIFESP. Os testes de análises bioquímicas e microscopia confocal foram realizados na Disciplina de Biologia Molecular, do Departamento de Bioquímica da EPM/UNIFESP.

4.2 Piloto

Projeto-piloto foi realizado utilizando-se discos intervertebrais bovinos, sendo possível a padronização das técnicas utilizadas no presente estudo (Apêndices).

4.3 Amostra

O dimensionamento da amostra foi realizado, supondo-se que pessoas idosas apresentam redução no número de células metabolicamente ativas de pelo menos duas vezes o valor em relação aos mais jovens; com

base no estudo de LIEBSCHER *et al.* (2011), em que os valores de células em pessoas jovens foi de aproximadamente $0,75 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ (DNA/massa de tecido seco), com variabilidade de aproximadamente $0,50 \mu\text{g}/\mu\text{g}$, poder de 80% e confiança de 95%, seriam necessários 16 discos em cada grupo para a realização do estudo. Foi utilizado o programa G*Power 3[®] versão 1.9.2 para Windows[®] em português para o cálculo do tamanho da amostra.

Foram utilizadas dez colunas lombares de cadáveres com menos de 24 horas de óbito. Foi retirada, de cada indivíduo, toda a coluna lombar da primeira vértebra lombar (L1) à primeira vértebra sacral (S1) durante a necropsia realizada no Serviço de Verificação de Óbito da Capital da Universidade de São Paulo, utilizando em média três discos por coluna, totalizando 28 discos intervertebrais após submissão aos critérios de inclusão e exclusão, sendo divididos em grupo 1, os indivíduos com menos de 50 anos e grupo 2, os indivíduos com 80 anos ou mais. Embora o número de discos coletados seja menor que o cálculo da amostra, as aferições realizadas em discos diferentes e regiões diferentes fizeram com que o poder da amostra fosse elevado, suprimindo esse número inferior.

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos indivíduos com idade acima de 18 anos, cujo óbito ocorreu em menos de 24 horas, sem história prévia de cirurgia de coluna e com TCLE assinado pela família.

4.3.2 Critério de não inclusão

Não foram incluídos os casos em que a causa do óbito foi tumor de qualquer natureza, história de quimioterapia, radioterapia na região lombar, paraplegia ou história conhecida de espondilite anquilosante.

4.3.3 Critério de exclusão

Foram excluídos os casos identificados com presença de tumor ou doença infecciosa na coluna pelos exames de imagem de Ressonância Magnética (RM) ou Tomografia Computadorizada (TC). Também foram excluídos os casos com menos de 50 anos de idade em que os discos foram considerados degenerados pela classificação de PFIRRMANN *et al.* (2001) (quadro 1), ou seja, graus IV e V (figura 4) e os casos com mais de 80 anos de idade em que os discos foram considerados normais pela classificação de PFIRRMANN *et al.* (2001) (Quadro 1). Foram excluídos também casos que apresentavam deformidade na coluna lombar, como escoliose com mais de 20° pela técnica de Cobb, e malformações vertebrais.

Quadro 1: Classificação do disco intervertebral por Ressonância Magnética ponderada em T2 de acordo com PFIRRMANN *et al.* (2001).

Grau	Estrutura	Distinção Núcleo/Ânulo	Intensidade do sinal	Altura do disco	Degeneração
I	Homogênea	Clara	Hiperintenso	Normal	Normal
II	Heterogênea com linha horizontal	Clara	Hiperintenso	Normal	Normal
III	Heterogênea cinza	Não Clara	Intermediário	Normal	Normal
IV	Heterogênea cinza ou preta	Não clara ou perdida	Hipointenso	Reduzido	Degenerado
V	Heterogênea preta	Perdida	Hipointenso	Colapsado	Degenerado

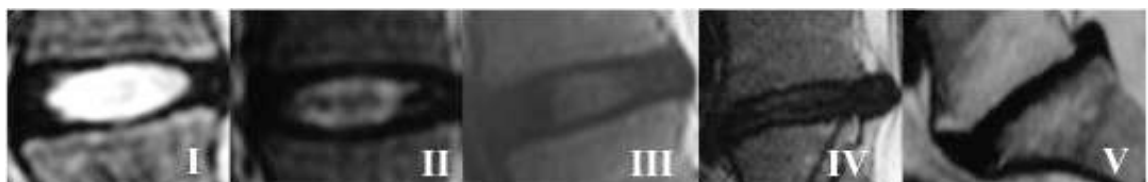


Figura 4: Representação da classificação de degeneração de discos intervertebrais lombares, de acordo com Pfirrmann *et al.* (2001). Da esquerda para a direita, representação dos graus I a V.

4.4 Coleta das amostras

4.4.1 Exames de imagem

4.4.1.1 Ressonância Magnética

As colunas foram colocadas em aparato desenvolvido para esse projeto e imagens de Ressonância Magnética (figura 5) foram obtidas em aparelho Siemens AG 2006, versão Syngo MR A30[®], modelo Sonata Maestro Class “Magnetom”, *software* NUMARIS/4, bobina “*spine array*” de mesa, “*field of view*” (FOV): 270, 270, 200; Tempo de Relaxamento (TR): 2930, 407, 3258; Tempo de Emissão (TE): 114, 18, 305; espessura de 4 mm e intervalo de 0,6; 0,6 e 0,4.

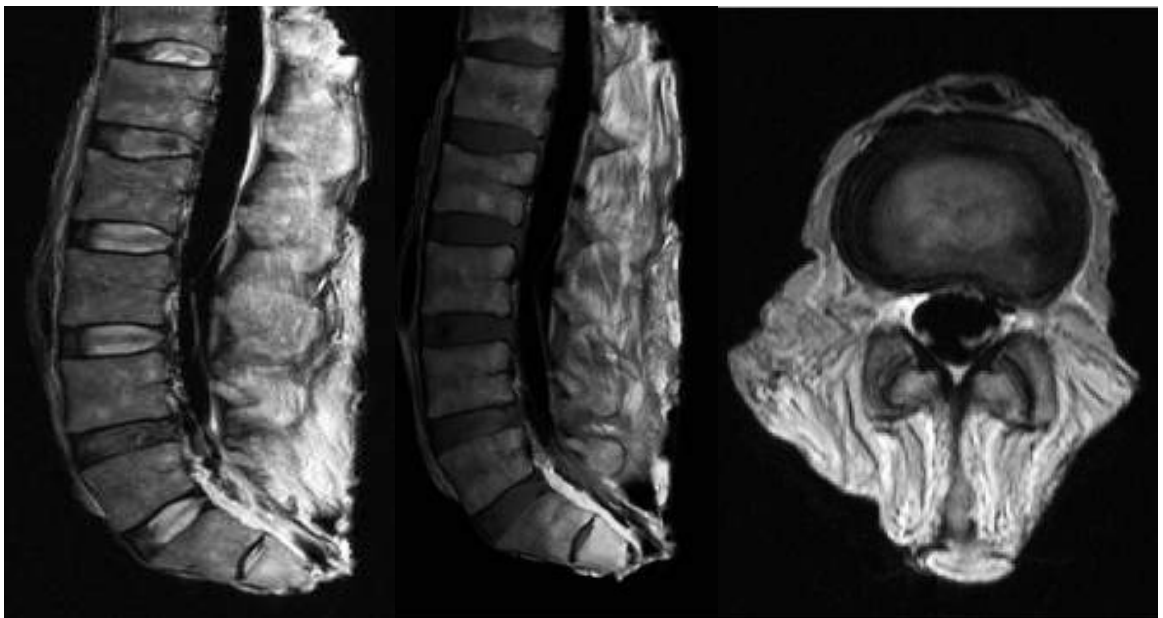


Figura 5: Exemplo de imagem de Ressonância Magnética de coluna do grupo 1. Da esquerda para a direita, corte sagital ponderado em T2, corte sagital ponderado em T1 e imagem de corte axial ponderado em T2.

4.4.1.2 Tomografia Computadorizada

Foram adquiridas imagens de TC (figura 6) em aparelho Phillips “multislice” de 64 canais, modelo “Brilliance”, a uma distância de 350 mm, utilizando 120 kV e 30 mA, com cortes de espessura de 0,8 mm e incremento de 0,4 mm com uma FOV de 120 e 300 mA/corte.

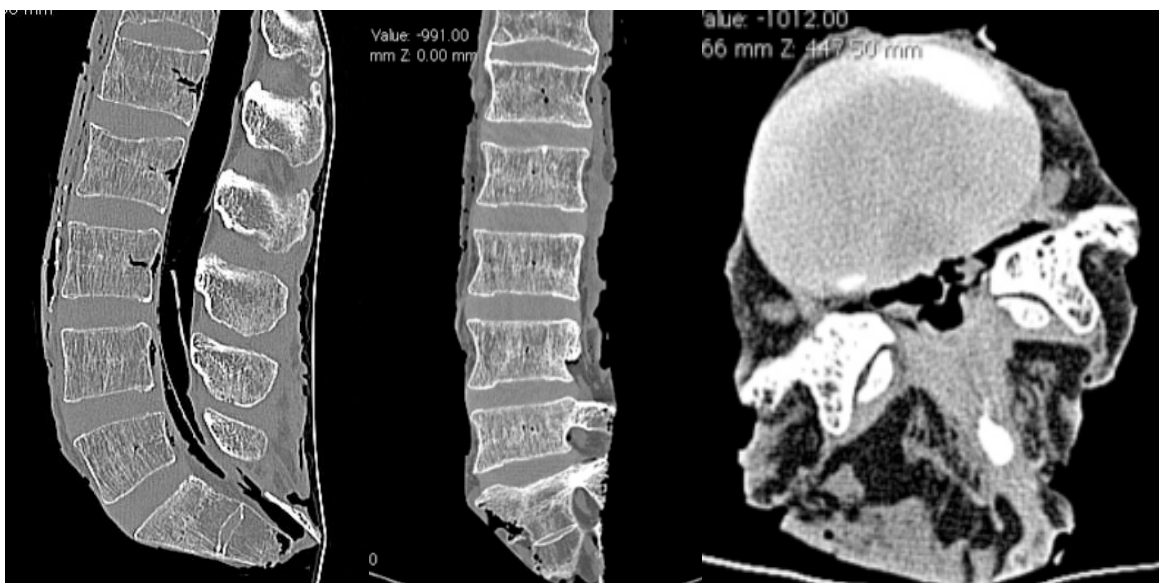


Figura 6: Exemplo de imagem de Tomografia Computadorizada de coluna do grupo 1. Da esquerda para a direita: corte sagital, corte coronal e corte axial. Todas as imagens em janela óssea.

4.4.2 Preparo das amostras

As amostras foram mantidas em freezer (-20°C) até o momento da dissecação, realizada entre 4 e 12 horas após a coleta. As amostras foram dissecadas e separadas em unidades funcionais, com auxílio de serra de fita, contendo: parte do corpo vertebral inferior, disco intervertebral e parte

do corpo vertebral superior. A região antero-superior de cada unidade funcional foi identificada com fio *nylon* 000. Em seguida, o arco posterior da vértebra foi removido para permitir melhor acesso ao disco intervertebral (figura 7).

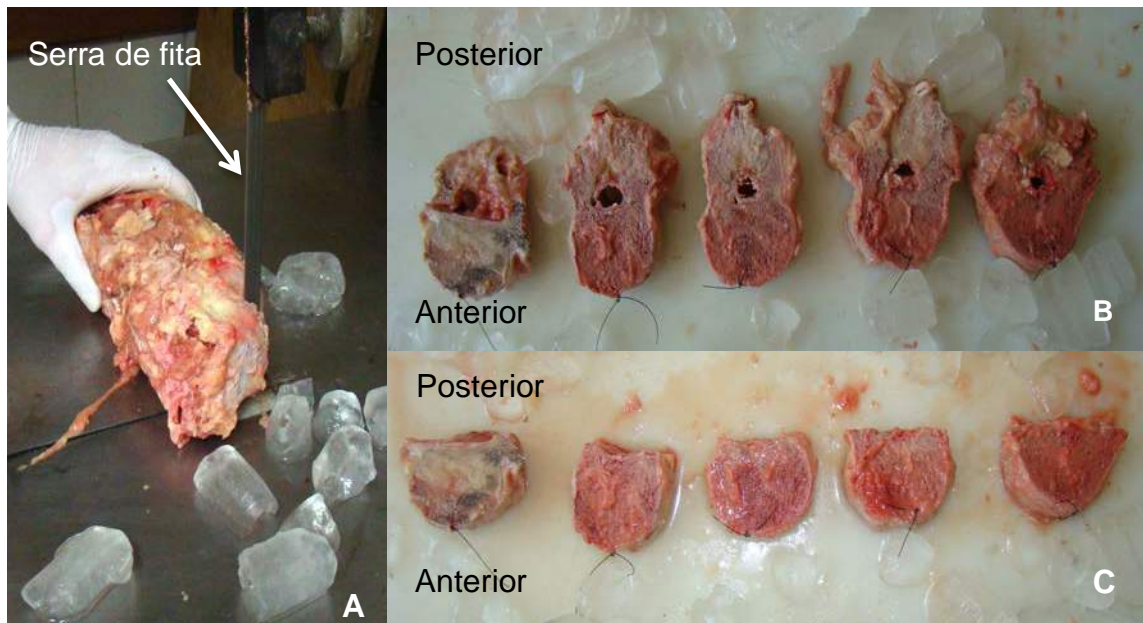


Figura 7: Fotografia representativa de uma coluna lombar sendo preparada para as análises. (A) Separação das unidades funcionais com serra de fita; (B) unidades funcionais já separadas e identificadas com fio *nylon* 000; (C) unidades funcionais após remoção do arco posterior.

4.4.2.1 Análise das células metabolicamente ativas

Um fragmento de cinco milímetros de espessura foi removido da linha média das unidades funcionais, em toda a profundidade, no sentido de anterior para posterior, contendo o disco intervertebral no centro, enquanto nas áreas superior e inferior mantiveram-se as placas terminais e o osso adjacente (figura 8), sendo este fragmento colocado imediatamente em solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (WANG *et al.* 2011).

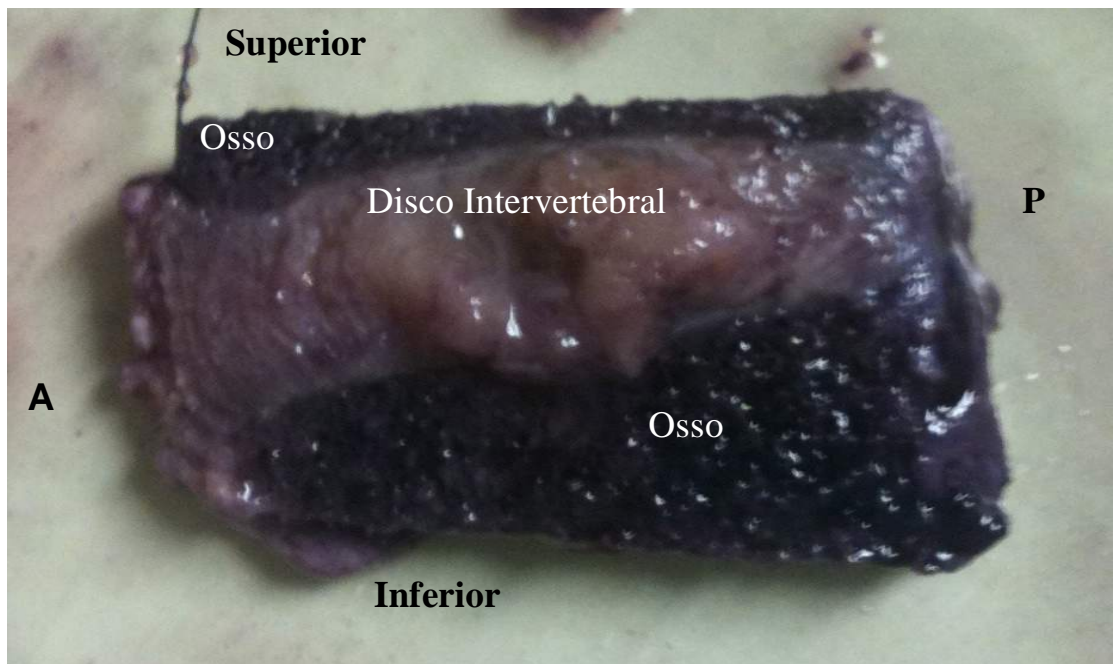


Figura 8: Vista lateral do fragmento após incubação com MTT. (A) região anterior; (P) região posterior.

4.4.2.2 Quantificação da vascularização das placas terminais

Do fragmento de unidade funcional utilizado para a análise da quantidade de células metabolicamente ativas, após o período necessário de incubação, foi removido o disco intervertebral das superfícies ósseas superior e inferior com auxílio de bisturi (lâmina 23) e essas estruturas ósseas separadas foram submetidas à análise do número de orifícios vasculares que penetravam na placa terminal.

4.4.2.3 Análises bioquímicas

Outro segmento das unidades funcionais de cinco milímetros de espessura, adjacente à esquerda do fragmento retirado para a análise de da quantificação das células metabolicamente ativas, foi removido em toda a profundidade, no sentido de anterior para posterior e, em seguida, separado

das superfícies ósseas e seccionado em três regiões: ânulo fibroso anterior (AFa), núcleo pulposo (NP) e ânulo fibroso posterior (AFp).

4.4.2.4 Análise histológica

Outro segmento das unidades funcionais de cinco milímetros de espessura, adjacente à direita do fragmento retirado para a análise da quantificação das células metabolicamente ativas, foi removido em toda a profundidade de anterior para posterior, contendo o disco intervertebral no centro e nas áreas superior e inferior, mantendo-se as placas terminais e o osso adjacente. O segmento foi seccionado em três regiões para análise histológica: AFa; NP e AFp (figura 9).

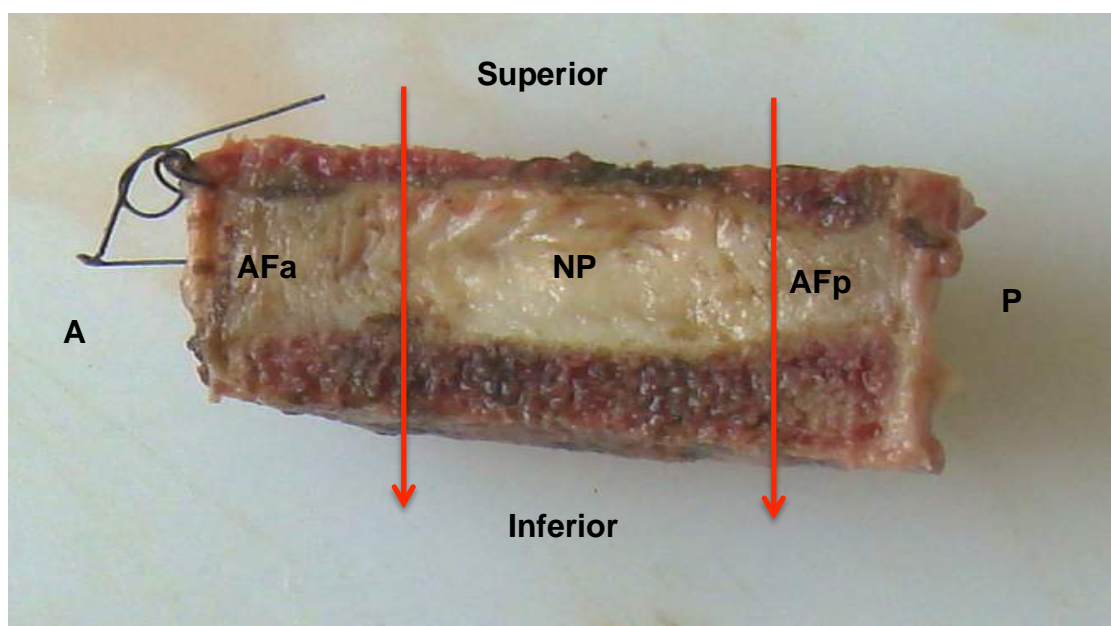


Figura 9: Vista lateral de fragmento para análise histológica. As setas vermelhas representando os locais de corte para separar a amostra em três regiões: (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo e (AFp) ânulo fibroso posterior. (A) anterior; (P) posterior

4.4.3 Avaliação da quantificação de células metabolicamente ativas

Após coleta, o fragmento central de cada disco de cinco milímetros de espessura foi imediatamente incubado a 37°C, por 18 horas, em solução MTT (Sigma) na concentração final de 0,5 mg/ml em meio D-MEM de baixa glicose (25 mM HEPES, 1 ml de antibiótico/antimicótico/ 100 ml D-MEM). Após esse período, o fragmento foi fixado em paraformaldeído 4% por uma hora e, em seguida, congelado rapidamente em hexane, seccionado em cortes de 20 µm em criostato HM 550 Microm[®] (Zeiss) e colocados em lâminas revestidas por poli-L-lisina 10%. A montagem da lâmina foi realizada num meio “Vectashield[®] *hard-set mounting media*” com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), da Vector-lab. As imagens foram geradas por excitação do DAPI com o laser multifoton titânio safira, em 720 nm e emissão realizada no intervalo de 420-470 nm. A imagem final foi reconstituída em vários planos focais e a luz transmitida foi capturada por contraste de interferência diferencial (DIC) em microscópio confocal LSM780[®], da Carl Zeiss. Foram contados 200 núcleos celulares, por dois observadores. O MTT oxidado pela enzima succinato desidrogenase é convertido em cristais de formazam, que são mais densos que o tecido, e aparecem em escuro na imagem de DIC. A formação desses cristais está relacionada com a viabilidade e a função mitocondrial. A coloração do DNA com DAPI mostra a presença do número total de células presentes no tecido. A partir do número total de células (positivas para DAPI) e células viáveis (células com atividade mitocondrial) determinou-se a viabilidade celular do tecido. Como exemplo, pode-se observar, na figura 10, uma célula metabolicamente ativa e outra metabolicamente inativa.

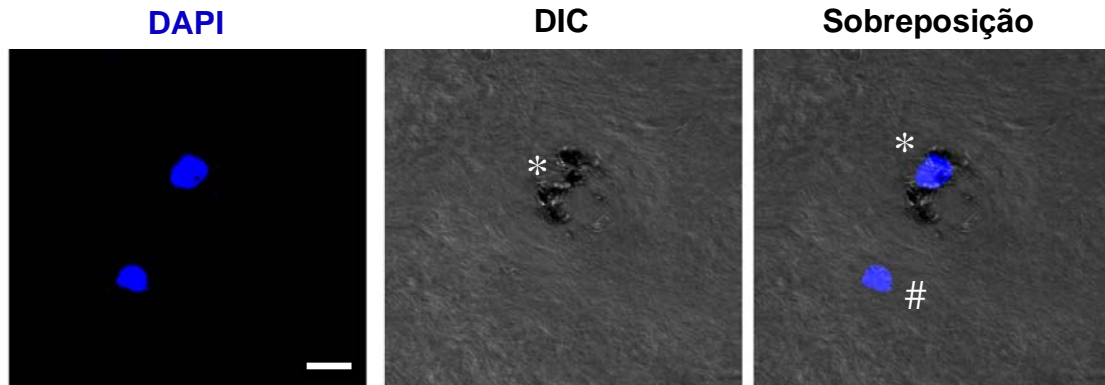


Figura 10: Imagem representativa da análise de células metabolicamente ativas no disco intervertebral. (*) presença de cristais de formazam (densos, aparecendo em negro – células metabolicamente ativas) ao redor do núcleo celular marcado em azul pelo DAPI. (#) célula marcada pelo DAPI sem o depósito de formazam – célula metabolicamente inativa. As imagens foram realizadas no microscópio confocal LSM780[®]. Barra = 10 μm .

4.4.4 Análises quantitativa da vascularização das placas terminais

Após a retirada do disco para análise das células metabolicamente ativas, as superfícies ósseas foram incubadas por sete dias na presença de protease (papaína 10 mg/ml, USB Corporation, Cleveland, Ohio, Estados Unidos), a 60°C. A placa terminal foi, então, lavada com água pulsátil, removido o excesso de gordura com Triton X-100 (Sigma) a 1%, secos a 37°C por 24 horas e acondicionados em tubos até aquisição das imagens em um Stereo Microscope Discovery[®] V.8 da Carl Zeiss acoplado à câmera Axiocam[®] com resolução de 1.4 megapixels. O sistema possui uma ocular com aumento de 10x e uma objetiva Plan Apo S 1,0x. Uma imagem característica é mostrada na figura 11. Foram quantificados os orifícios maiores que 10 μm determinados utilizando-se o programa ImageJ[®]. Os pixels escuros (orifícios vasculares) (0-10 numa escala de 8 bits = 256 variações de cor), em uma área formada por um diâmetro mínimo de 10 μm , foram quantificados numericamente (figura 12).

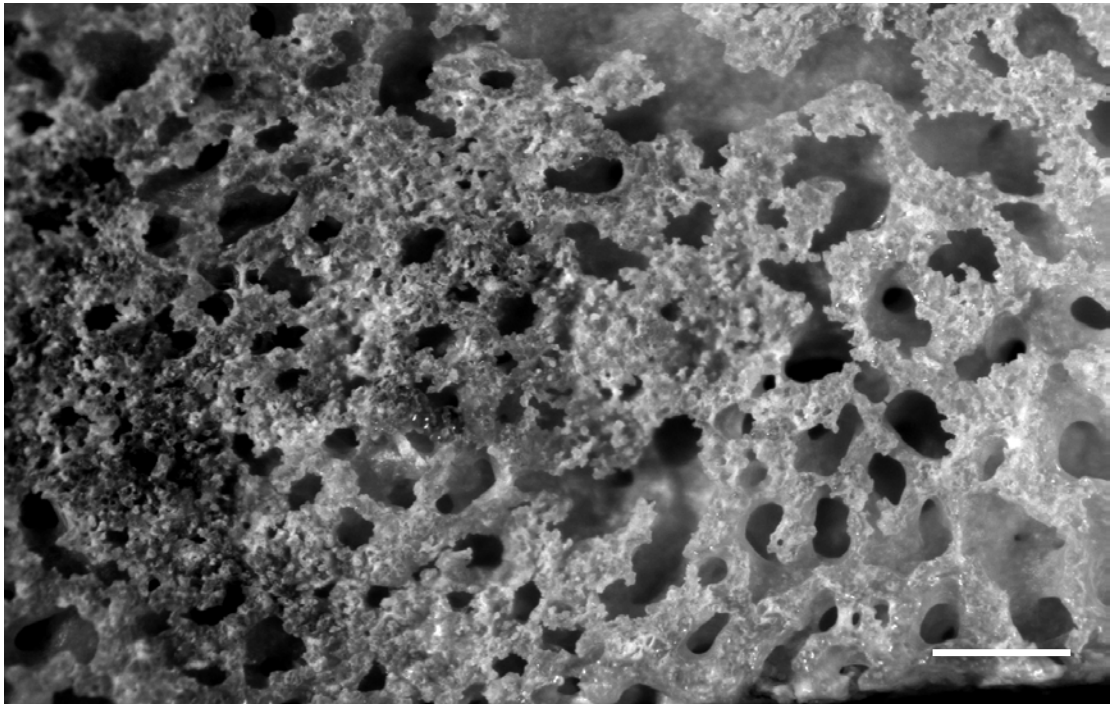


Figura 11: Imagem dos orifícios vasculares no núcleo pulposo. As imagens foram realizadas em Stereo Microscope Discovery[®] V.8. Barra = 0,5 mm.

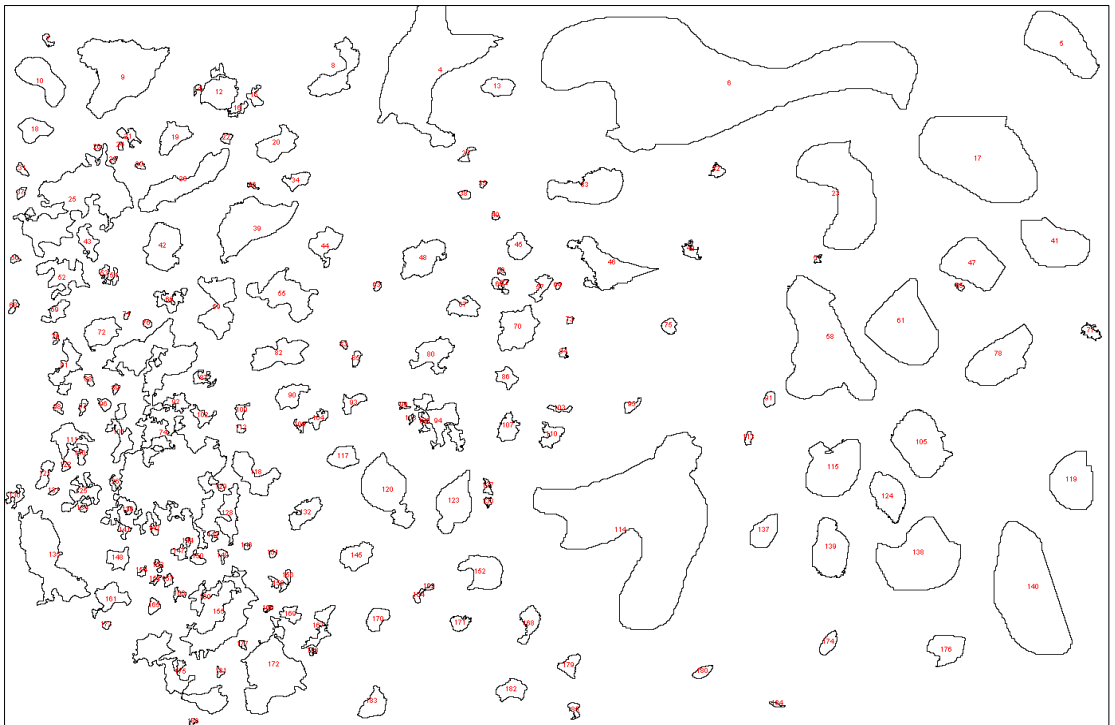


Figura 12: Imagem binária de orifícios vasculares no núcleo pulposo. Foram selecionadas regiões escuras (<10 numa escala de 8 bits) maiores que 10 μm . Análise realizada utilizando o programa ImageJ[®].

4.4.5.1 Quantificação do número total de células

Para a quantificação de DNA, alíquotas das amostras de cada região, após sofrerem proteólise, foram diluídas na proporção 1:1000 em tampão TE (Tris-HCl 200mM, Na₂EDTA 20mM, pH 7,4).

Cerca de 100 µl de cada amostra, já diluída, foi incubada em tubo protegido da luz, em presença do reagente PicoGreen[®] (20 µl do reagente PicoGreen[®] em 980 µl de TE, Molecular Probes), durante 5 minutos antes da leitura.

Utilizando-se placas escuras de 96 poços, a fluorescência foi capturada pela excitação das amostras no comprimento de onda 480 nm e emissão a 520 nm no espectrofluorímetro de placas FLEXStation[®] 3. A fluorescência foi determinada pela média de três medidas por amostra com corte de emissão em 515 nm. Uma curva-padrão foi realizada no mesmo momento da análise dos resultados, utilizando-se amostra de DNA oriundas do kit do fabricante (McGOWAN *et al.*, 2002). Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.5.2 Isolamento, extração e caracterização de glicosaminoglicanos sulfatados

Para a obtenção dos glicosaminoglicanos (GAGs), as amostras submetidas à proteólise foram precipitadas com cinco vezes o volume de metanol e mantidas a -20°C por 18 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido ao tratamento com NaOH 0,05 M/1 M de borohidreto de sódio, por 18 horas, a

temperatura ambiente (β -eliminação). As amostras foram dialisadas e, em seguida, secas e submetidas à eletroforese em tampão PDA (1,3-diamino propano acetato) 0,05 M, pH 9,0, para a identificação dos GAGs.

O tampão PDA 0,05 M, pH 9,0 distingue os compostos conforme a interação diferencial com a diamina, discriminando, por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, os condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS) e heparina (HEP).

As amostras foram aplicadas em lâminas de gel de agarose a 0,55%, no tampão de PDA, sendo posteriormente submetidas à eletroforese (5 V/cm durante uma hora) em caixa refrigerada a 4 °C. Como estes compostos possuem carga aniônica, a origem do gel corresponde ao pólo negativo.

Após a corrida eletroforética, os GAGs sulfatados foram precipitados no gel pela imersão, em uma solução de Cetavlon 0,1%, por duas horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi seco sob corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1%, em ácido acético 1% e etanol 50%. O excesso de corante foi removido com a mesma solução sem o corante e seco em temperatura ambiente (DIETRICH & DIETRICH, 1976).

4.4.5.3 Degradação enzimática dos glicosaminoglicanos

Para a caracterização dos GAGs obtidos, as amostras foram submetidas à degradação enzimática pela incubação com as enzimas condroitinase AC (Sigma) e condroitinase ABC (*Proteus vulgaris*, Seikagaku America). Dessa forma, alíquotas de 10 μ l (8,95 - 39,44 mg) foram incubadas com 10 μ l das enzimas (1 unidade, 1 μ g/ μ l) condroitinases

AC e ABC, por 18 horas, à 37°C. Após esse período, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética, conforme descrito previamente.

A condroitinase AC degrada o condroitim sulfato (CS) enquanto a condroitinase ABC degrada o CS e o dermatam sulfato (DS). Este procedimento tem como objetivo caracterizar a presença de CS e/ou DS presente nas amostras. Como padrão, foram utilizados os glicosaminoglicanos condroitim 4-sulfato de cartilagem de baleia (Seikagaku), condroitim 6-sulfato de cartilagem de tubarão (Seikagaku), dermatam sulfato de mucosa de intestino bovino (Seikagaku) e heparam sulfato de pulmão bovino (extraído e purificado na Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UNIFESP).

4.4.5.4 Caracterização dos dissacarídeos de condroitim sulfato

Após degradação enzimática dos GAGs com condroitinase AC, 200 µl do produto de degradação sulfato foram previamente submetidos ao processo de gel-filtração em coluna PD MidiTrap G-10 (GE) com eluição por 1,5 ml de água (Milli-Q[®], *Integral Water Purification System*, Millipore) e liofilizados. A identificação dos dissacarídeos foi realizada em aparelho Akta Purifier[®] (GE), utilizando-se coluna SAX Phenosphere[®] (Phenomenex) com 150 x 4,6 mm, a temperatura ambiente. Para a detecção foi utilizado um gradiente de cloreto de sódio (NaCl) de 0-1 M, durante 30 minutos, com fluxo de 1 ml/min e detecção ultravioleta (UV) a 232 nm (ANDRADE *et al.*, 2013). A identificação dos dissacarídeos foi feita a partir da comparação dos cromatogramas de cada amostra com a eluição dos padrões de dissacarídeos de CS (figura 13). Os ensaios foram realizados em triplicata.

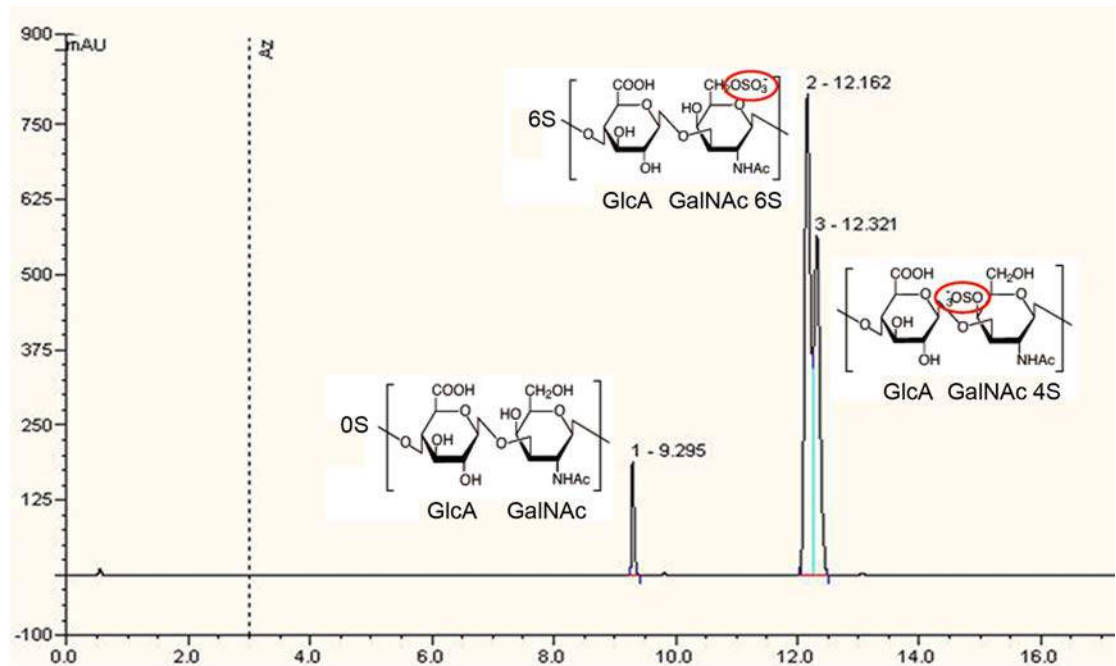


Figura 13: Cromatograma de dissacarídeos de padrões de condroitim sulfato analisados em aparelho Akta Purifier® na coluna SAX Phenosphere® e detecção ultravioleta a 232 nm. Observe em destaque nos círculos vermelhos o grupamento -OSO₃ na posição 6 (GlcA GalNAc 6S) e na posição 4 (GlcA GalNAc 4S). (AZ) autozero do aparelho.

4.4.5.5.1 Quantificação de ácido hialurônico

A quantificação do ácido hialurônico (AH) foi realizada por ensaio fluorimétrico não competitivo *ELISA-like*. Este método detecta de 0,2 a 500 µg/l de AH presente nas amostras. Alíquotas de 100 µg/l de cada amostra do disco intervertebral foram incubadas em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 acrescido de NaCl 0,15 M por 16 h a 56°C. Em seguida, a solução foi aquecida por 30 minutos, para inativação da enzima proteolítica, e diluída em tampão Tris-HCl 0,05 M + BSA 1%.

Alíquotas de 100 µl da solução final das amostras e de soluções-padrão de concentração conhecida de AH (curva-padrão), foram

adicionadas a placas de 96 poços, previamente sensibilizadas com proteína de ligação ao AH (1 µg/ml), purificadas de cartilagem bovina. Essas placas foram incubadas a 4°C, por 16 horas. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com tampão Tris-HCL 0,05 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%, EDTA 7,4 mg/ml, azida sódica 0,5 g/l pH 7,75.

O conjugado ao complexo (proteína de ligação de AH) foi quantificado pela adição de “*enhancement solution*®” e a fluorescência emitida foi detectada no fluorímetro Victor® 2. Os valores obtidos foram processados pelo programa MultiCalc® (Perkin Elmer). Os ensaios foram realizados em triplicatas (MARTINS *et al.*, 2003).

4.4.5.5.2 Análise do tamanho de ácido hialurônico

Após isolamento e extração dos GAGs por método já descrito, alíquotas de 100 µl das amostras foram submetidas à análise de tamanho do ácido hialurônico em aparelho Akta Purifier® (GE), utilizando-se coluna OHpak SB-805HQ (Shodex®) de 300 x 8,0 mm em série com coluna OHpak SB-804HQ (Shodex®) também de 300 x 8,0 mm, a temperatura ambiente. Para a eluição do AH foi utilizada a fase móvel de 0,2 M de NaCl durante 30 minutos com fluxo de 0,5 ml/min e detecção ultravioleta (UV) a 205 nm. Frações de 0,2 ml foram coletadas para posterior quantificação do ácido hialurônico conforme método descrito anteriormente (MARTINS *et al.*, 2003). Os ensaios foram realizados em triplicata. Previamente aos experimentos, foi realizada a padronização do ensaio com o uso de ácido hialurônico, monodispersos de determinados tamanhos (2500 kDa, 601 kDa, 250 kDa, 150 kDa e 100 kDa) adquiridos da Hyalose. (figura 14).

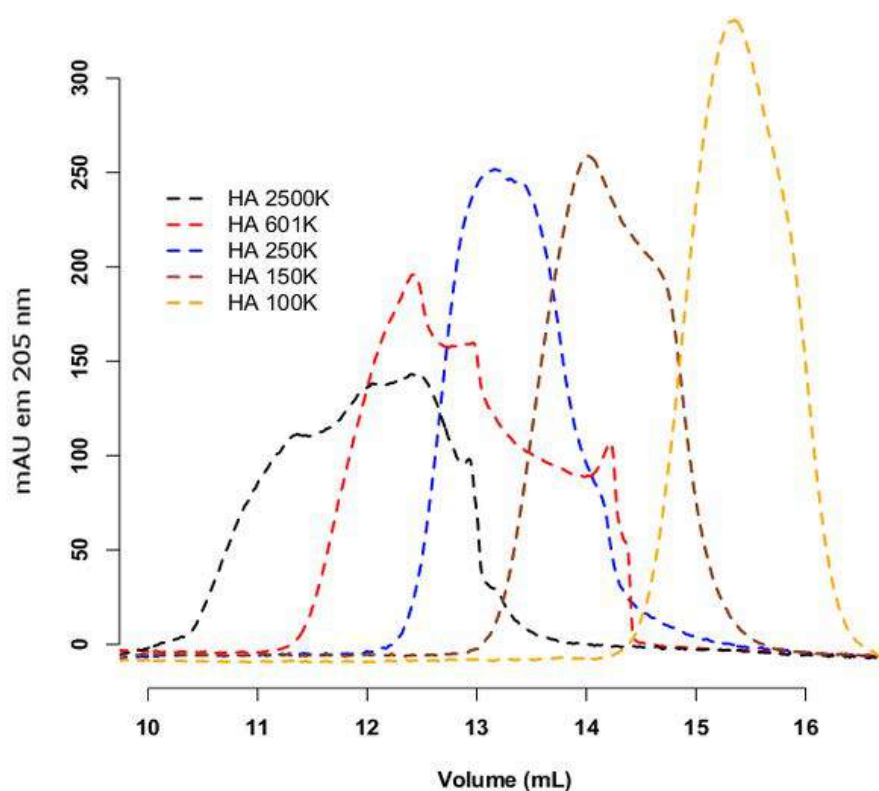


Figura 14: Cromatograma de padrões de ácido hialurônico analisados em aparelho Akta Purifier® em coluna OHpak SB-805HQ (Shodex®) em série com coluna OHpak SB-804HQ (Shodex®) de 300 x 8,0 mm e detecção ultravioleta a 205 nm e coleta de frações a cada 0,2 ml. Observe que o AH de maior peso molecular é eluído primeiramente comparado aos outros tamanhos que saem mais deslocados para a direita à medida que o tamanho do AH diminui.

4.4.5.6 Quantificação iônica de sódio e potássio

Após proteólise, uma alíquota de cada segmento foi submetida à quantificação dos íons sódio e potássio por técnica automatizada no aparelho Olympus AU640e® cuja calibração foi realizada com papaína em tampão Tris-cisteína livre de sódio (URBAN, 1998). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.4.5.7 Análise histológica

Os fragmentos AFa, NP e AFp compostos por interface osso, disco, osso foram fixados em formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 em temperatura ambiente. A seguir, descalcificados em ácido fórmico 25%, pH 2,0, por 90 dias, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina para realização das técnicas descritas a seguir.

4.4.5.7.1 Análise de fibras colágenas por método de “picro-sirius red”

Cortes de 5 μm de espessura foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol e incubados com ácido fosfomolibdico a 0,2% por 10 minutos para neutralizar a birrefringência da elastina. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e imersos por 90 minutos em solução de “sirius red” 0,1% (Sigma) dissolvida em ácido pícrico aquoso saturado. Posteriormente, os cortes foram lavados em HCl 0,01 N durante 2 minutos, e as lâminas foram desidratadas em gradiente crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan[®]. As fibras colágenas no disco intervertebral foram avaliadas segundo a sua birrefringência com auxílio de microscópio de polarização AxioScope.A1[®], com objetivas plan-acromáticas, acoplado a uma vídeo-câmera modelo AxioCam[®] MRc5, Zeiss, contendo placa digitalizadora de imagem. As imagens foram adquiridas na região mediana entre as placas terminais superior e inferior de cada área (AFa, NP e AFp) utilizando-se o programa AxioVision[®] SE 4.9 (Carl Zeiss). As imagens obtidas foram isoladas em suas cores primárias (vermelho, verde e azul) e, em seguida,

quantificado o número de pixels e calculada a proporção entre a quantidade de verde e vermelho utilizando-se o programa ImageJ[®].

4.4.5.7.2 Análise de Colágeno por método de imuno-histoquímica

Cortes de 5 μm de espessura foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol. Submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%, seguidos de bloqueio de sítios inespecíficos com BSA em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente.

Os cortes foram incubados para identificação de fibras de colágeno tipo II com o anticorpo anti COL2A1 N19 (Santa Cruz), diluição 1:150, por 18 horas a 4°C. Em seguida, foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB[®] Dako) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após banho em PBS foram incubados com amplificador (estreptoavidina-peroxidase, Kit LSAB[®] Dako) por 30 minutos, em temperatura ambiente. A seguir, foram novamente lavados com PBS, revelados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e contra-corados com solução de hematoxilina de Carazzi por 2 minutos. As imagens foram capturadas e avaliadas por meio de sistema digital de processamento utilizando-se microscópio Axio Scope.A1[®], com objetivas plan-acromáticas, acoplado a uma vídeo-câmera modelo AxioCam[®] MRc5, Carl Zeiss, contendo placa digitalizadora de imagem. As imagens foram adquiridas após análise de todo o corte histológico utilizando-se o programa AxioVision[®] SE 4.9 (Carl Zeiss).

4.4.5.7.3 Análise da presença de vasos sanguíneos e nervos por imunohistoquímica

Cortes de 5 μm de espessura para identificação dos vasos e 10 μm para identificação dos nervos foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol. Submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%, seguidos de bloqueio de sítios inespecíficos com BSA em PBS, por 30 minutos, a temperatura ambiente.

Os cortes foram incubados para identificação de vasos sanguíneos e nervos, respectivamente, com o anticorpo primário anti-CD-31 (Abcam), diluição 1:20 ou anticorpo anti-PGP 9.5 – “*neuronal marker*” (Abcam), diluição 1: 4000, por 18 horas a 4°C. Em seguida, foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB[®] Dako) por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após banho em PBS, foram incubados com amplificador (estreptoavidina-peroxidase, Kit LSAB[®] Dako), por 30 minutos, a temperatura ambiente. A seguir, foram novamente lavados com PBS, revelados com DAB e contra-corados com solução de hematoxilina de Carazzi por 2 minutos. As imagens foram capturadas e avaliadas por meio de sistema digital de processamento utilizando-se microscópio Axio Scope.A1[®], com objetivas plan-acromáticas, acoplado a uma vídeo câmera modelo AxioCam[®] MRc5, Carl Zeiss, contendo placa digitalizadora de imagem. As imagens foram adquiridas após análise de todo o corte histológico utilizando-se o programa AxioVision[®] SE 4.9 (Carl Zeiss). Foram realizados controles positivo e negativo (sem a utilização dos anticorpos primários) em língua de rato para vasos e em pele humana para nervos.

4.5 Metodologia Estatística

Todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas, esta análise foi feita por meio da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e mediana. Para as variáveis qualitativas, calcularam-se frequências absolutas e relativas.

Para a comparação de médias de dois grupos foi utilizado o teste t de Student; quando a suposição de normalidade dos dados utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov foi rejeitada, a variável foi transformada através da função logarítmica.

Para a comparação de três regiões foi utilizada a Análise de Variância a um fator com comparações múltiplas através de Bonferroni. Para se testar a homogeneidade entre as proporções foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (quando ocorreram frequências esperadas menores que 5).

O estudo de correlações foi realizado por meio do coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%. Para todas as análises, foi utilizado o programa IBM SPSS[®] 17.0 para Windows[®] em português.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Caracterização da amostra

Foram utilizados 28 discos intervertebrais de coluna lombar de humanos, sendo 15 discos provenientes de indivíduos abaixo de 50 anos e 60% destes do gênero masculino. Os discos foram utilizados em quantidades diferentes para cada análise realizada. Os indivíduos foram divididos em grupo 1 (com menos de 50 anos de idade) e grupo 2 (com 80 anos ou mais). A tabela 1 apresenta as características de cada indivíduo e o número de discos removidos por coluna.

Tabela 1: Descrição dos indivíduos por grupo etário

Ind	Gênero	Raça	Idade	Nº Discos	Causa do Óbito	Tabagismo	Etilismo	IMC
G1								
1	M	B	49	3	Edema Pulmonar	Sim	Não	17.3
2	M	B	45	4	Broncopneumonia	Não	Não	18.6
3	M	B	48	3	Infarto do Miocárdio	Não	Não	27.0
4	F	B	34	2	Peritonite	Sim	Sim	23.7
5	F	B	42	3	Aneurisma Aorta	Sim	Sim	26.9
Média			43.6					22.7
DP			6.02					4.56
G2								
6	M	B	82	3	Broncopneumonia	Não	Não	20.2
7	F	B	89	3	Infarto do Miocárdio	Não	Não	17.5
8	F	B	91	3	Infarto do Miocárdio	Não	Não	21.1
9	M	B	83	2	Infarto do Miocárdio	Não	Não	31.5
10	M	B	80	2	Broncopneumonia	Sim	Sim	22.8
Média			91					22.6
DP			4.74					5.32

(Ind) indivíduo; (G1) grupo 1; (G2) grupo 2; (M) masculino; (F) feminino; (B) branca. Idade (anos); IMC (kg/m²); (DP) desvio-padrão

O nível dos discos intervertebrais na coluna lombar e a classificação de PFIRRMANN *et al.* (2001) está apresentado no Quadro 2

Quadro 2: Classificação de PFIRRMANN <i>et al</i> (2001) para os discos intervertebrais dos indivíduos investigados por grupo					
Grupo 1			Grupo 2		
Indivíduo	Disco	Pfirmsmann	Indivíduo	Disco	Pfirmsmann
AGM	L1-L2	IV §	PAA	L1-L2	IV
	L2-L3	II		L2-L3	III §
	L3-L4	II		L3-L4	IV
	L4-L5	III		L4-L5	V
	L5-S1	II			
MAM	L3-L4	II	ZBN	L3-L4	IV
	L4-L5	II		L4-L5	IV
	L5-S1	I		L5-S1	V
JAF	L3-L4	I	BMO	L3-L4	IV
	L4-L5	II		L4-L5	V
	L5-S1	II		L5-S1	IV
ERS	L3-L4	III	JCS	L3-L4	IV
	L4-L5	IV§		L4-L5	IV
	L5-S1	II		L5-S1	III §
EMSB	L3-L4	II	VRU	L3-L4	IV
	L4-L5	III		L4-L5	IV
	L5-S1	III		L5-S1	II §

(§) excluído das análises

5.2 Células metabolicamente ativas

Para a análise do percentual de células metabolicamente ativas, um número mínimo de 200 núcleos em cada região foi quantificado por dois observadores independentes. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as diferentes regiões dos discos (ânulo fibroso anterior (AFa), núcleo pulposo (NP), ânulo fibroso posterior (AFp)) ($p=0,2289$), nem entre os grupos 1 e 2 ($p=0,5805$) (figuras 15 e 16).

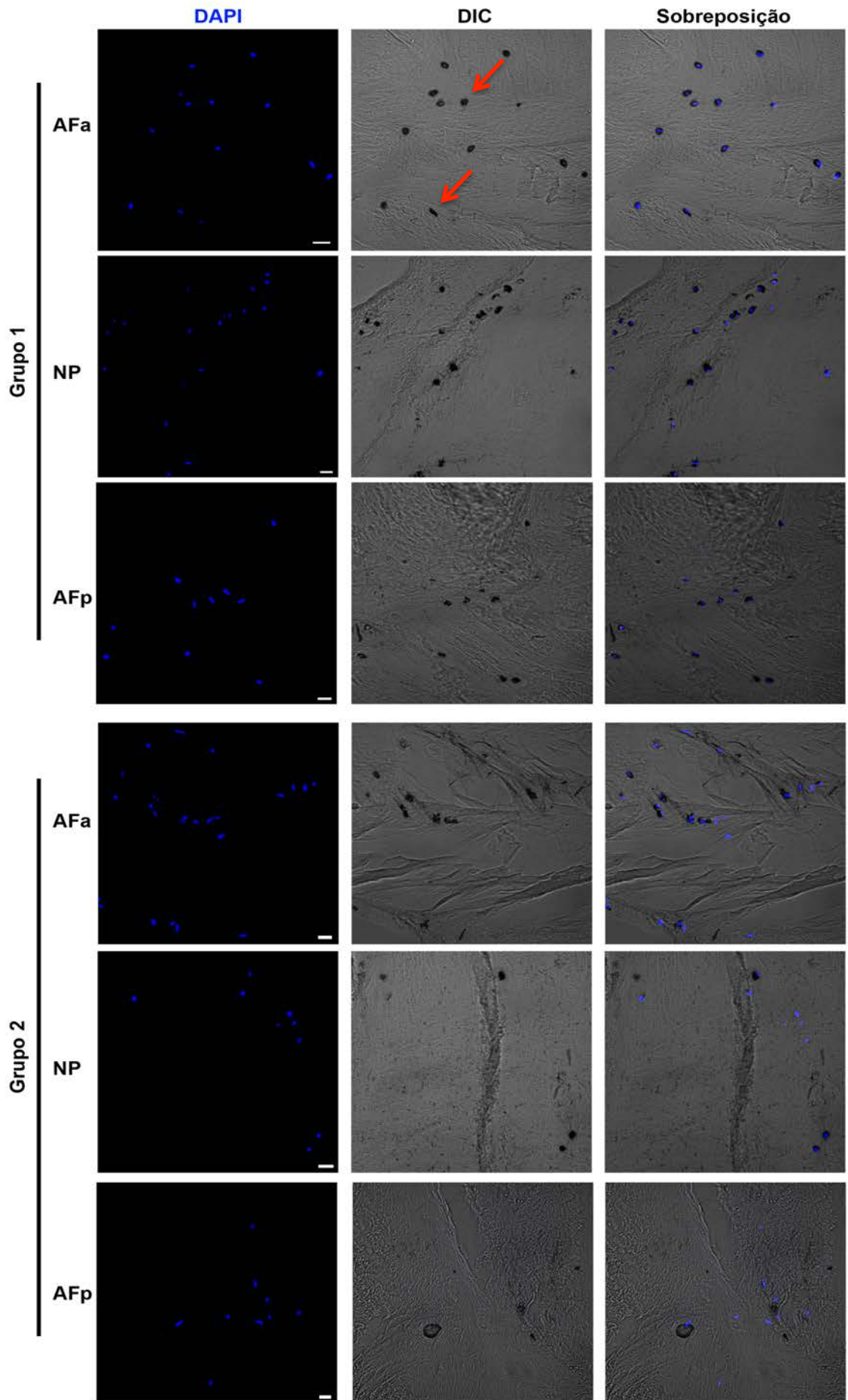


Figura 15: Viabilidade celular das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2. As imagens foram adquiridas no microscópio confocal LSM780[®]. O núcleo foi corado com DAPI (azul). A imagem em cinza corresponde ao DIC, na qual os depósitos de formazam (células metabolicamente ativas) são mais escuros (exemplificado na setas). (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. Barra = 30 μ m.

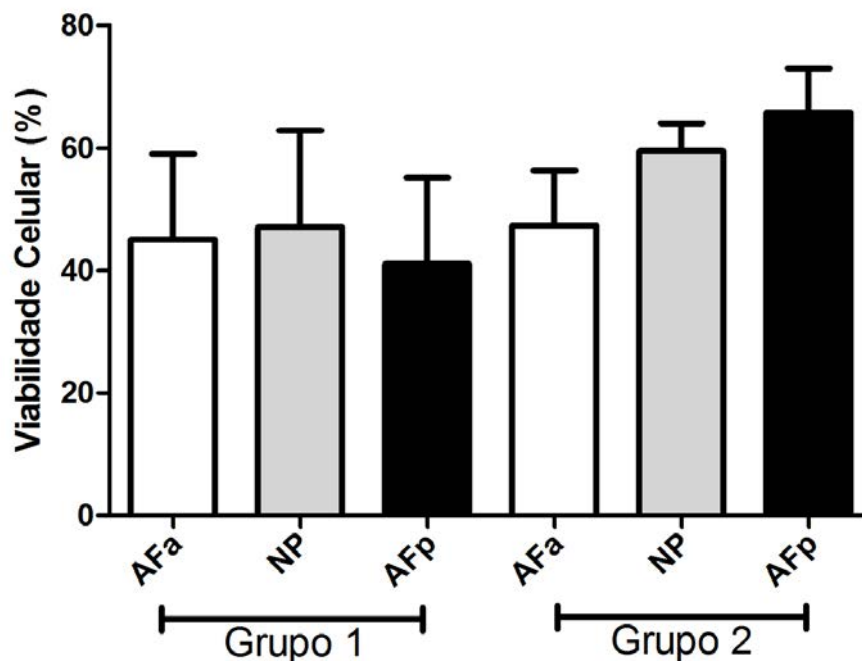


Figura 16: Distribuição da percentagem de células metabolicamente ativas nas diferentes regiões dos discos intervertebrais nos grupos 1 e 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. ($p=0,9559$)

5.3 Orifícios vasculares da placa terminal

Após o preparo das amostras para a investigação dos orifícios vasculares da placa terminal foi possível observar macroscopicamente a

diferença entre a placa terminal inferior e a placa terminal superior, conforme apresentado na figura 17.

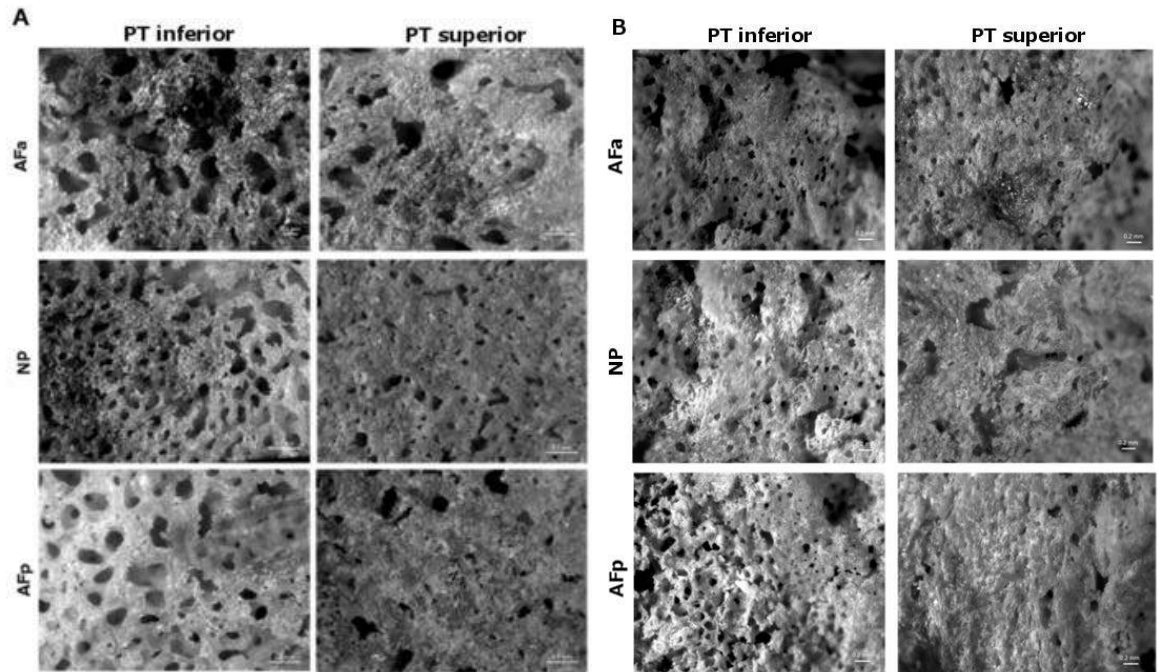


Figura 17: Imagens representativas dos orifícios vasculares na placa terminal. Em A, está representado o grupo 1 e, em B, a representação do grupo 2; (PT) placa terminal; (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. Observe que a placa terminal inferior, em ambos os grupos, apresenta maior quantidade de orifícios. Imagens adquiridas no Stero Microscope Discovery[®] V.8.

A quantificação do número total de vasos de acordo com as regiões demonstrou diferença estatisticamente significante entre a placa terminal inferior e superior em todas as regiões (AFa, NP e AFp) nos grupos 1 e 2 (Tabela 2 e figuras 18 e 19).

Tabela 2: Descrição dos orifícios vasculares nas placas terminais inferior e superior nos grupos 1 e 2.

Orifícios vasculares	Região	Média	EP	IC 95%	p
Grupo 1	AFa inferior	188	30,25	15,86 a 167,10	0,011
	AFa superior	96,47	15,41		
	NP inferior	207,3	27,64	47,13 a 187,00	0,002
	NP superior	90,25	16,51		
	AFp inferior	182,5	20,1	33,62 a 145,20	0,003
	AFp superior	93,06	14,6		
Grupo 2	AFa inferior	203,5	35,19	33,68 a 188,20	0,004
	AFa superior	92,56	9,462		
	NP inferior	180,4	30,52	13,35 a 158,9	0,012
	NP superior	94,33	15,71		
	AFp inferior	187,6	25,95	65,89 a 186,4	<0,001
	AFp superior	61,5	10,74		

(AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposos; (AFp) ânulo fibroso posterior. (EP) erro padrão; (IC) intervalo de confiança; (p) nível de significância.

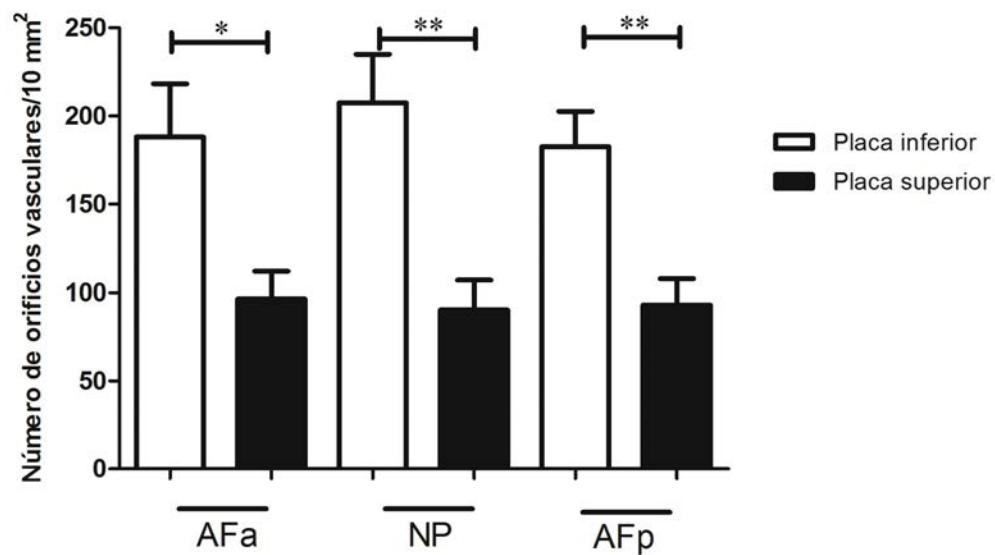


Figura 18: Número de orifícios vasculares por região nos discos intervertebrais do Grupo 1. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposos; (AFp) ânulo fibroso posterior. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

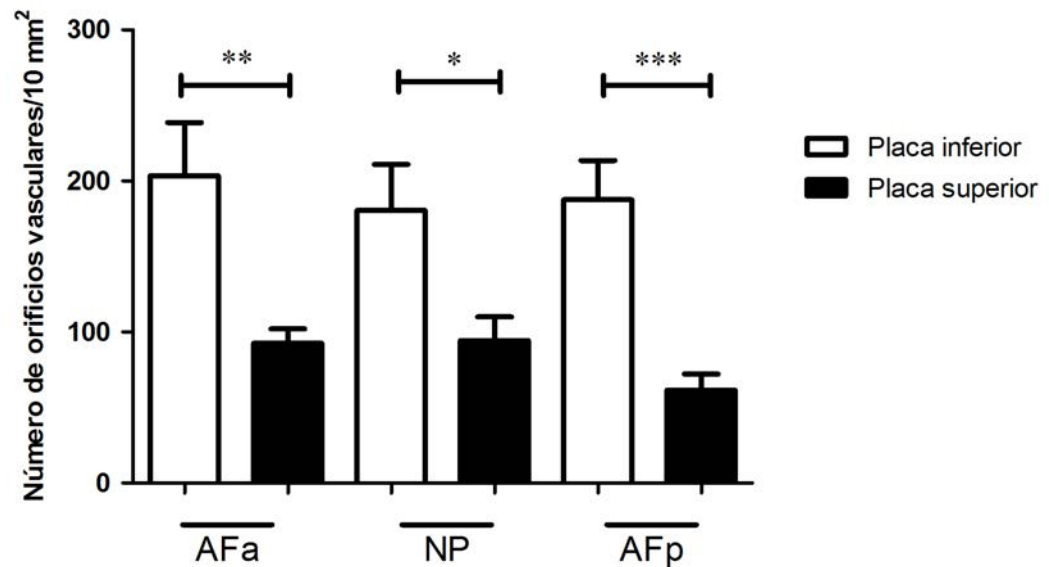


Figura 19: Número de orifícios vasculares por região no disco intervertebral do Grupo 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Na comparação entre as diferentes faixas etárias foi observada variação estatisticamente significativa na região do ânulo fibroso posterior apenas na placa terminal superior, conforme mostrado na figura 20 e tabela 3.

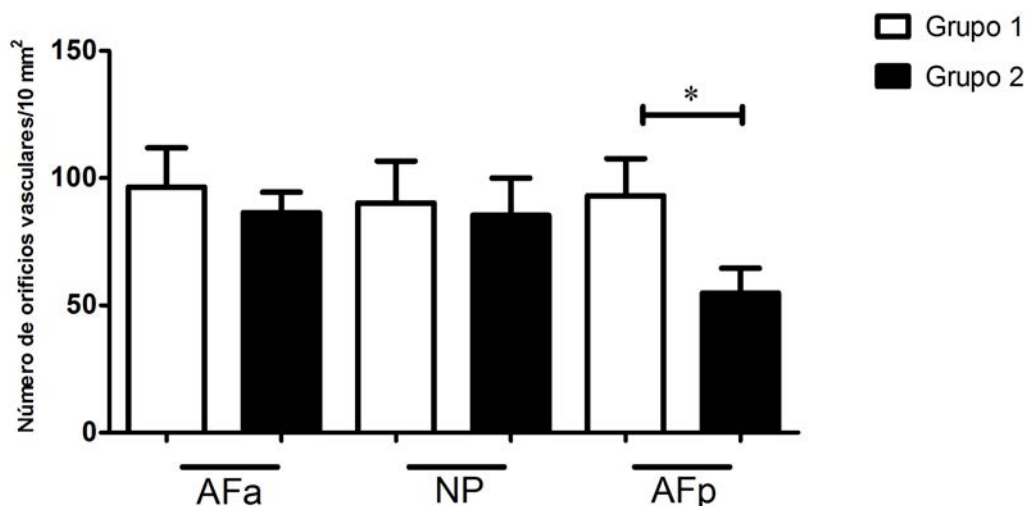


Figura 20: Número de orifícios vasculares nas diferentes regiões da placa terminal superior nos grupos 1 e 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. (*) $p < 0,05$.

Tabela 3: Número de orifícios vasculares nas diferentes regiões das placas terminais nos grupos 1 e 2.

Orifícios Vasculares	Região	Grupo	Média	EP	IC 95%	p
Placa Terminal Inferior	AFa	1	188	30,25	-153,8 a 62,60	0,187
		2	233,6	37,3		
	NP	1	207,3	27,64	-98,62 a 116,6	0,428
		2	198,3	35,45		
	AFp	1	157,6	29,93	-125,4 a 67,77	0,261
		2	186,4	29,93		
Placa Terminal Superior	AFa	1	96,47	25,41	-25,24 a 45,43	0,273
		2	86,38	8,124		
	NP	1	90,25	16,51	-43,36 a 53,11	0,415
		2	85,38	14,63		
	AFp	1	93,06	14,6	0,58 a 75,82	0,024
		2	54,86	9,748		

(AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. (EP) erro padrão; (IC) intervalo de confiança; (p) nível de significância.

5.4 Número total de células

O número total de células em cada uma das regiões do disco intervertebral demonstrou-se constante nas faixas etárias analisadas, conforme figura 21.

No entanto, a análise por região dentro de cada grupo mostrou que a diferença foi significativa entre as áreas no grupo 1 ($p=0,031$) e no grupo 2 ($p<0,001$).

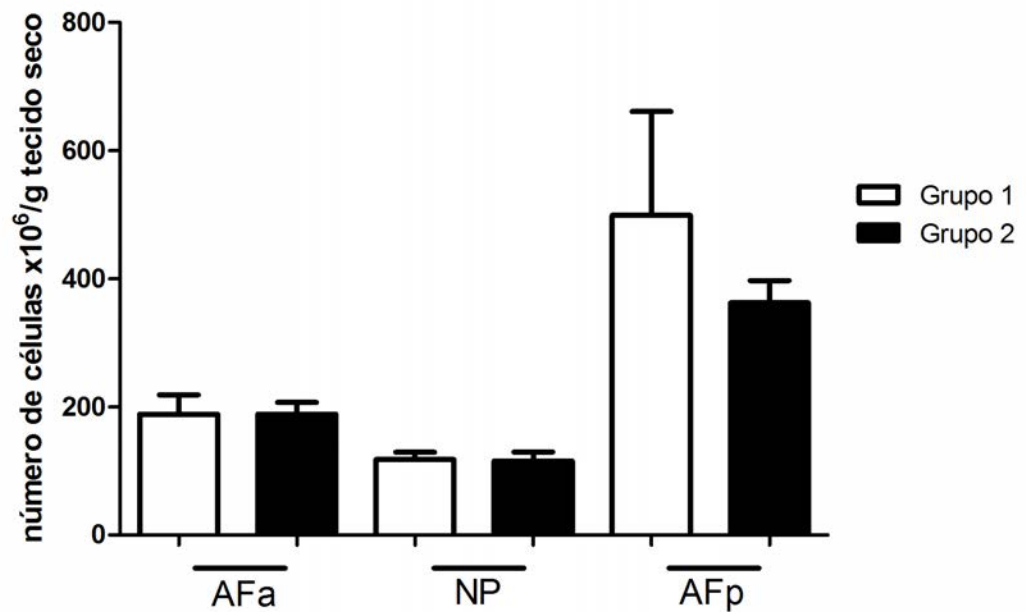


Figura 21: Comparação do número de células estimado nas diferentes regiões do disco entre os grupos 1 e 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior ($p=0,031$).

5.5 Extração e Quantificação de Glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados

A corrida eletroforética das amostras demonstrou a presença de uma banda migratória característica do CS (figura 22) em ambos os grupos investigados.

Após a quantificação, notou-se que existe uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) no núcleo pulposo e ânulo fibroso posterior entre os grupos 1 e 2 (figura 23).

Buscando melhor caracterizar o glicosaminoglicano observado para os grupos 1 e 2, foi realizada a degradação enzimática pela incubação com as enzimas condroitinase AC e condroitinase ABC (figura 24) de um agrupamento de amostras de cada uma das regiões analisadas.

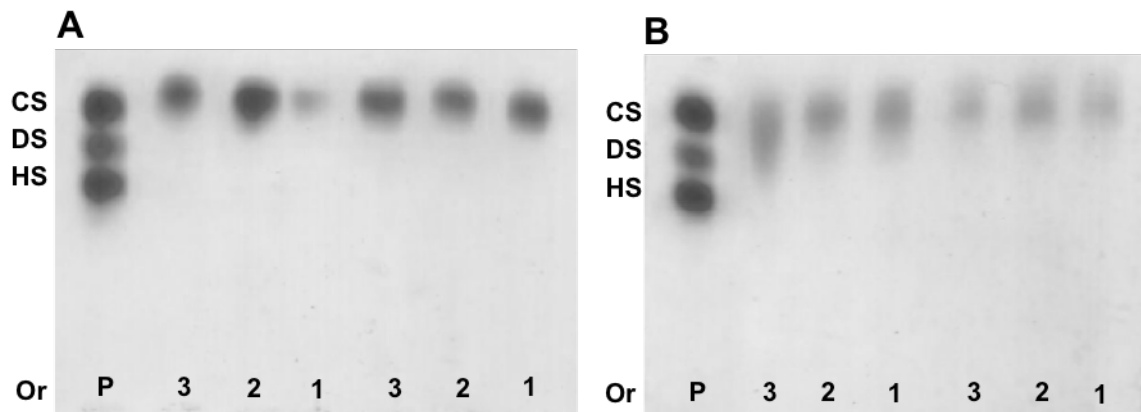


Figura 22: Lâminas de eletroforese em gel de PDA, demonstrando migração das amostras principalmente no nível do condroitim sulfato (CS). Em A, lâmina de eletroforese em gel de PDA de 2 discos intervertebrais do grupo 1. Em B, lâmina de eletroforese em gel de PDA de 2 discos intervertebrais do grupo 2. (DS) = Dermatan sulfato; (HS) = Heparan sulfato; (Or) = Origem da corrida; (P) = Padrão, (1) = Ânulo fibroso anterior; (2) = Núcleo pulposos; (3) = Ânulo fibroso posterior.

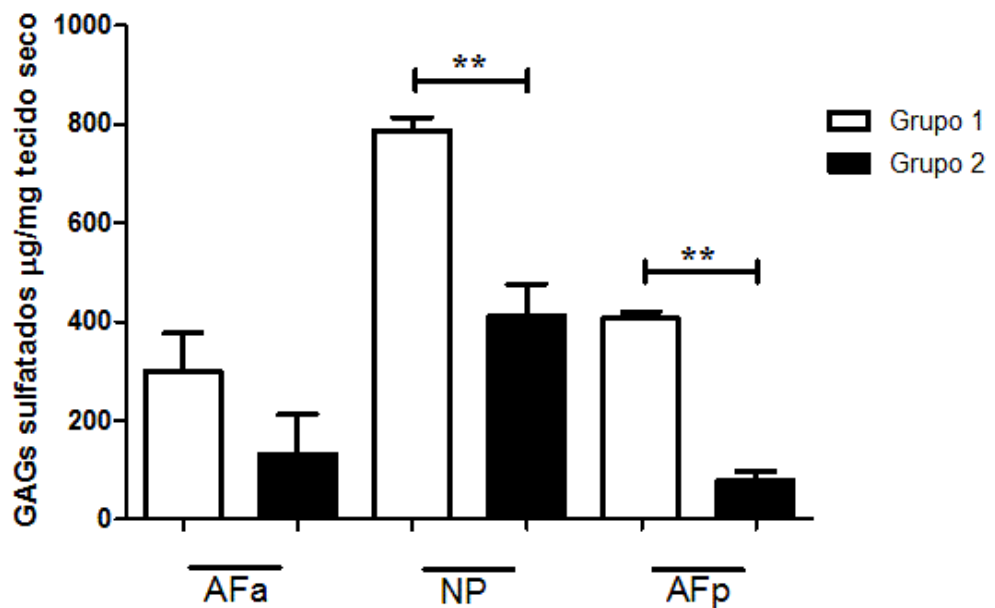


Figura 23: Comparação da quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados nos grupos 1 e 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposos; (AFp) ânulo fibroso posterior; (**) $p < 0,01$.

Conforme demonstrado na figura 24, o perfil eletroforético das amostras, das diferentes regiões dos discos intervertebrais, submetidas à degradação com condroitinase AC, demonstra a presença predominante do condroitim sulfato (CS). No entanto, após degradação com a condroitinase ABC, observa-se a digestão completa das amostras, indicando também a presença de dermatam sulfato (DS).

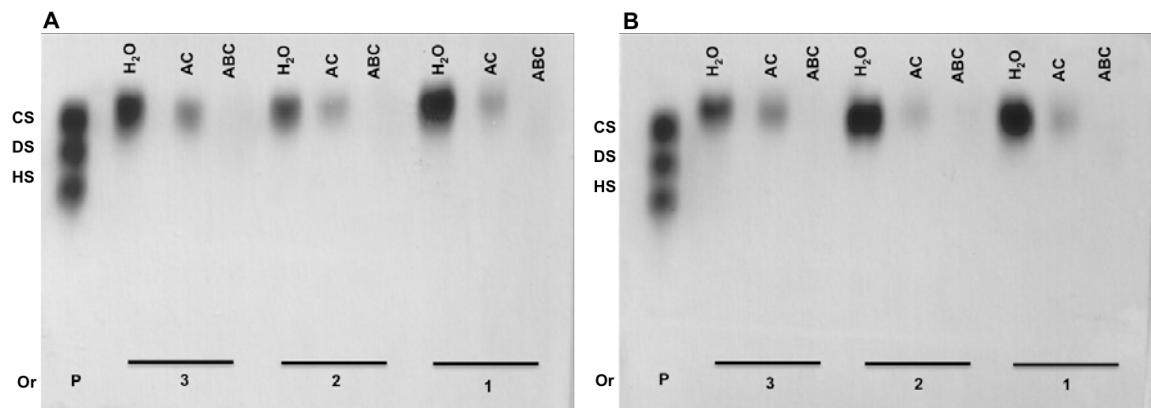


Figura 24: Lâminas de eletroforese em gel de PDA de amostras após incubação para degradação enzimática. Em A, lâmina de eletroforese em gel de PDA de agrupamentos de discos intervertebrais do grupo 1. Em B, lâmina de eletroforese em gel de PDA de agrupamentos de discos intervertebrais do grupo 2. (H₂O) = água; (AC) = condroitinase AC; (ABC) = condroitinase ABC; (P) = padrão; (CS) = condroitim sulfato; (DS) = Dermatam sulfato; (HS) = Heparan sulfato; (1) = Agrupamento de amostras do ânulo fibroso anterior; (2) = Agrupamento de amostras do núcleo pulposo; (3) = Agrupamento de amostras do ânulo fibroso posterior.

5.6 Caracterização e quantificação de dissacarídeos de condroitim sulfato

Observou-se que os dissacarídeos obtidos em todas as regiões do grupo 1 apresentaram distribuição similar à dos subtipos: Δ Di-4S (2-acetamido-2deoxi-3-O-(ácido β -D-glucó-4-enepiranosilurônico)-4-O-sulfo-D-galactose); Δ Di-6S (2-acetamido-2deoxi-3-O-(ácido β -D-glucó-4-enepiranosilurônico)-6-O-sulfo-D-galactose) e Δ Di-0S (2-acetamido-2deoxi-

3-O-(ácido β -D-gluco-4-enepiranosilurônico)-D-galactose, sendo as maiores concentrações localizadas nas regiões dos ânnulos fibrosos anterior e posterior para todos os dissacarídeos. (figura 25).

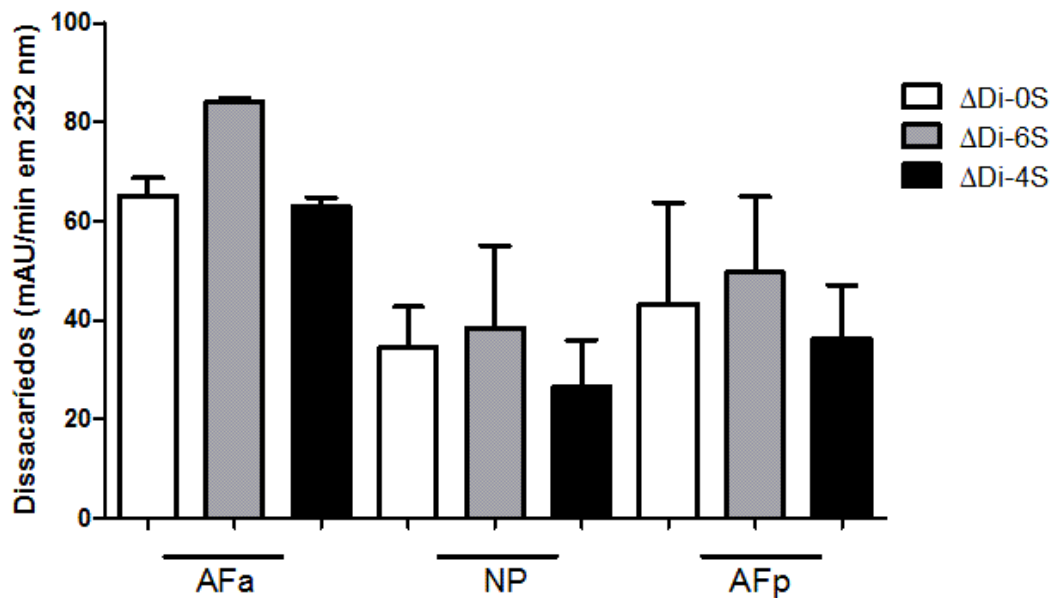


Figura 25: Distribuição de dissacarídeos nas diferentes regiões do disco intervertebral no grupo 1. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. ($p=0,0138$).

No entanto, a distribuição dos dissacarídeos inverte-se no grupo 2, sendo o núcleo pulposo a região com maior concentração (figura 26). O teor de Δ Di-6S do NP em relação a todos os dissacarídeos do AFp do grupo 2 foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

A distribuição porcentual dos dissacarídeos encontra-se representada na figura 27, na qual se nota que no núcleo pulposo do grupo 1 há maior quantidade de Δ Di-6S e também há menor quantidade de Δ Di-0S entre todas as regiões e grupos estudados. O dissacarídeo Δ Di-4S apresentou uma distribuição homogênea em todas as regiões do disco intervertebral, nos grupos 1 e 2.

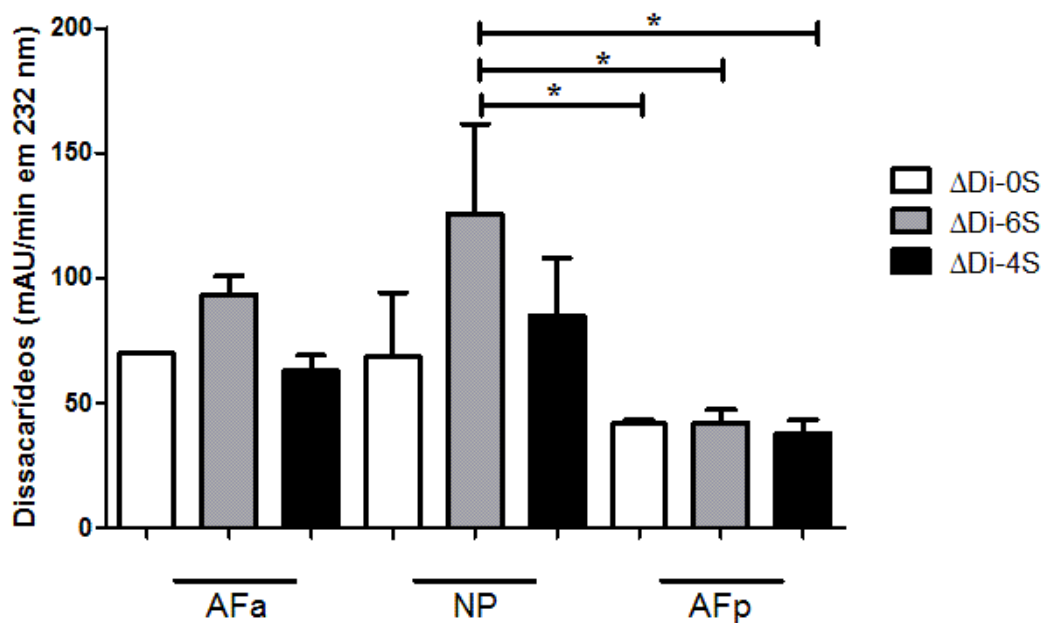


Figura 26: Distribuição de dissacarídeos formados pela ação da condroitinase AC nas diferentes regiões do disco intervertebral no grupo 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. (*) $p < 0,05$.

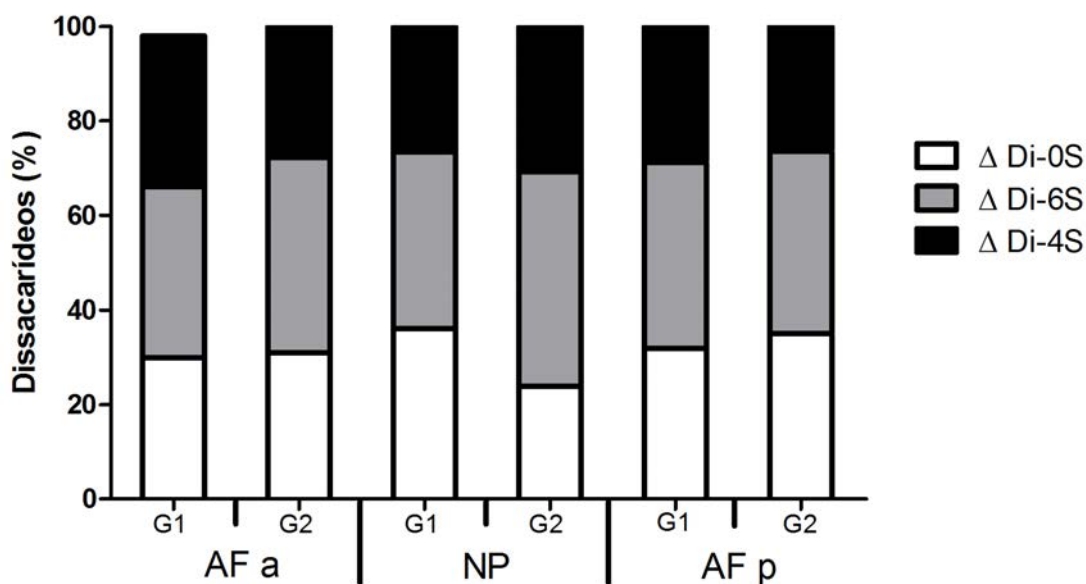


Figura 27: Distribuição da percentagem de dissacarídeos formados pela ação da condroitinase AC nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 (G1) e 2 (G2). (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior.

Ao serem comparados os grupos 1 e 2, observou-se diferença estatisticamente significativa no núcleo pulposo na quantidade de Δ Di-6S, conforme figura 28.

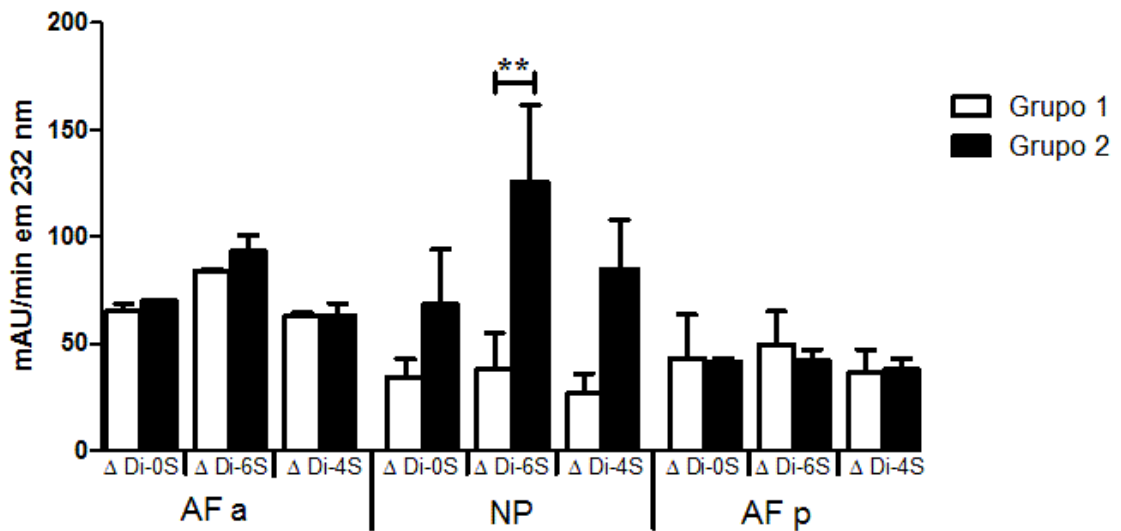


Figura 28: Comparação da distribuição de dissacarídeos formados pela ação da condroitinase AC nas diferentes regiões do disco intervertebral no grupo 1 e 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. (**) $p < 0,01$.

Na tabela 4, observa-se a relação entre os dissacarídeos. Observa-se que a maior relação ocorreu entre Δ Di-6S e Δ Di-0S na região do núcleo pulposo (1,84) do grupo 2, e, a menor relação ocorreu entre Δ Di-4S e Δ Di-0S no ânulo fibroso anterior (0,97) do grupo 1.

Tabela 4: Relação entre os dissacarídeos formados pela ação da condroitinase AC nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2.

	AFa		NP		AFp	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2
$\Delta\text{Di-6S} / \Delta\text{Di-4S}$	1,34	1,49	1,45	1,48	1,37	1,45
$\Delta\text{Di-6S} / \Delta\text{Di-0S}$	1,29	1,34	1,11	1,84	1,15	1,10
$\Delta\text{Di-4S} / \Delta\text{Di-0S}$	0,97	0,90	0,77	1,24	0,84	0,75

(G1) grupo 1; (G2) grupo 2; (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior.

5.7 Quantificação de Ácido Hialurônico

A análise da dosagem de AH entre os grupos etários, nas diferentes regiões, encontra-se representada na figura 29.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as regiões (AFa, NP, AFp) entre os grupos 1 e 2. Nota-se também um perfil de distribuição ao longo do disco com maior concentração de AH no núcleo pulposo em relação aos ânulos fibrosos anterior e posterior. As comparações entre as diferentes regiões analisadas dentro de cada grupo podem ser observadas na tabela 5, na qual se nota que, no grupo 2, as diferenças da quantidade de ácido hialurônico foram estatisticamente significantes.

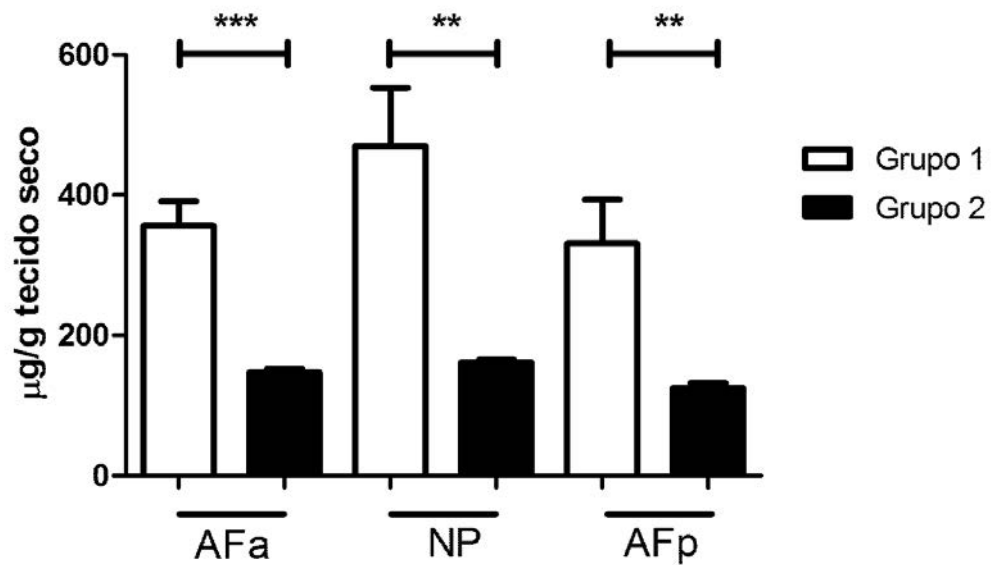


Figura 29: Comparação da dosagem de ácido hialurônico nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Tabela 5: Análise comparativa da dosagem de ácido hialurônico nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2.

Grupo	Comparação	Diferença média	EP	R ²	P	IC (95%)
Grupo 1	AFa X NP	-113,70	90,36	0,1652	0,122	-322,10 a 94,69
	AFa X AFp	25,14	71,57	0,2909	0,367	-139,90 a 190,20
	NP X AFp	138,80	104,00	0,182	0,109	-101,10 a 378,80
Grupo 2	AFa X NP	-14,49	6,42	0,3892	0,054	-29,30 a 0,31
	AFa X AFp	21,89	8,52	0,452	0,033	2,24 a 41,54
	NP X AFp	36,38	7,40	0,7513	0,001	19,32 a 53,45

(AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior; (EP) erro padrão; (R²) coeficiente de determinação; (p) nível de significância; (IC) intervalo de confiança.

5.8 Análise do tamanho de ácido hialurônico

Observou-se que o AH em todas as regiões dos discos intervertebrais dos grupos 1 e 2 possuem distribuição semelhante em relação ao tamanho (valor médio de 200 kDa), fato constatado pela ausência de deslocamento das curvas correspondentes ao tamanho de AH de cada grupo. Contudo, notou-se uma diferença entre os grupos em relação à quantidade total desse GAG (figura 30), confirmando que a diminuição de AH observada foi na quantidade total e não devido a mudanças de peso molecular.

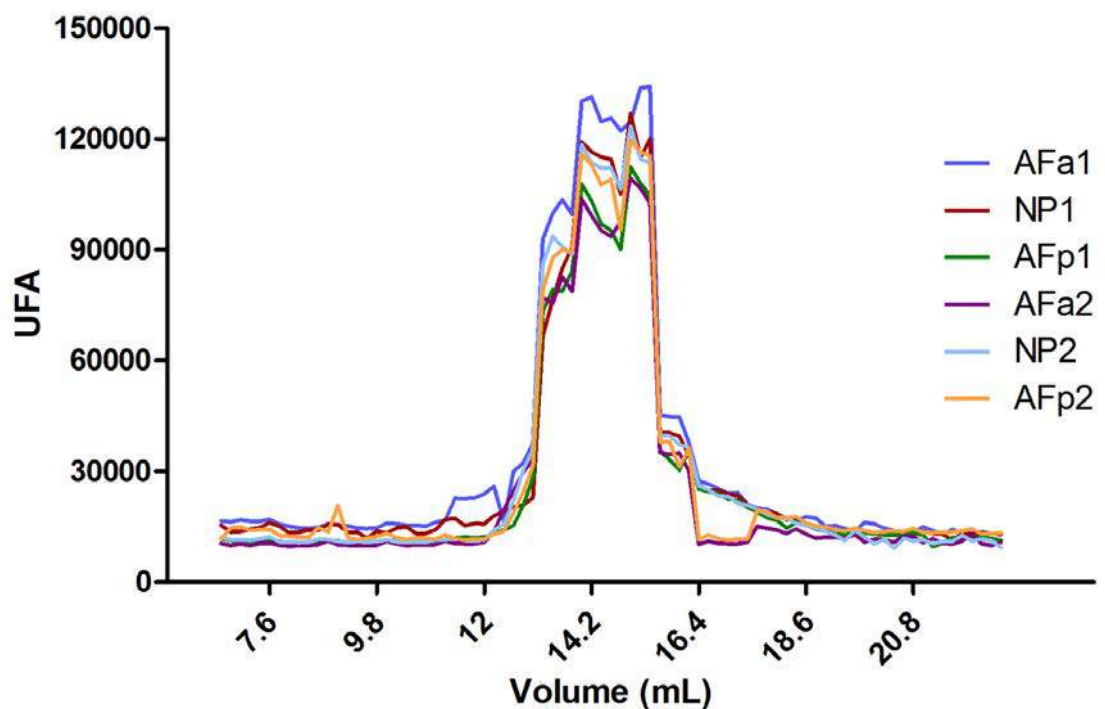


Figura 30: Cromatograma da análise de peso molecular do ácido hialurônico analisados em aparelho Akta Purifier® OHpak SB-805HQ (Shodex®) em série com coluna OHpak SB-804HQ (Shodex®) de 300 x 8,0 mm e detecção ultravioleta a 205 nm após coleta de pico a cada 0,2 ml. (AFa1) ânulo fibroso anterior do grupo 1; (NP1) núcleo pulposo do grupo 1; (AFp1) ânulo fibroso posterior do grupo 1 (AFa2) ânulo fibroso anterior do grupo 2; (NP2) núcleo pulposo do grupo 2; (AFp2) ânulo fibroso posterior do grupo 2.

5.9 Quantificação iônica

Avaliou-se a distribuição dos íons sódio e potássio ao longo do eixo antero-posterior dos discos intervertebrais e as diferenças podem ser observadas na tabela 6. Comparações entre os grupos 1 e 2 mostraram-se estatisticamente significante apenas no núcleo pulposo ($p < 0,01$).

O perfil de distribuição de cada íon por grupo etário pode ser visualizado na figura 31.

Tabela 6: Análise comparativa da distribuição iônica nas diferentes regiões do disco intervertebral em cada grupo e entre os grupos.

Íon/Grupo	Comparação	Diferença média	EP	R ²	p	IC (95%)
Na ⁺ /G1	AFa X NP	86,56	91,03	0,1531	0,193	-147,50 a 320,60
	AFa X AFp	-998,80	84,38	0,9655	<0,001	-1216,00 a -781,90
	NP X AFp	-1085,00	85,25	0,9759	<0,001	-1322,00 a -848,70
Na ⁺ /G2	AFa X NP	588,80	213,20	0,5598	0,016	67,15 a 1110,00
	AFa X AFp	-375,10	424,80	0,1002	0,203	-1380,00 a 629,60
	NP X AFp	-963,90	400,20	0,4532	0,023	-1910,00 a -17,39
K ⁺ /G1	AFa X NP	-0,27	48,96	0,0001	0,498	-120,10 a 119,50
	AFa X AFp	-265,70	68,54	0,7504	0,006	-442,00 a -89,53
	NP X AFp	-265,50	64,50	0,7721	0,005	-431,30 a -99,64
K ⁺ /G2	AFa X NP	58,89	56,45	0,1536	0,169	-79,24 a 197,00
	AFa X AFp	-172,30	106,50	0,3037	0,078	-433,00 a 88,37
	NP X AFp	-231,20	98,75	0,4775	0,057	-472,90 a 10,41
Na ⁺ G1 x G2	AFa X AFa	144,60	213,30	0,0615	0,260	-360,00 a 649,20
	NP X NP	538,80	128,40	0,7788	0,004	208,60 a 869,00
	AFp X AFp	660,30	461,30	0,2546	0,101	-468,40 a 1789,00
K ⁺ G1 x G2	AFa X AFa	85,07	61,51	0,2417	0,108	-65,44 a 235,60
	NP X NP	144,20	42,43	0,6582	0,007	40,39 a 248,10
	AFp X AFp	178,50	123,70	0,2941	0,104	-139,50 a 496,40

(Na⁺) sódio; (K⁺) potássio; (G1) grupo 1; (G2) grupo 2; (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior; (EP) erro padrão; (R²) coeficiente de determinação; (p) nível de significância; (IC) intervalo de confiança.

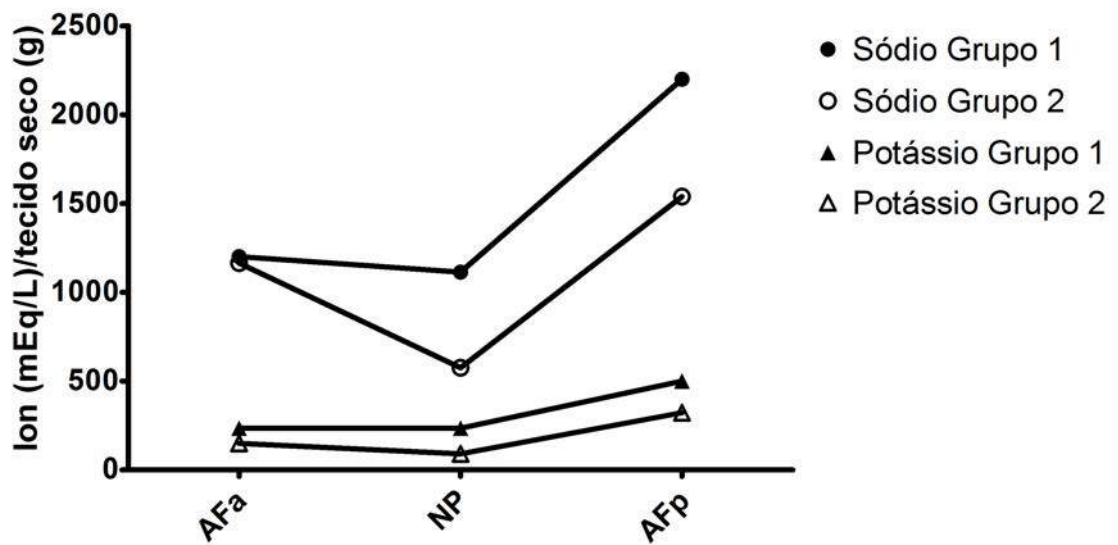


Figura 31: Perfil dos íons sódio e potássio nas diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior.

5.9 Análise de correlação das variáveis

Observa-se na tabela 7, que as correlações estatisticamente significantes entre os parâmetros avaliados foram sempre diretas, ou seja, quanto maior o valor de uma variável maior o valor da outra. A correlação mais forte foi entre os íons Na^+ e o K^+ ($r = 0,971$). As células viáveis apresentaram correlação com o número de orifícios vasculares da placa terminal inferior ($r = 0,467$). A quantidade de GAGs sulfatados está estatisticamente correlacionada com a quantidade de células e ($r = 0,553$ e $p = 0,002$). Quanto maior os valores de GAGs sulfatados estatisticamente maiores são os valores de íons Na^+ e K^+ ($p < 0,001$).

Tabela 7: Análise de correlações de Pearson entre as variáveis analisadas.

Correlação		Total		% Células viáveis	Orifícios Vasc PT inf	Orifícios Vasc PT sup	GAG	AH	Na ⁺
		Células							
% Células viáveis	r	-0,048							
	p	0,810							
Orifícios	r	-0,072	0,467						
	p	0,714	0,016						
Vasc PT inf	r	-0,201	0,229	0,215					
	p	0,239	0,239	0,143					
Vasc PT sup	r	0,553	-0,044	-0,275	-0,296				
	p	0,002	0,823	0,155	0,112				
GAG	r	0,128	-0,211	-0,061	-0,004	0,337			
	p	0,502	0,282	0,755	0,979	0,069			
AH	r	0,868	-0,055	-0,279	-0,201	0,713	0,263		
	p	< 0,001	0,780	0,150	0,288	< 0,001	0,160		
Na ⁺	r	0,837	-0,211	-0,327	-0,279	0,676	0,278	0,971	
	p	< 0,001	0,279	0,089	0,135	< 0,001	0,136	< 0,001	

(Orifícios vasc PT sup) número de orifícios vasculares da placa terminal superior; (Orifícios vasc PT inf) número de orifícios vasculares da placa terminal inferior; (GAGs sulfatados) glicosaminoglicanos sulfatados; (AH) ácido hialurônico; (Na⁺) íon sódio; (K⁺) íon potássio; (r) coeficiente de correlação; (p) nível de significância.

5.10 Distribuição de fibras colágenas

A análise entre a proporção de fibras colágenas com birrefringência esverdeada/avermelhada presentes nas diferentes regiões dos discos intervertebrais demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (figura 32).

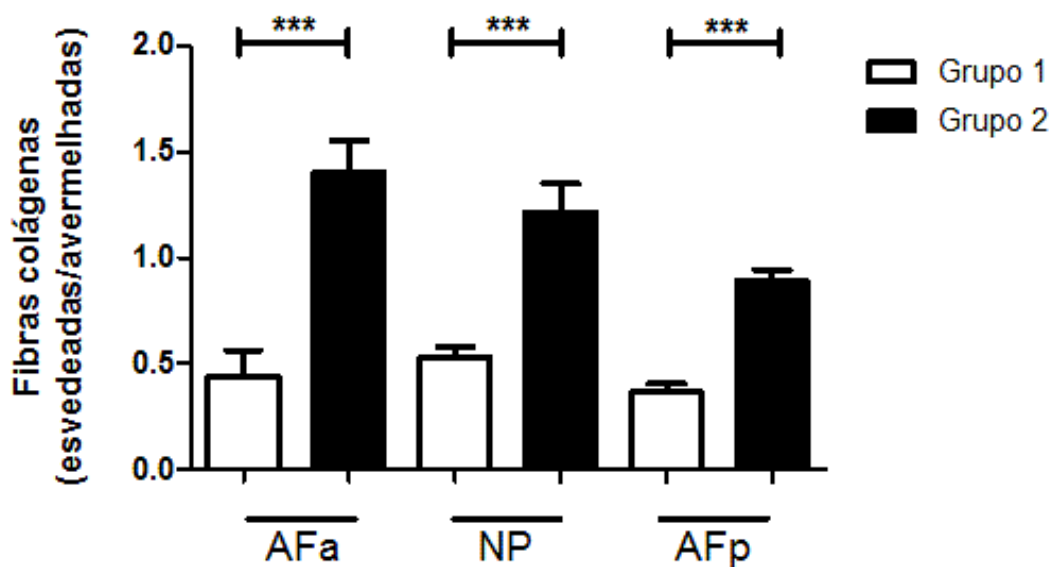


Figura 32: Comparativo da relação entre fibras colágenas esverdeadas/avermelhadas nos discos intervertebrais nos grupos 1 e 2. AFa (ânulo fibroso anterior); NP (núcleo pulposo); AFp (ânulo fibroso posterior); (***) $p < 0,001$.

A birrefringência das fibras colágenas também variou de forma expressiva na análise qualitativa ao microscópio de luz polarizada, sendo mais abundantes, no grupo 1, as fibras com birrefringência avermelhada, indicando fibras espessas e, no grupo 2, predominaram as fibras com birrefringência esverdeadas indicando fibras mais delgadas (figura 33).

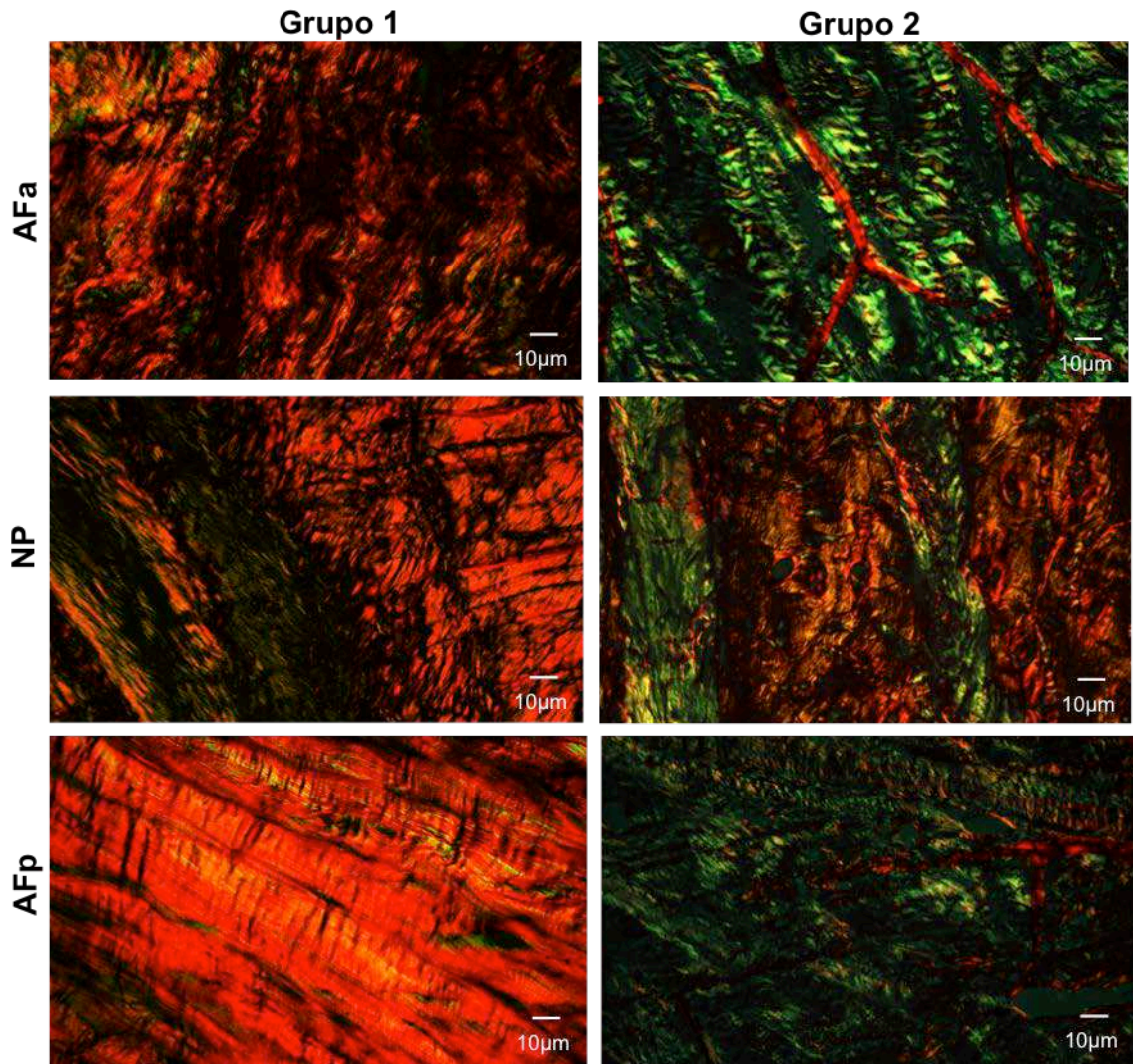


Figura 33: Fotomicrografias de cortes histológicos das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2 evidenciados com picro-sirius red e visualizadas no microscópio de luz polarizada. Observe a predominância de fibras com birrefringência avermelhada (fibras espessas) em todas as regiões do grupo 1. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior.

5.11 Imuno-histoquímica de colágeno tipo II

Na análise por imuno-histoquímica das amostras das diferentes regiões dos discos intervertebrais para os grupos 1 e 2 para identificar a presença e distribuição do colágeno tipo II evidenciou-se uma maior quantidade desse tipo de colágeno na região do núcleo pulposo dos dois

grupos estudados, conforme visualizado na figura 34. Observe também a diminuição da quantidade de colágeno tipo II no ânulo fibroso anterior e posterior do grupo 2.

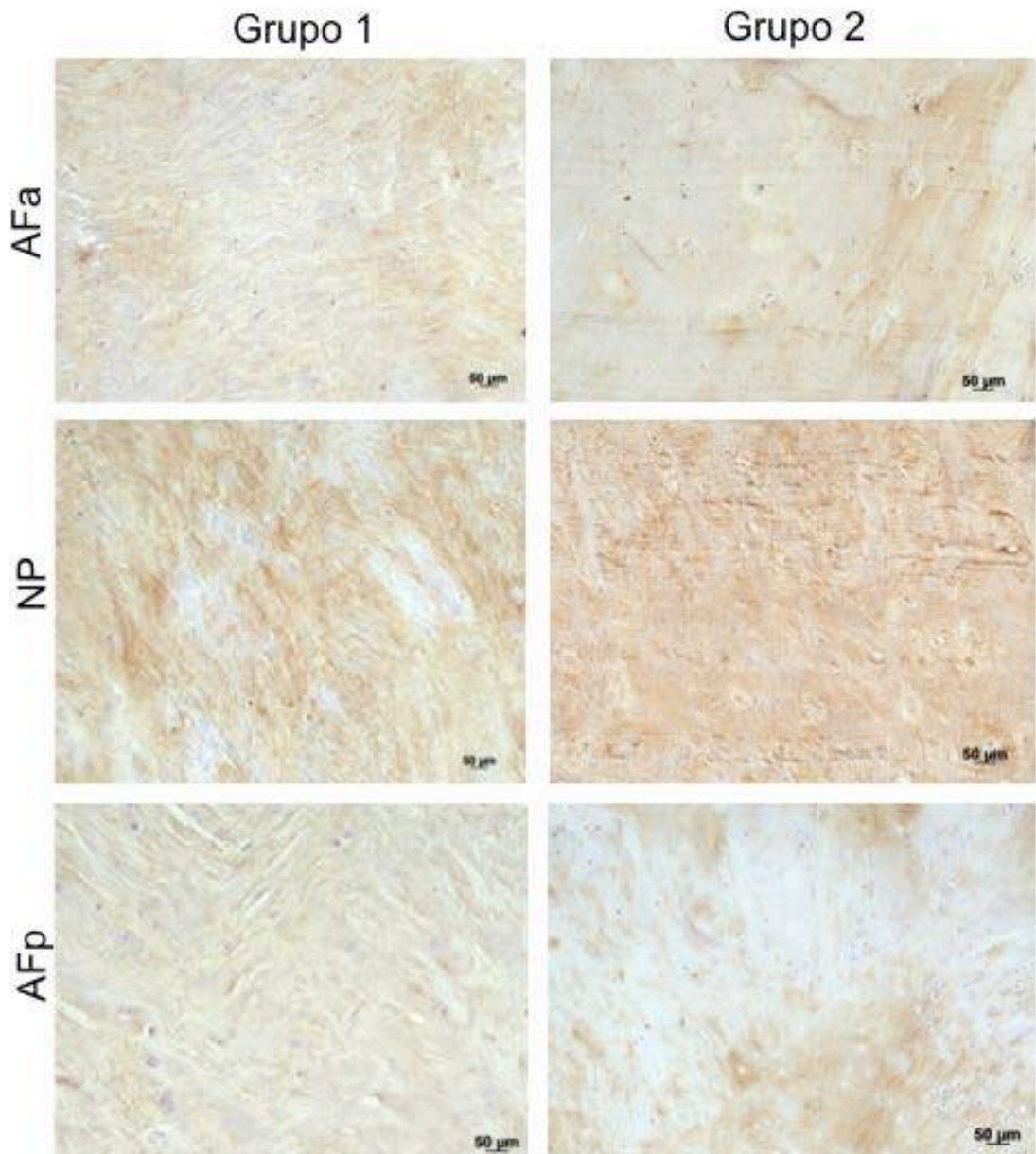


Figura 34: Fotomicrografias de cortes histológicos das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2 submetidos a imunohistoquímica para colágeno tipo II e visualizadas no microscópio óptico. Observe a predominância de fibras de colágeno tipo II nas regiões do NP em ambos os grupos. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior.

5.12 Identificação e distribuição de vasos sanguíneos e nervos

Na análise das amostras das diferentes regiões dos discos intervertebrais para os grupos 1 e 2 por imuno-histoquímica para identificar a presença de vasos sanguíneos com o anticorpo anti CD-31, evidenciou-se uma pequena quantidade de vasos apenas na região do ânulo fibroso posterior dos dois grupos estudados, destacando-se a presença de maior quantidade de vasos sanguíneos na região do ânulo fibroso posterior do grupo 2 em relação à mesma região do grupo 1. Não foram observados vasos nas regiões do núcleo pulposo nem do ânulo fibroso anterior de nenhum disco avaliado (figura 35).

Na análise das amostras das diferentes regiões do disco intervertebral para os grupos 1 e 2 por imuno-histoquímica para identificar a presença e nervos com o anticorpo anti PGP 9.5 – “*neuronal marker*”, evidenciou-se que apenas a região do ânulo fibroso posterior do grupo 2 apresentou marcações indicativas da presença de nervos (figura 36).

Foi observado também que estes nervos encontravam-se próximos a vasos sanguíneos na maior parte dos casos (figura 37) e que a apresentação dos nervos variava de acordo com a sua posição no corte histológico, fato esse confirmado nas amostras-controle em pele humana (figura 37).

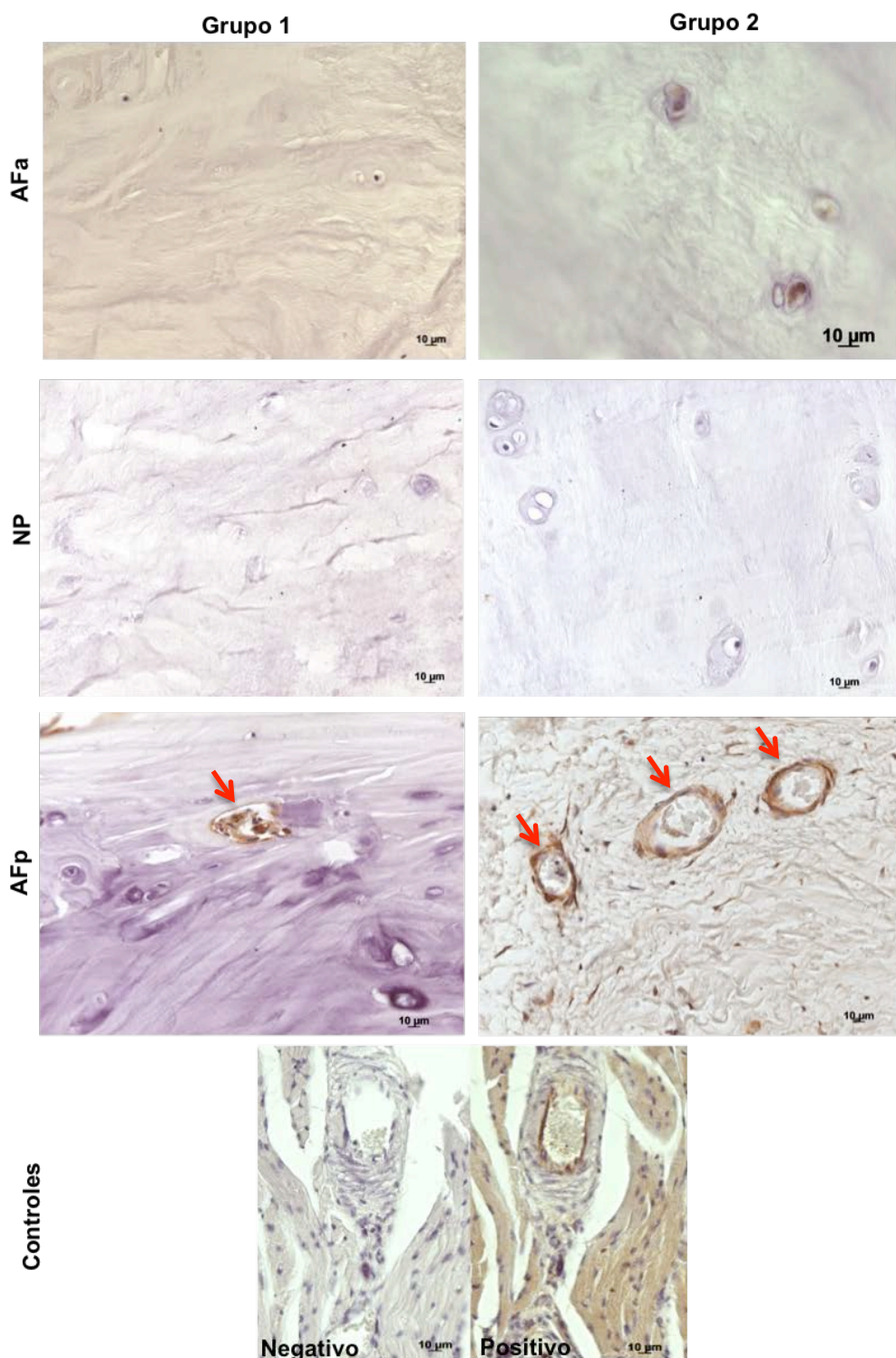


Figura 35: Fotomicrografias de cortes histológicos das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2 submetidos a imuno-histoquímica com anticorpo anti CD-31. Observe a presença de vasos (setas) nas região do AFp dos dois grupos e AFa do grupo 2. Note, na última linha, o controle negativo e positivo em língua de rato. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior.

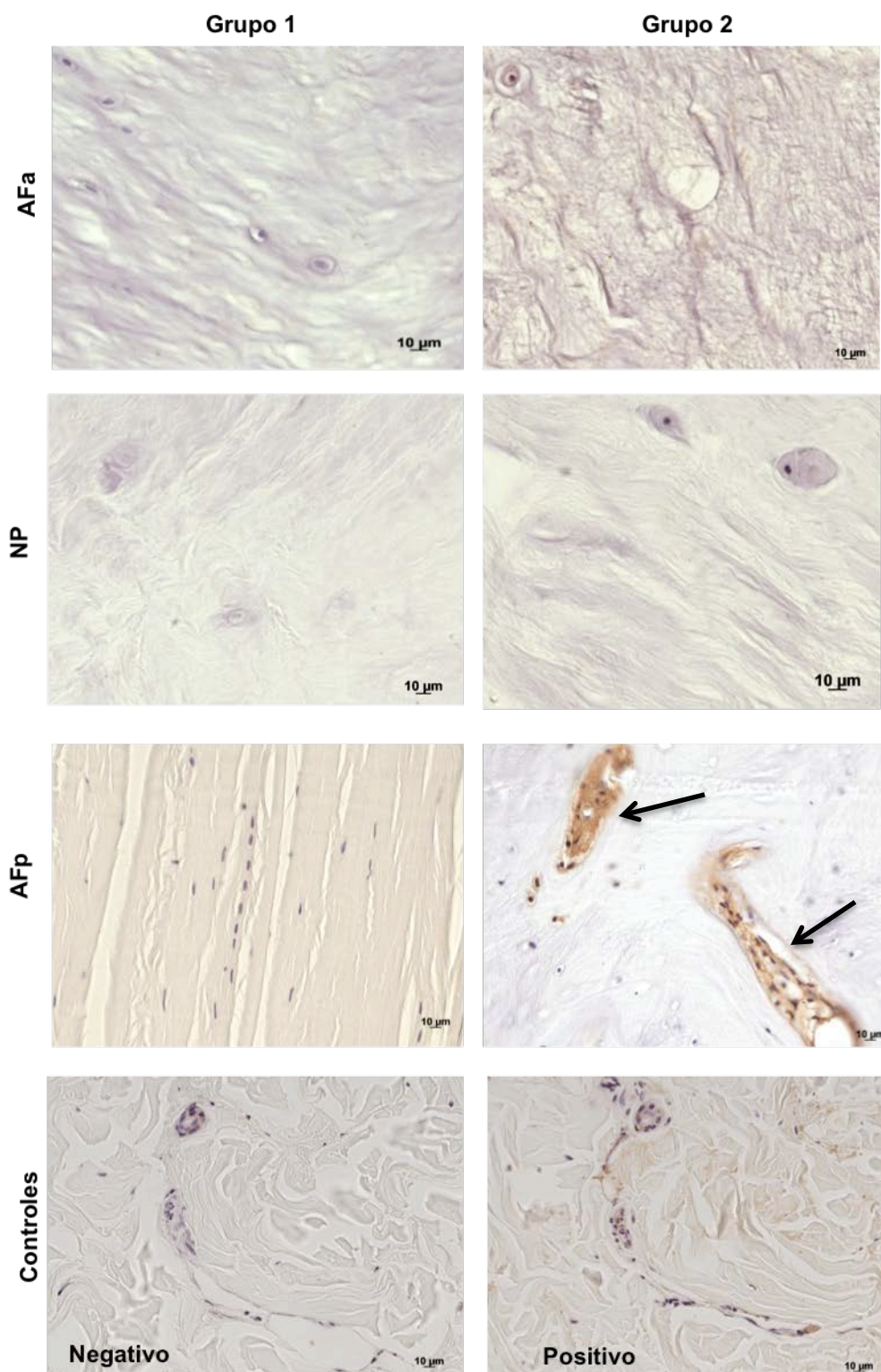


Figura 36: Fotomicrografias de cortes histológicos das diferentes regiões do disco intervertebral nos grupos 1 e 2 submetidos a imunohistoquímica com anticorpo anti PGP9.5 – “neuronal marker”. Observe a presença de nervos (setas) apenas na região do AFp do grupo 2. Na última linha, o controle negativo e positivo em pele humana. (AFa) ânulo fibroso anterior; (NP) núcleo pulposo; (AFp) ânulo fibroso posterior.

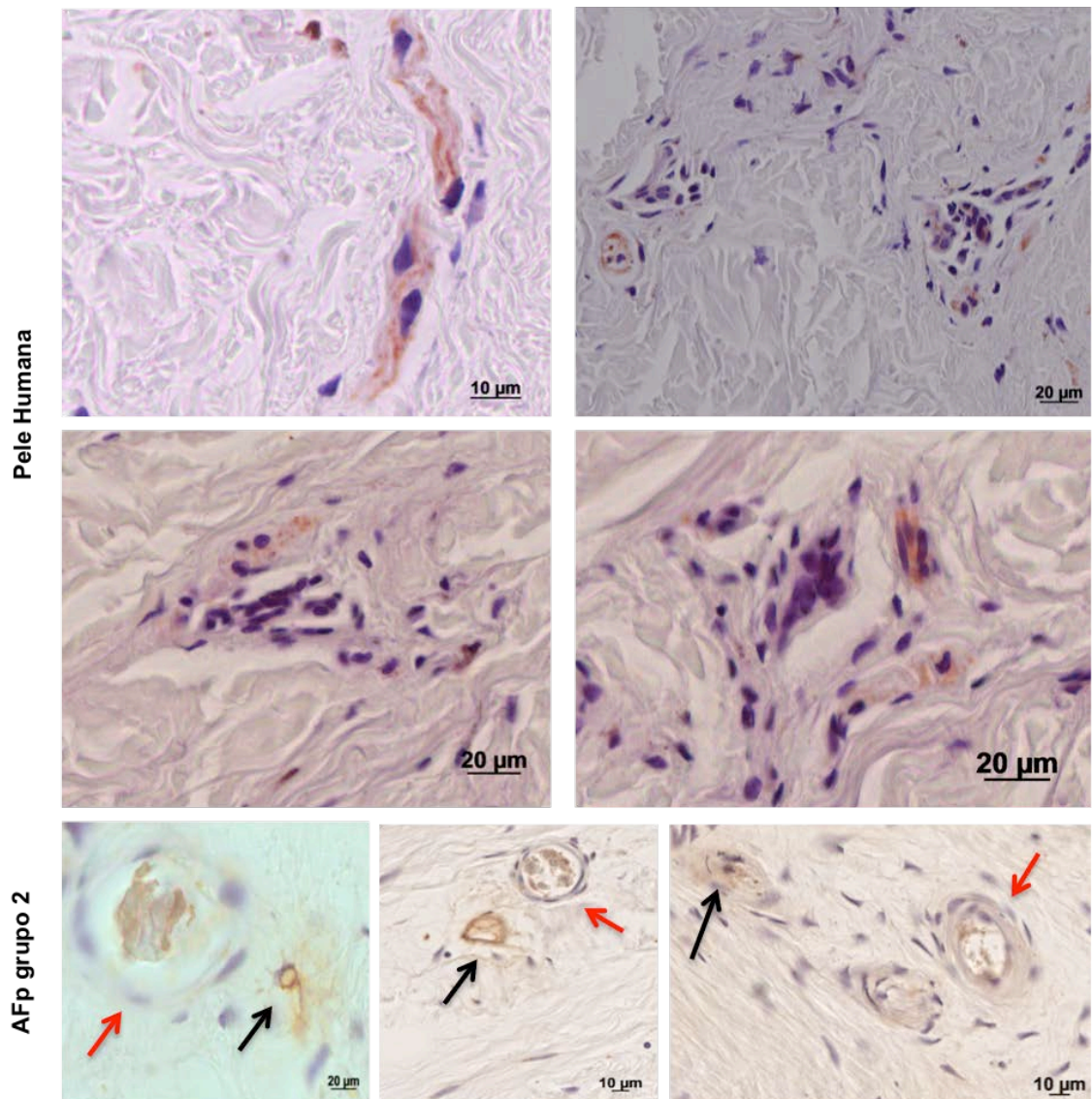


Figura 37: Fotomicrografias de cortes histológicos de controle e ânulo fibroso posterior do disco intervertebral do grupo 2 submetidos a imunohistoquímica com anticorpo anti PGP9.5 – “neuronal marker”. Observe no controle positivo de pele humana as diversas formas encontradas dos nervos dependendo da sua posição no corte histológico. Na região do ânulo fibroso posterior (AFp) do grupo 2, observe a presença dos nervos (setas pretas) próximos a vasos (setas vermelhas).

DISCUSSÃO

Muitas são as condições que promovem a degeneração e a degradação do núcleo pulposo e ânulo fibroso alterando suas propriedades, afetando a capacidade de sustentação de carga e promovendo lesões de diversos tipos, como colapso do disco intervertebral, hérnia ou espondilose. A nutrição insuficiente do disco tem sido alvo de importantes suspeitas como sendo fator primordial no início desse processo de degeneração (ROBERTS, MENAGE, URBAN, 1989; BENNEKER *et al.*, 2005a; RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

A capacidade de células de cartilagem articular manterem-se metabolicamente ativas por longo período de tempo é conhecida, podendo chegar até 90% de viabilidade ao final de 28 dias quando preservadas a 4°C (WILLIAMS *et al.*, 2005). O disco intervertebral é avascular na sua região mais interna e suas células mantêm-se por processo de difusão (ROBERTS, MENAGE, URBAN, 1989; ROUGHLEY, 2004; BENNEKER *et al.*, 2005a; ADAMS & ROUGHLEY, 2006; RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Dessa forma, acreditamos que a coleta da coluna de cadáveres com menos de 24 horas do horário do óbito, cuja temperatura corporal decai naturalmente, e a manutenção das peças anatômicas a -20°C até o momento da coleta dos discos (entre 8 e 12 horas a partir da captação da coluna) não tenha interferido de forma importante nos resultados de viabilidade do presente estudo, nem em outros resultados bioquímicos ou histológicos.

Baseando-se na hipótese de que a diminuição da viabilidade de células é um dos principais fatores responsáveis pela degeneração do disco intervertebral, as nossas amostras foram avaliadas pela técnica de MTT (WANG *et al.*, 2011) e verificamos que, mesmo no grupo com idade acima de 80 anos, as células do disco intervertebral foram capazes de se manter viáveis em todas as regiões investigadas. Em termos percentuais, nota-se uma estabilidade com relação ao número de células metabolicamente ativas

quando os grupos são comparados. Entretanto, a análise dos produtos de matriz extracelular sintetizados pelas células do interior do disco intervertebral tais como: glicosaminoglicanos sulfatados, ácido hialurônico e colágeno revelou que eles tornam-se alterados com o aumento da faixa etária, o que pode influenciar na qualidade e função do disco.

A viabilidade das células está diretamente ligada ao processo nutricional e, para isso, dependem do adequado suprimento sanguíneo para aporte de nutrientes e retirada de metabólitos (GRUNHAGEN *et al.*, 2006). Nesse sentido, a placa terminal e sua vascularização são de vital importância para a integridade do disco intervertebral, em qualquer faixa etária. Desde o trabalho de CROCK & YOSHIZAWA (1976), a vascularização do corpo vertebral lombar e da placa terminal já é bem conhecida, porém, o seu significado clínico para o disco tem sido alvo de vários estudos. BENNEKER *et al.* (2005a) observaram a relação indireta entre o número de orifícios da placa terminal e o grau de degeneração do disco, mas não correlacionaram com a idade, enquanto BOUBRIAK *et al.* (2013) avaliaram os orifícios vasculares em discos intervertebrais da cauda de boi, observando a relação direta entre o número de orifícios e a espessura do disco. Acreditando que as placas terminais tenham influência diferente no disco intervertebral, realizamos o estudo comparando por faixa etária, por região (ânulo fibroso anterior (AFa), núcleo pulposo (NP) e ânulo fibroso posterior (AFp)) e também por posição da placa em relação ao disco (superior ou inferior). Dessa forma, observamos que a placa terminal inferior foi a placa com maior número de orifícios vasculares para penetração de vasos sanguíneos e suprimento para a nutrição do disco intervertebral, em todas as regiões, de anterior a posterior. Acreditamos que a região inferior necessita de maior número de vasos pois precisa vencer as forças diárias de carga axial e os efeitos gravitacionais para ascender pelo

corpo vertebral em direção à placa terminal inferior, justificando a maior concentração de vasos nessa região. Entretanto, excetuando-se a placa terminal superior do AFp do grupo 2, na qual foi observada a diminuição no número de orifícios em relação ao grupo 1, não houve diferença entre as demais regiões analisadas para os grupos. Essa alteração pode estar relacionada ao processo de calcificação da placa terminal que tenha se iniciado na região do AFp em direção à anterior, promovendo alteração na quantidade de GAGs da placa e conseqüentemente do disco, conforme ROBERTS *et al.* (1996) corroborando os achados deste estudo, segundo os quais a quantificação dos GAGs diminuiu de maneira estatisticamente significativa nas regiões do AFp e NP nos indivíduos do grupo 2.

Dados da literatura demonstram que a quantidade de células se mantém estável ao longo das faixas etárias (LIEBSCHER *et al.*, 2011) ou que sofre discreto aumento no número total de células entre 51 e 70 anos de idade (SINGH *et al.*, 2009), ou ainda, que pode apresentar um aumento gradual nos estágios finais de degeneração, porém, sem correlação com a idade (RODRIGUEZ *et al.*, 2011). O presente estudo buscou avaliar a quantidade total de células nos grupos etários mais homogêneos, visto que não se encontrou, na literatura, avaliação de indivíduos em grupos etários tão uniformes. SINGH *et al.* (2009) utilizaram apenas seis discos abaixo de 50 anos e RODRIGUEZ *et al.* (2011) utilizaram 11 discos, porém, de diversos graus de degeneração, enquanto neste estudo foram utilizados 15 discos intervertebrais e todos com grau menor ou igual a III de PFIRRMANN *et al.* (2001).

Nossos achados foram concordantes com os de LIEBSCHER *et al.* (2011) e observamos que o número total de células se mantém estável com a idade nos grupos estudados, porém, com menor quantidade de células na região do núcleo pulposo. Entretanto, o número de células metabolicamente

ativas apresentou correlação direta com o número de orifícios da placa terminal inferior, reforçando ainda mais a importância desta região para a nutrição do disco intervertebral. Ainda, como os grupos foram divididos por faixa etária e considerados apenas os discos iguais ou menor que grau III de Pfirrmann, no grupo 1, e maior ou igual a grau IV, no grupo 2, não foi possível realizar comparação entre o grau de degeneração e o número de células.

Baseados em dados da literatura que referem que, embora a densidade celular possa aumentar ligeiramente com a degeneração, a função destas células diminuiu com o avanço da idade (RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Ou mesmo que, com a manutenção do número total de células e também da densidade de células metabolicamente ativas ao longo dos anos, há dificuldade para essas células em manter a matriz extracelular, realizamos avaliação de alguns componentes dessa matriz do disco intervertebral.

A distribuição dos GAGs nos discos intervertebrais já é bem conhecida (OLCZYK, 1994; ANTONIOU *et al.*, 1996; ROBERTS *et al.*, 1996; ROUGHLEY, 2004; ADAMS & ROUGHLEY, 2006; CHAN *et al.*, 2011, SIVAN *et al.*, 2014). Em nosso estudo, reafirmamos esses achados da literatura que demonstram a diminuição dos níveis de GAGs nos discos intervertebrais em indivíduos mais idosos. Alguns trabalhos demonstram a presença de pequena quantidade de dermatam sulfato (DS) no disco intervertebral (COLE *et al.*, 1985; SIVAN *et al.*, 2014), e em nossos achados também identificamos a presença desse glicosaminoglicano no disco intervertebral comprovada após degradação enzimática com a enzima condroitinase ABC.

Segundo RODRIGUEZ *et al.* (2011), a viabilidade das células do disco intervertebral diminui com a idade, havendo diminuição da

quantidade de GAGs/célula. Em nosso estudo, também observamos diminuição do número absoluto de GAGs com a idade e, principalmente, observamos uma correlação positiva entre a densidade total de células e os GAGs. No entanto, não verificamos essa mesma correlação com as células metabolicamente ativas. Isso sugere que os GAGs não influenciam diretamente na manutenção da viabilidade das células, entretanto, a diminuição do teor dos GAGs, na comparação entre os grupos, associado à diminuição do colágeno, pode ser indicativo da alteração do arranjo da matriz extracelular do disco intervertebral. ROBERTS *et al.* (1996) demonstraram que os GAGs da placa terminal regulam o movimento de solutos para o interior do disco intervertebral, representando função importante no controle osmótico e no processo de nutrição. No entanto, observamos que as células se mantêm viáveis em número proporcionalmente inalterado ao longo dos anos, e o declínio na quantidade de GAGs deve estar relacionado com a permeabilidade e a função da placa terminal que, com o avançar da idade, diminui a sua função e permite a perda de proteoglicanos ativos do interior do disco, promovendo a alteração da matriz extracelular.

Assim como a quantidade de GAGs, também o seu grau de sulfatação altera ao longo dos anos. Estudos de cartilagem de diferentes ossos demonstram que o dissacarídeo 2-acetamido-2deoxi-3-O-(ácido β -D-glucó-4-enepiranosilurônico)-6-O-sulfo-D-galactose (Δ Di-6S) é o mais abundante em vértebras de crianças (MOURÃO *et al.*, 1976) e no disco intervertebral de adultos (OLCZYK, 1994). Em cães, a sulfatação não varia de forma estatisticamente significativa ao longo das regiões do disco intervertebral (COLE *et al.*, 1985), porém, há maior quantidade de Δ Di-6S no núcleo pulposo do que no ânulo fibroso anterior e posterior, enquanto o

oposto (menor quantidade no núcleo) ocorre com 2-acetamido-2deoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-enepiranosilurônico)-4-O-sulfo-D-galactose (Δ Di-4S). Há aumento da relação Δ Di-6S/ Δ Di-4S com a idade (OLCZYK, 1994), fato esse também observado neste estudo. Entretanto, OLCZYK (1994) observou, em seu estudo, que tanto Δ Di-6S quanto Δ Di-4S apresentavam uma maior quantidade no núcleo do que no ânulo em todas as idades, divergindo de nossos achados que apontam uma inversão no padrão de distribuição, sendo nos indivíduos mais jovens o núcleo pulposo a área que apresenta menor quantidade de Δ Di-6S, Δ Di-4S, e Δ Di-0S, enquanto indivíduos mais idosos apresentam quantidade maior desses dissacarídeos no núcleo pulposo, porém, Δ Di-6S é sempre o mais abundante em qualquer região. Isso sugere efeito protetor na integridade da superfície da placa terminal pelo Δ Di-6S, enquanto Δ Di-4S que tem efeito no processo de calcificação de ossos longos (MOURÃO *et al.*, 1976) parece estar envolvido também na nutrição do disco intervertebral, pois é sabido que há calcificação da placa terminal com a degeneração e a escoliose (ROBERTS *et al.*, 1996; INKINEN *et al.*, 1999). Neste estudo não avaliamos a calcificação das placas terminais, mas as alterações dos dissacarídeos reforçam essa hipótese.

O disco intervertebral apresenta também quantidade elevada de ácido hialurônico (AH) (HARDINGHAM & ADAMS, 1976; INKINEN *et al.*, 1999; CHAN *et al.*, 2011) que, no arranjo com os GAGs sulfatados formando o agregam, mantém a carga negativa no interior do disco intervertebral, atraindo água e auxiliando na manutenção da hidratação do núcleo pulposo a fim de resistir às forças de compressão (CHAN *et al.*, 2011). O AH apresenta concentrações maiores na região do núcleo pulposo do que no ânulo fibroso (HARDINGHAM & ADAMS, 1976). Em nosso

estudo observamos distribuição de AH concordante à literatura, embora também seja abundante a presença de AH na transição entre o ânulo fibroso e o núcleo pulposo e entre as lamelas de colágeno (INKINEN *et al.*, 1999). Na placa terminal de cães, o AH apresenta uma concentração maior que em qualquer outra região do disco (INKINEN *et al.*, 1999) e também maior do que no disco intervertebral humano (INKINEN *et al.*, 1999). Alguns autores acreditam que o metabolismo do AH na placa terminal é modificado com a idade e o processo de degeneração, promovendo alterações na síntese e na degradação da matriz extracelular, mudando as propriedades de transporte da placa terminal (ANTONIOU *et al.*, 1996; ROBERTS *et al.*, 1996; INKINEN *et al.*, 1999). Nossos resultados diferem de HARDINGHAM & ADAMS (1976) quanto à quantidade de AH em grupos etários. Esses autores avaliaram apenas um disco de criança de cinco anos de idade e outro disco de adulto de 65 anos, observando um aumento na quantidade de AH em todas as regiões do disco. Em contrapartida, verificamos diminuição importante das concentrações de AH com o avançar da idade em todas as regiões estudadas. Dessa forma, acreditamos, assim como ANTONIOU *et al.*, (1996); ROBERTS *et al.*, (1996) e INKINEN *et al.*, (1999) que a concentração de AH está envolvida no processo de envelhecimento e degeneração do disco.

Para elucidar se a diminuição observada na quantidade total de AH foi devida à perda de AH ou se foi devida à modificação de peso molecular, realizamos a cromatografia líquida de alta eficiência e observamos que o peso molecular médio das amostras foi de 200 kDa em todas as regiões do disco em ambos os grupos. Estudos em cartilagem articular de humanos demonstram que o peso molecular do AH em indivíduos saudáveis é em torno de 6000 kDa, enquanto no joelho artrítico o peso molecular decai para 500 – 3000 kDa (ELMORSY *et al.*, 2014). No entanto, não

encontramos relatos sobre o tamanho do AH no disco intervertebral. Quanto ao efeito protetor do AH, alguns autores afirmam que grandes tamanhos de AH são melhores para a cartilagem articular (KIKUCHI, YAMADA, SHIMMEI, 1996; ELMORSY *et al.*, 2014), entretanto, em cultura de células do disco intervertebral, há controvérsia na literatura. QUERO *et al.* (2013) afirmam que AH de alto peso molecular mediam a degeneração do disco e mecanismos de dor lombar por meio de ativação de vias de sinalização de receptores tipo Toll-2. No entanto, JEONG *et al.* (2014) observaram que culturas de células de disco proliferam melhor e produzem mais GAG em gel de baixo peso molecular (27 kDa). Nosso estudo é pioneiro na descrição do tamanho do AH do disco intervertebral e poderá ajudar a compreender porque as células do disco respondem bem aos extremos de peso molecular.

A manutenção da carga negativa no interior do disco é fundamental para promover condições para o núcleo pulposo resistir às forças aplicadas diariamente na coluna lombar (KRAEMER, KOLDITZ, GOWIN, 1985; CHAN *et al.*, 2011). Essa carga iônica é fornecida principalmente pelos GAGs que facilitam a entrada de cátions monovalentes, representados principalmente pelos íons Na^+ e K^+ , que são atraídos para a matriz em altas concentrações e proporcionais à quantidade de GAGs (MOBASHERI, 1998). Dessa forma, como a quantidade de GAGs é maior no núcleo pulposo, deixando essa região mais carregada negativamente, a entrada de grandes solutos e moléculas negativas acontece mais facilmente no ânulo fibroso. Enquanto os cátions monovalentes tem maior facilidade de entrada na região central da placa terminal (URBAN & MAROUDAS, 1979).

Em nosso estudo, observamos que a distribuição dos cátions Na^+ e K^+ foi a mesma que a de GAGs nos grupos estudados, além de apresentarem uma correlação positiva com o número total de células que

concorda com os relatos de MOBASHERI (1998) em cartilagem de falanges de boi e em discos intervertebrais de humanos de acordo com URBAN & MAROUDAS (1979). Dessa forma, podemos afirmar que as células do disco intervertebral são sensíveis ao ambiente iônico, assim como os condrócitos. Ainda observamos que a diminuição de Na^+ foi estatisticamente significativa, entre os grupos, apenas no núcleo pulposo, apesar de também ter diminuído nas outras regiões. Isso se deve, provavelmente, ao fato de os cátions utilizarem a placa terminal como rota principal de entrada e saída do disco, conforme estudo de URBAN & MAROUDAS (1979).

O transporte de nutrientes pela matriz extracelular é dependente das características dos solutos e da própria matriz, como a concentração de GAGs, íons e também da rede de colágeno que, em conjunto com os GAGs, auxiliam na manutenção da hidratação da matriz (ROUGHLEY, 2004). A relação GAGs/colágeno é um parâmetro que está alterado na degeneração do disco intervertebral (CHAN *et al.*, 2011). Existe AH entre as lamelas de colágeno na região do ânulo fibroso que, apesar de ser mais abundante no núcleo, nesta localização é possível que tenha relação na plasticidade do tecido (INKINEN *et al.*, 1999). Dessa forma, o colágeno apresenta influência direta na manutenção da matriz do disco intervertebral.

A análise de colágeno pela técnica de picro-sirius evidencia as fibras colágenas pela sua birrefringência. As fibras colágenas delgadas ($< 0,8 \mu\text{m}$) aparecem em tons esverdeados na luz polarizada e as fibras espessas (1,6 a $2,4 \mu\text{m}$) apresentam coloração avermelhada (DAYAN *et al.*, 1989). Segundo JUNQUEIRA, MONTES, SANCHEZ (1982), a espessura dos cortes histológicos influencia a birrefringência e, por isso, recomendam utilizar entre 5-7 μm , que foi a espessura utilizada em nosso estudo (5 μm). Afirmam, ainda, que fibras colágenas tipo I têm birrefringência mais

avermelhada devido à sua compactação, enquanto as fibras colágenas tipo II poderiam aparecer de diversas tonalidades, dependendo de sua interação com a matriz, pois são fibras soltas e pouco organizadas (JUNQUEIRA, MONTES, SANCHEZ, 1982). No entanto, DAYAN *et al.* (1989) demonstraram que tanto o colágeno tipo I quanto o colágeno tipo II podem apresentar birrefringência esverdeada ou avermelhada dependendo da sua espessura e organização. Em nosso estudo notamos uma grande quantidade de fibras com birrefringência avermelhada (espessas) em todas as regiões do disco intervertebral do grupo 1, indicando que, nesse grupo, as fibras colágenas encontram-se bem organizadas e espessas. No grupo 2 foram encontradas grandes quantidades de fibras com birrefringência esverdeada, em todas as regiões, demonstrando a maior presença de fibras delgadas. Não realizamos testes que identifiquem que tipo de fibras são essas, podendo ser pró-colágenos em síntese ou produtos da degradação do colágeno tipo II, que sabidamente aumentam em pessoas acima de 60 anos (ANTONIOU *et al.*, 1996). Todavia, acreditamos assim como ROUGHLEY (2004), que independentemente do tipo de fibra presente (pró-colágeno ou colágeno em degradação), essa alteração representa a limitação dessa matriz de repor o colágeno degradado ao longo dos anos, podendo ser classificado como fase III (degeneração e fibrose) de remodelação da matriz, como sugerido por ANTONIOU *et al.* (1996) que corresponde a diminuição da síntese de agregam e pró-colágeno tipo II e por um aumento na degradação do colágeno tipo II, o que justificaria a presença de fibras colágenas delgadas (esverdeadas) em maior quantidade no grupo 2.

As fibras colágenas também estão associadas ao AH, que está localizado entre as lamelas do ânulo fibroso (INKINEN *et al.*, 1999) e também com os GAGs (CHAN *et al.*, 2011). Nossos resultados corroboram

com esses autores, uma vez que observamos relação direta entre a diminuição de GAGs e AH com a mudança da birrefringência das fibras colágenas e aumento da idade. Dessa forma, acreditamos que a birrefringência esverdeada encontrada no grupo 2 se deve à degradação do colágeno em virtude da diminuição de parâmetros bioquímicos.

Lombalgia é umas das principais causas de atendimento médico, afetando populações em todo o mundo, chegando a prevalência de até 80% em países desenvolvidos (BORENSTEIN, 2000; BENNEKER *et al.*, 2005a; CHAN *et al.*, 2011). A degeneração do disco intervertebral tem sido um dos fatores anatômicos mais responsabilizados pela origem da dor lombar (ROBERTS, MENAGE, URBAN, 1989; BENNEKER *et al.*, 2005a; CHAN *et al.*, 2011), justificando estudos que busquem correlacionar inervação do disco com a degeneração.

Dessa forma, analisamos a presença de nervos e vasos por imunohistoquímica dos discos intervertebrais de humanos. WILLENEGGER *et al.*, (2005), estudando inervação de disco intervertebral de cães, observaram a presença de nervos na região mais periférica dos discos intervertebrais. Outros pesquisadores identificaram a presença de receptores de terminações nervosas e vasos nas regiões mais externas do ânulo fibroso de humanos com disco degenerado (ROBERTS *et al.*, 1995; OLIVEIRA, 2001; BENNEKER *et al.*, 2005b; OLIVEIRA, 2005; RODRIGUEZ, *et al.*, 2011). Em nosso estudo, observamos a presença de nervos especificamente na região mais externa do ânulo fibroso posterior do grupo 2, enquanto a presença de vasos foi observada na região do ânulo fibroso posterior de ambos os grupos, porém, de forma mais expressiva no grupo 2.

Diante dos resultados obtidos ressaltamos a importância da vascularização da região inferior dos discos intervertebrais como local

principal de aporte sanguíneo para a nutrição do tecido e consequente manutenção da função do disco como estrutura de suporte de carga e mobilidade da unidade funcional. Esses resultados implicam diretamente nas opções de novas terapias celulares intradiscais objetivando o reparo do disco, devendo esses tratamentos serem direcionados à região de maior vascularização.

O presente estudo apresentou como limitações mais importantes a ausência de um grupo-controle com coluna imatura, uma análise por idade independente do grau de degeneração e a falta de estudos genéticos.

Como forma de aprofundar, pretendemos investigar a relação entre as espessuras do disco intervertebral e placas terminais na distribuição de células totais e metabolicamente ativas. Além disso, avaliar o efeito clínico prospectivo de fraturas da coluna abrangendo a placa terminal inferior ou superior na degeneração do disco e, também, avaliar o disco intervertebral de indivíduos abaixo de 14 anos.

O presente estudo diferencia-se de outros, pois contempla discos intervertebrais de humanos, provenientes de cadáveres sem história de trauma, que pudesse interferir na bioquímica e celularidade do disco intervertebral. Ademais, realiza análise por regiões distintas do disco, correlacionando o comportamento da matriz extracelular, vascularidade e inervação com o processo de degeneração desse tecido.

CONCLUSÃO

Conclusão

A placa terminal inferior é a principal região de aporte de vasos sanguíneos para a nutrição do disco intervertebral e tem relação direta no número de células metabolicamente ativas.

REFERÊNCIAS

Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006 Aug 15;31(18):2151-61.

Andrade GP, Lima MA, de Souza Junior AA, Fareed J, Hoppensteadt DA, Santos EA, *et al*. A heparin-like compound isolated from a marine crab rich in glucuronic acid 2-O-sulfate presents low anticoagulant activity. *Carbohydr Polym*. 2013 Apr 15;94(1):647-54.

Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, *et al*. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest*. 1996 Aug 15;98(4):996-1003.

Benneker LM, Heini PF, Alini M, Anderson SE, Ito K. 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005a Jan 15;30(2):167-73.

Benneker LM, Heini PF, Anderson SE, Alini M, Ito K. Correlation of radiographic and MRI parameters to morphological and biochemical assessment of intervertebral disc degeneration. *Eur Spine J*. 2005b Feb;14(1):27-35.

Borenstein DG. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. *Curr Opin Rheumatol*. 2000 Mar;12(2):143-9.

Boubriak OA, Watson N, Sivan SS, Stubbens N, Urban JP. Factors regulating viable cell density in the intervertebral disc: blood supply in relation to disc height. *J Anat.* 2013 Mar;222(3):341-8.

Chan WC, Sze KL, Samartzis D, Leung VY, Chan D. Structure and biology of the intervertebral disk in health and disease. *Orthop Clin North Am.* 2011 Oct;42(4):447-64.

Cole TC, Burkhardt D, Frost L, Ghosh P. The proteoglycans of the canine intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Apr 17;839(2):127-38.

Crock HV, Yoshizawa H. The blood supply of the lumbar vertebral column. *Clin Orthop Relat Res.* 1976 Mar-Apr;(115):6-21.

Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry.* 1989;93(1):27-9.

Dietrich CP, Dietrich SM. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem.* 1976 Feb;70(2):645-7.

Elmorsy S, Funakoshi T, Sasazawa F, Todoh M, Tadano S, Iwasaki N. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014 Jan;22(1):121-7.

- Gruber HE, Hanley EN Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1998 Apr 1;23(7):751-7.
- Grunhagen T, Wilde G, Soukane DM, Shirazi-Adl SA, Urban JP. Nutrient supply and intervertebral disc metabolism. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88 Suppl 2:30-5.
- Hardingham TE, Adams P. A method for the determination of hyaluronate in the presence of other glycosaminoglycans and its application to human intervertebral disc. *Biochem J*. 1976 Oct 1;159(1):143-7.
- Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, Hyon S, Toribatake Y, Tomita K, *et al*. The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999 Aug 1;24(15):1507-15.
- Inkinen RI, Lammi MJ, Agren U, Tammi R, Puustjärvi K, Tammi MI. Hyaluronan distribution in the human and canine intervertebral disc and cartilage endplate. *Histochem J*. 1999 Sep;31(9):579-87.
- Jeong CG, Francisco AT, Niu Z, Mancino RL, Craig SL, Setton LA. Screening of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) composite hydrogels to support intervertebral disc cell biosynthesis using artificial neural network analysis. *Acta Biomater*. 2014 Aug;10(8):3421-30.
- Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*. 1982;74(1):153-6.

Kikuchi T, Yamada H, Shimmei M. Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1996 Jun;4(2):99-110.

Kraemer J, Kolditz D, Gowin R. Water and electrolyte content of human intervertebral discs under variable load. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1985 Jan-Feb;10(1):69-71.

Liebscher T, Haefeli M, Wuertz K, Nerlich AG, Boos N. Age-related variation in cell density of human lumbar intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Jan 15;36(2):153-9.

Lotz JC, Chin JR. Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000 Jun 15;25(12):1477-83.

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 Sep;120(Pt 1):113-30.

Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem*. 2003 Aug 1;319(1):65-72.

McGowan KB, Kurtis MS, Lottman LM, Watson D, Sah RL. Biochemical quantification of DNA in human articular and septal cartilage using

PicoGreen and Hoechst 33258. Osteoarthritis Cartilage. 2002 Jul;10(7):580-7.

Mobasheri A. Correlation between [Na⁺], [glycosaminoglycan] and Na⁺/K⁺ pump density in the extracellular matrix of bovine articular cartilage. *Physiol Res*. 1998;47(1):47-52.

Mourão PA, Rozenfeld S, Laredo J, Dietrich CP. The distribution of chondroitin sulfates in articular and growth cartilages of human bones. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Mar 25;428(1):19-26.

Olczyk K. Age-related changes in proteoglycans of human intervertebral discs. *Z Rheumatol*. 1994 Jan-Feb;53(1):19-25.

Oliveira VM. Estudo comparativo dos mecanorreceptores dos discos intervertebrais normais e dos degenerados da coluna vertebral lombar de humanos pela radiografia, ressonância magnética e estudo anatomopatológico. [Tese]. [São Paulo]. Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina; 2005.

Oliveira VM. Estudo das terminações nervosas dos discos intervertebrais da coluna lombar de humanos. [dissertação]. [São Paulo]: Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina; 2001.

Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001 Sep 1;26(17):1873-8.

Quero L, Klawitter M, Schmaus A, Rothley M, Sleeman J, Tiaden AN, *et al.* Hyaluronic acid fragments enhance the inflammatory and catabolic response in human intervertebral disc cells through modulation of toll-like receptor 2 signalling pathways. *Arthritis Res Ther.* 2013 Aug 22;15(4):R94.

Roberts S, Eisenstein SM, Menage J, Evans EH, Ashton IK. Mechanoreceptors in intervertebral discs. Morphology, distribution, and neuropeptides. *Spine (Phila Pa 1976).* 1995 Dec 15;20(24):2645-51.

Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am.* 2006 Apr;88 Suppl 2:10-4.

Roberts S, Menage J, Urban JP. Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 1989 Feb;14(2):166-74.

Roberts S, Urban JP, Evans H, Eisenstein SM. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. *Spine (Phila Pa 1976).* 1996 Feb 15;21(4):415-20.

Rodriguez AG, Slichter CK, Acosta FL, Rodriguez-Soto AE, Burghardt AJ, Majumdar S, *et al.* Human disc nucleus properties and vertebral endplate permeability. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011 Apr 1;36(7):512-20.

- Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004 Dec 1;29(23):2691-9.
- 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 Jan 1;34(1):10-6.
- Sivan SS, Hayes AJ, Wachtel E, Caterson B, Merkher Y, Maroudas A, *et al*. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur Spine J*. 2014 Jun;23(Supplement 3):344-353.
- Urban MR, Fermor B, Lee RB, Urban JP. Measurement of DNA in intervertebral disc and other autofluorescent cartilages using the dye hoechst 33258. *Anal Biochem*. 1998 Aug 15;262(1):85-8.
- Urban JPG, Maroudas A. The measurement of fixed charged density in the intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta*. 1979 Aug 22;586(1):166-178.
- Wang D, Vo NV, Sowa GA, Hartman RA, Ngo K, Choe SR, *et al*. Bupivacaine decreases cell viability and matrix protein synthesis in an intervertebral disc organ model system. *Spine J*. 2011 Feb;11(2):139-46.
- Willenegger S, Friess AE, Lang J, Stoffel MH. Immunohistochemical demonstration of lumbar intervertebral disc innervation in the dog. *Anat Histol Embryol*. 2005 Apr;34(2):123-8.

Williams JM, Viridi AS, Pylawka TK, Edwards RB 3rd, Markel MD, Cole BJ. Prolonged-fresh preservation of intact whole canine femoral condyles for the potential use as osteochondral allografts. *J Orthop Res.* 2005 Jul;23(4):831-7.

NORMAS ADOTADAS

DeCS Descritores em Ciências da Saúde [Internet]. São Paulo: BIREME. Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira, LM. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora; 2008.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [Internet]. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org/>

International Committee of Weights and Measures. The international system of units [Internet]. Disponível no endereço eletrônico: http://www.bipm.org/utis/common/pdf/si_brochure_8.pdf

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: The intervertebral disc is avascular and remains unknown if it has the capacity to maintain viable cells inside over the years. The vascularization of the endplate has a direct influence on the nutrition to the disc cells. **Objective:** To analyse the vascularization of the end plate and its relation to the density of viable cells in lumbar intervertebral discs of young and old adult humans. **Methods:** Twenty-eight lumbar intervertebral discs were used and separated in two groups: Group 1 (n = 15; less than 50-year-old; Pfirrmann \leq 3) and Group 2 (n = 13; greater or equal to 80-year-old, Pfirrmann \geq 4). Vascularization of the endplates was analysed using Stereo Microscope Discover[®] V.8. Cell viability was assessed by MTT method. The cell density was measured by PicoGreen[®] technique using amount of DNA as an estimate of total cell number. **Results:** The viable cells remained steady in relation to the total cell density. The inferior endplate presented the biggest number of holes (p < 0.05). The greater number of cells was found in the annulus fibrosus (p < 0.05). There was a positive correlation (p < 0.05) between the density of viable cells and vascular openings in the inferior endplate. **Conclusion:** The inferior endplate has the main supply of blood vessels to nourish the intervertebral disc and has direct bearing on the number of viable cells.

APÊNDICES

Projeto-piloto

Hyaluronic acid, collagen and ionic distribution: A relation study with annulus fibrosus cells (fibroblast-like cells)

Abstract

Intervertebral discs have been associated with lower back pain, and many therapies have been proposed for its treatment. Precise methods to quantify disc components are mandatory for any type of proposed therapy. The aim of this study was to correlate GAG amounts with the quantitation of cellular ions and collagen fibre distributions in different intervertebral disc sections. In total, 14 intervertebral discs were used from cattle. All of the discs were dehydrated, separated in 7 sections and digested in sodium-free papain buffer. GAG measurements were performed in the samples according to DMMB and agarose electrophoresis methods; total cells were measured using the PicoGreen® technique, ions were quantified, and collagen fibre birefringence was analysed with polarised light. Significant differences were observed between electrophoresis and DMMB ($p < 0.01$); GAGs were up to 6 times higher when using electrophoresis in annulus (mean/SD=3.82/1.96) and were almost 2 times higher in the nucleus (mean/SD=1.63/0.21). The correlation between HA and GAG ($p < 0.001$),

cell number, sodium ($p=0.007$) and hyaluronate ($p=0.034$) were significant. Thin collagen fibres were largest in the nucleus ($p<0.001$). Fibroblast-like cells were negatively correlated with hyaluronate and sodium concentrations. Collagen thin fibres (collagen II) were more related to hyaluronate

Keywords: intervertebral disc; glycosaminoglycans; hyaluronic acid, collagen, analytical chemistry methods; fluorescent dyes

Introduction

The correlation between disc degeneration and back pain is still to be determined; however, studies trend to analyse potential therapies, including gene applications and molecular biology,¹⁻³ to address this complex public health problem.³ Determining the most exact disc compounds and the relationship among them is crucial to these technologies or to any who intends to treat disc degeneration.

Proteoglycans are a major biochemical constituent of the disc extracellular matrix, and aggrecan is the main representative.⁴ The proteoglycan core is linked to glycosaminoglycans (GAGs), which are linear polysaccharides of repeating disaccharide units that can be sulphated, such as chondroitin sulphate (CS), dermatan sulphate (DS), keratan sulphate (KS), and heparan sulphate (HS), or that are not sulphated, such as

hyaluronate (HA).⁴ Previous studies have demonstrated that the most important sulphated GAGs present in intervertebral discs are CS and KS.^{5,6} HA, the only GAG that is non-covalently bound to the protein core, is at a much higher concentration in the intervertebral disc than any other musculoskeletal tissue.⁷ The presence of specific GAGs can be related to other cellular features, which may be associated with degeneration and back pain.^{8,9}

In light of this knowledge, this study aims to correlate GAG amounts with total cell number, ion and collagen distribution in different intervertebral disc sections. Cattle have been used as a model, which are good for intervertebral disc studies because of their similarity to human in size, tissue composition and cell types,^{10,11} as sources of healthy human discs are scarce.

Methods

Samples

Fourteen bovine discs from 14 tails of 24-30-month-old cattle were obtained from an abattoir within one hour of death and kept frozen for up to 24 h until all of the discs were dissected. Each disc was separated, and a central 5 mm section was cut with a sharp scalpel for analysis. Samples were separated into seven sections numbered 1-7 from anterior to posterior.

Sections were dried to constant weight at 100 °C. Sections were digested at 65 °C overnight in 1% papain (Calbiochem, Darmstadt, Germany) in sodium-free papain buffer.¹² The digestion was centrifuged at 4400 rpm for 15 min, and the supernatant was separated into a new sterile tube. All of the experiments were approved by the Animal Care Ethics Committee of the Federal University of São Paulo (CEP n° 0143/11) and were conducted in accordance with the Brazilian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Federal law 11794/2008), which is equivalent to the National Institutes of Health (NIH) guidelines.

Glycosaminoglycan's purification and extraction

The GAGs present in the supernatant were precipitated with five volumes of methanol (-20 °C overnight, 18 h). After centrifugation at 4400 rpm for 15 min, the supernatant was discarded, and the precipitate was dried at room temperature for 24 h to evaporate the methanol residue and was then suspended in 1 ml water. To release GAG chains from the remaining core protein peptides, a chemical β -elimination was performed by 0.05 M sodium borohydride, 0.05 M NaOH treatment for 18 h at room temperature. Samples were neutralised with 10% acetic acid, dialysed against distilled water through a membrane for 4 h at 4 °C, lyophilised and then suspended in distilled water (5 mg of dry tissue to 10 ml). Five microliters sample and a 5 μ l aqueous mixture of 1 mg/ml standard GAGs

(chondroitin-4-sulphate from whale cartilage, chondroitin-6-sulphate from shark cartilage, DS from bovine intestinal mucosa (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan), HS from bovine lung (extracted and purified by the Molecular Biology Division, Department of Biochemistry, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil)) were separated by 0.6% agarose gel slide (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), 0.2 cm thick in 50 mM 1.3-diaminopropane-acetate (PDA) buffer, pH 9.0, that was exposed to a potential of 5 V/cm for 1 h according to the Dietrich and Dietrich method.¹³ The compounds were fixed in the gel with 0.1% Cetavlon (N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide) for 2 h. The gel was dried in a hot air stream and stained with 0.1% toluidine blue in 1% acetic acid solution and washed with 1% acetic acid to remove excess dye. In this electrophoresis, the departing line was set at the negative pole because GAGs are negatively charged and transfer to the positive pole. Band intensities were quantified by densitometry at 525 nm with a 5% error margin using an Epson Expression 1680 scanner (Epson America) and Quick Scan 2000 WIN software. The detection limit was 1 µg/µl sulphated GAG. Results were expressed as µg GAG/mg dry tissue weight and as values in means with standard error. Samples were analysed in triplicate.

Enzymatic treatment

Because of the similarity of the CS and DS chemical structures, the identities of GAGs present in the samples were confirmed by treatment with specific enzymes. Aliquots of purified sulphated GAGs from 5 samples per fragment were pooled and treated with 10 μl chondroitin ABC lyase from *Proteus vulgaris* (Seikagaku America) per 100 μg GAGs and incubated in 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Tris-acetate 0.02 M buffer solution, pH 7.3, for 18 h at 37 °C and with 10 μl chondroitinase AC (Sigma) per 100 μg GAGs and incubated in 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, at 37 °C for 18 h. Samples CS, DS, and HS were separated by 0.6% agarose gel electrophoresis in 50 mM 1.3-diaminopropane-acetate buffer, pH 9.0, as previously described. The influence of the enzyme was confirmed by the disappearance of CS and/or DS in the agarose gel after chondroitinase AC/ABC treatment.

Hyaluronate (HA) Quantitation

HA determination was performed using a highly specific enzyme-linked immunosorbent assay ELISA-like fluorimetric method employing a biotinylated HA-binding protein and europium-labelled streptavidin.¹⁴ The samples obtained as described above were boiled for 30 min to inactivate any proteolytic activity. They were then dried and suspended in distilled water (5 mg dry tissue to 10 ml). An aliquot of each sample (5 μl) was

diluted 1:1.000 with 0.05 M Tris-HCl, pH 7.8, and triplicate 100 µl samples of this dilution were analysed for HA content. The absolute HA amounts were expressed as micrograms HA per gram dry tissue. The values were expressed as means with lower and upper limits of standard error.

GAG Quantitation by DMMB

GAG content was quantified using a dimethylmethylene blue (DMMB) dye binding colorimetric assay¹⁵ with the disc digestion supernatant in triplicate. The supernatant was diluted 1:200, and then, 40 µl solution was added to 250 µl DMMB. A wavelength reading was measured using a spectrophotometer at 530 nm and 595 nm. The GAG content was calculated based on a standard curve using chondroitin sulphate C from bovine trachea. The results were normalised by dry weight.

Quantitation of Total Cell Number

Aliquots of 100 µl supernatant were mixed with 100 µl 1x TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) from 20x TE stock (supplied in the PicoGreen[®] kit, Molecular Probes, Invitrogen) diluted in DNase-free water and mixed with 100 µl PicoGreen[®] (1:200 dilution in 1x TE buffer) reagent in a tube that was protected from light for 5 minutes before reading the plate according to the manufacturer's instructions.¹⁶ Fluorescence was measured in a dark 96-well plate in a spectrofluorometer plate reader (FlexStation 3, Molecular Devices) (emission 520 nm, excitation 480 nm,

cutoff 515 nm), and DNA content was calculated using a standard curve calibrated using the double-stranded DNA that was provided with the kit. Results were expressed as an estimate of the cell number assuming DNA per chondrocyte to be 7.7 pg/cell.¹⁷

Sodium and Potassium Ion Quantitation

Supernatants (1 ml aliquots) were analysed in an Olympus AU640e Chemistry Immuno Analyzer (Olympus America Inc.) after calibration with de sodium-free papain buffer.

Collagen

Paraffin-embedded sections (5 µm) including anterior annulus fibrosus, nucleus pulposus and posterior annulus fibrosus were submitted to routine histopathological procedures and stained with a modified picosirius red protocol.¹⁸ After deparaffinisation and hydration in distilled water, sections were immersed in a 0.2% phosphomolybdic acid solution for 10 min, washed in distilled water, and incubated in 0.1% Sirius Red diluted in saturated picric acid solution for 1 h at room temperature. Sections were rinsed with distilled water, differentiated for a few seconds in 1% HCl in 70% alcohol, alkalised by a 10-min rinse with tap water, dehydrated and mounted with Entellan[®]. The sections were examined by polarisation microscopy with an AxioScope A1 microscope (Carl Zeiss). Images were captured with a 5x objective lens against a black background

and evaluated with ImageJ[®] after split imaging in channels (red-green-blue), and the images were analysed using the “measure” option (HIH public domain software; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Results were put in order of the relationship between reddish/greenish fibres.

Statistical analysis

Variables were tested for their distribution using the D’Agostino & Pearson test. The data were compared using Student’s t-test for two or ANOVA for three or more variables, and Pearson correlation analysis was performed between the variables. All of the statistical tests were considered to be significant at the level of 5%.

RESULTS

Quantitation of GAGs

To identify the GAGs present in bovine intervertebral discs, the GAGs were extracted and submitted to agarose gel electrophoresis. A representative sample agarose gel electrophoresis is demonstrated in Figure 1A. The presence of a migratory band in the same region of CS and DS can be observed in different intervertebral disc sections. Interestingly, CS is present at higher concentrations in central disc regions than in the disc boundaries (annulus fibrosus) (Fig. 1). Conversely, a small band at the level of DS was also observed mainly in disc boundaries (Fig. 1A). Then, a

pool of different disc region samples (Regions 1, 4 and 7) was submitted to enzymatic digestion to corroborate the presence of CS (Fig. 1B-D). The use of enzymes ABC and AC demonstrated that CS is the main sulphated GAG in all disc regions; however, a small band remained visible even with AC lyase at the level representing DS mainly in the disc boundaries (Fig. 1B-D).

After identifying the presence of GAGs, total GAG quantitation was performed in several disc regions by DMMB, and CS was quantified by agarose gel electrophoresis. Both techniques demonstrated similar GAG distribution patterns (Fig. 2). However, differences were observed between the two assays ($p < 0.001$). There was a noted difference in the total GAG amount measured primarily in the annulus (regions 1, 2, 6 and 7) that varied between 2- to 6-fold (3.82 ± 1.96), while in the nucleus pulposus, it varied only 1- to 1.5-fold (1.63 ± 0.21).

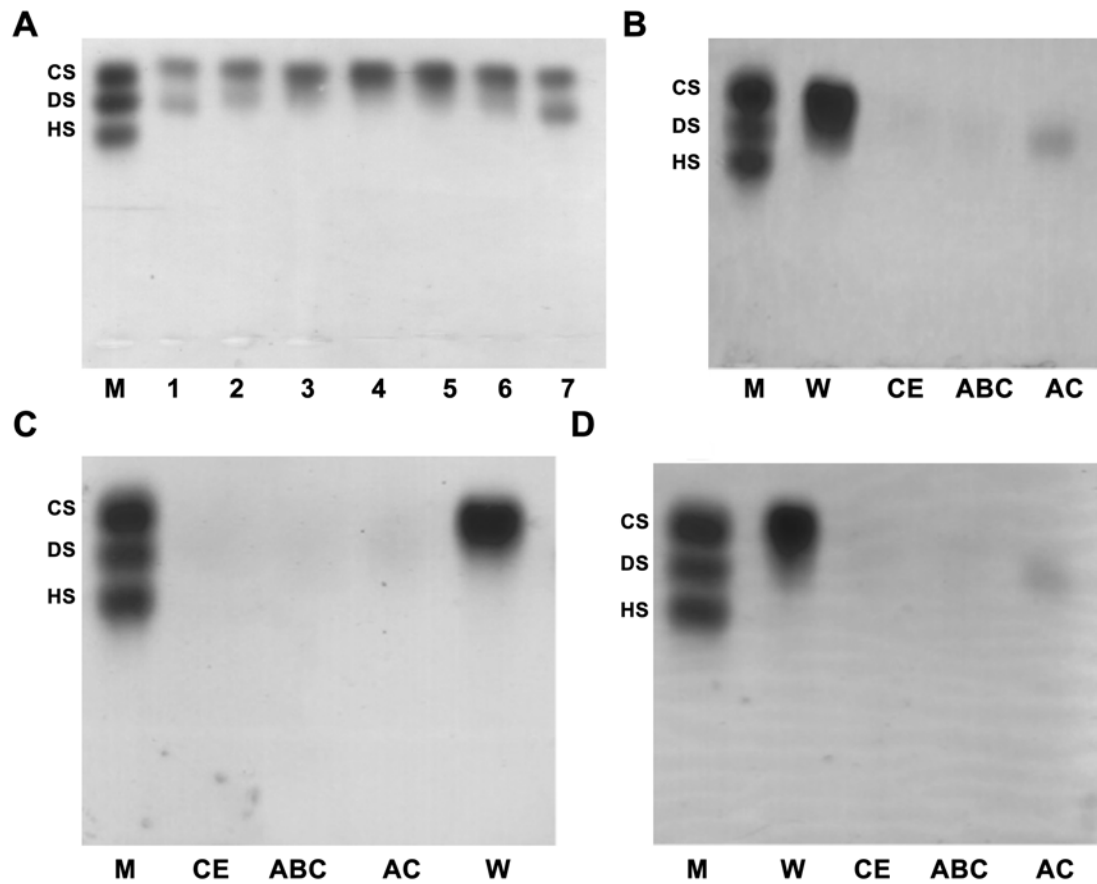


Figure 1: Characterisation of glycosaminoglycans in the bovine intervertebral disc by agarose gel electrophoresis. (A) Sample of one disc separated into 7 regions from anterior to posterior; (B) pool of 5 discs from region 1 with enzymatic digestion; (C) pool of 5 discs from region 4 with enzymatic digestion; (D) pool of 5 discs from region 7 with enzymatic digestion. (CS) chondroitin sulphate; (DS) dermatan sulphate; (HS) heparan sulphate; (M) mixture of 1 mg/mL standard GAGs; (W) sample diluted in water; (ABC) sample and chondroitinase ABC; (AC) sample and chondroitinase AC; (CE) sample and crude enzyme extract. The observed DS migratory band remained mainly in regions 1 (B) and 7 (D).

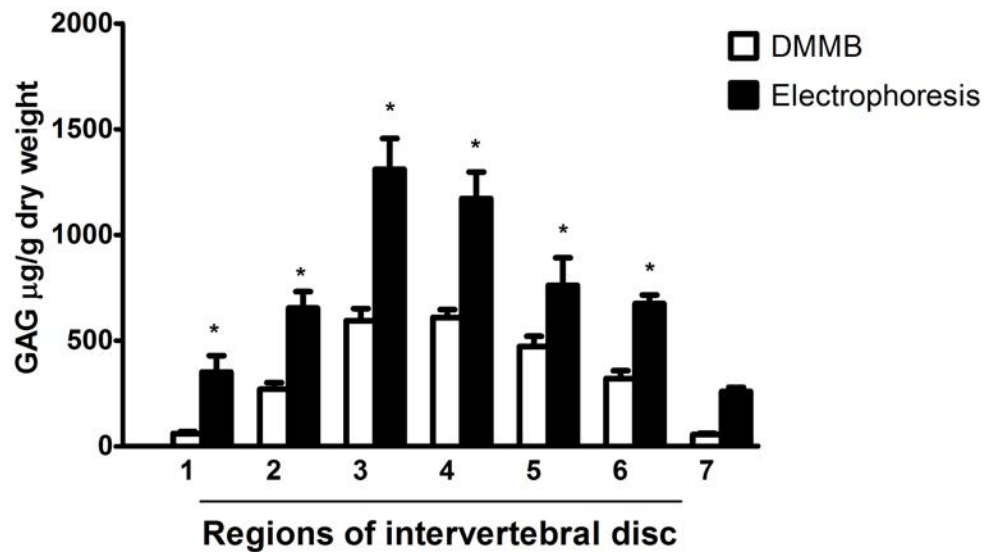


Figure 2: Differences in GAG concentration obtained by two methods in different bovine intervertebral disc regions. Samples were collected from 14 different tails of 24-30-month cattle. The samples were evaluated by DMMB, and agarose gel electrophoresis was stained with toluidine blue. The data are expressed as the mean \pm SEM of experiments performed in triplicate. (*) $p < 0.001$. It was observed that DMMB counted less GAG in all regions.

The non-sulphated GAG HA was also quantified in intervertebral disc sections. HA quantitation revealed a high amount in the central disc region (563.64 mg/g) following the CS pattern (Fig. 3).

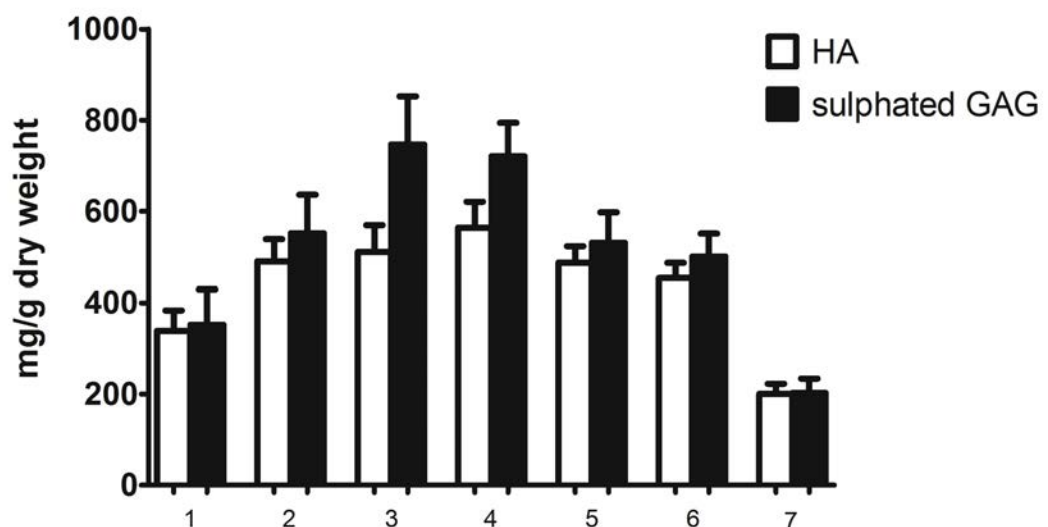


Figure 3: Comparison of sulphated GAG and HA in different bovine intervertebral disc regions. Samples were collected from 14 different tails of 24-30-month cattle. Samples were quantified by densitometry after agarose gel electrophoresis and stained with toluidine blue to quantify glycosaminoglycan (GAG) content and by a specific enzyme-linked immunosorbent assay ELISA-like to quantify hyaluronate (HA). The data are expressed as the mean \pm SEM of experiments performed in triplicate. (*) $p < 0.001$. The same pattern of distribution was observed for GAG and HA.

Determination of Other Characteristics in Different Intervertebral Disc Sections

Mineral extracellular matrix and GAGs mainly compose bone tissue; however, cellular components are necessary to produce this matrix. DNA was measured to quantify cellular presence because there is a linear relationship between cell number and DNA.¹⁷ Cell number in different intervertebral disc sections is demonstrated in Figure 4.

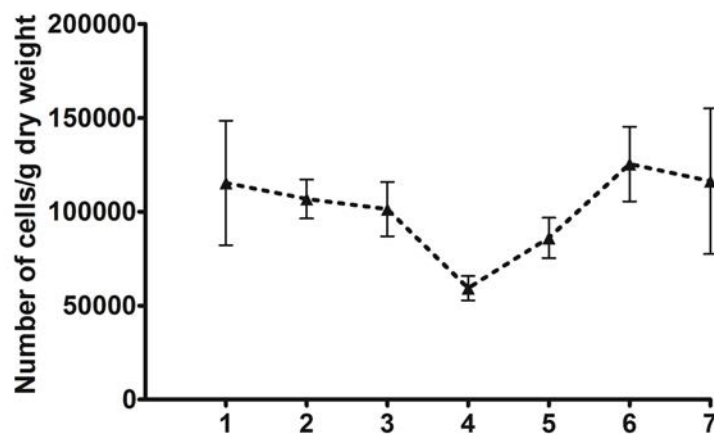


Figure 4: Distribution of cells according to the dry weight in different bovine intervertebral disc regions

Contrary to CS, more cells were present in disc boundaries. The analysis represented in Figure 5 demonstrates the cellular distribution pattern among different disc sections normalised to GAG content (Fig. 5).

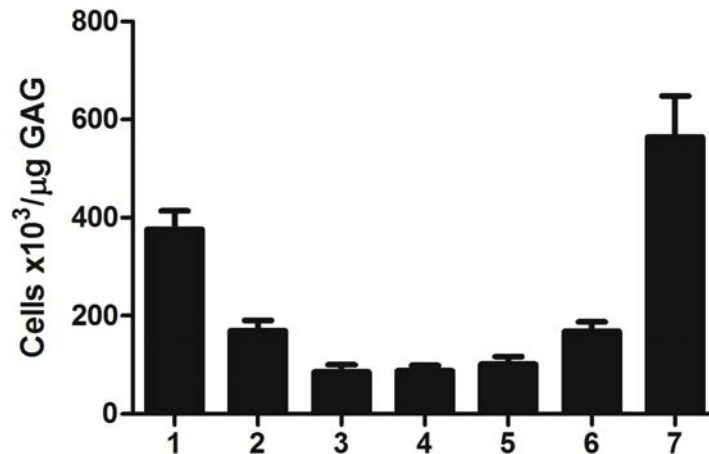


Figure 5: Number of cells in different bovine intervertebral disc regions according to GAG content. Samples were collected from 14 different tails of 24-30-month cattle. The data are expressed as the mean \pm SEM of experiments performed in triplicate. $p < 0.001$.

Cations Na^+ and K^+ are essential ions that maintain the difference in the intracellular and extracellular medium and promote cellular membrane potential.¹⁹ Moreover, ion Na^+ , which is present at approximately 140 mM in the extracellular medium, is the main ion that is responsible for osmotic effects.²⁰ Thus, quantitation of these ions is important to correlate with GAG components and cell number. Quantitation of these ions revealed that both were more present in central regions ($\text{Na}^+ = 15 \text{ mEq/l}$; $\text{K}^+ = 0.88 \text{ mEq/l}$) of intervertebral discs and lower concentrations were present in disc

boundaries ($\text{Na}^+ = 8.75 \text{ mEq/l}$; $\text{K}^+ = 0.69 \text{ mEq/l}$), similar to CS and HA (Fig. 6).

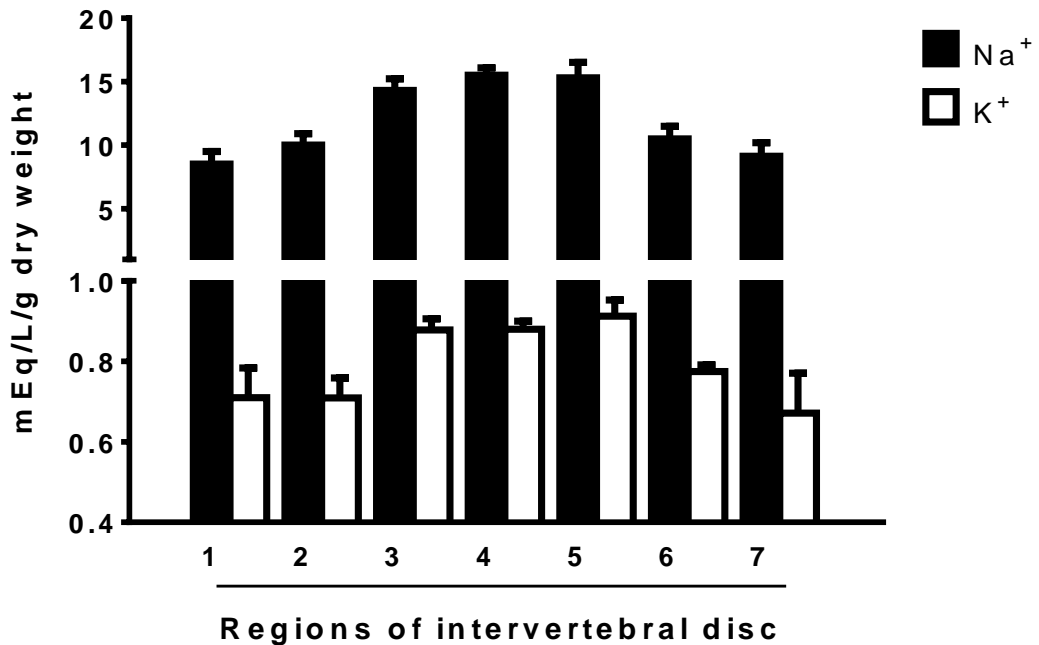


Figure 6: Quantitation of Na^+ and K^+ ions in different bovine intervertebral disc regions. Samples were collected from 14 different tails of 24-30-month cattle. The data are expressed as the mean \pm SEM of experiments performed in triplicate. $p < 0.001$.

Collagen Fibre Histology

The collagen fibre birefringence intensity could be evaluated using Picrosirius red staining, where thick fibres ($1.6 - 2.4 \mu\text{m}$) displayed orange to reddish-orange polarisation colours, while thin fibres ($0.8 \mu\text{m}$ or less) displayed green to yellowish-green.¹⁸ Based on these results, we observed mainly thick fibres in the disc boundaries (annulus fibrosus) ($p < 0.001$) with a high-pitched distinction in the transition to the nucleus (Fig. 7).

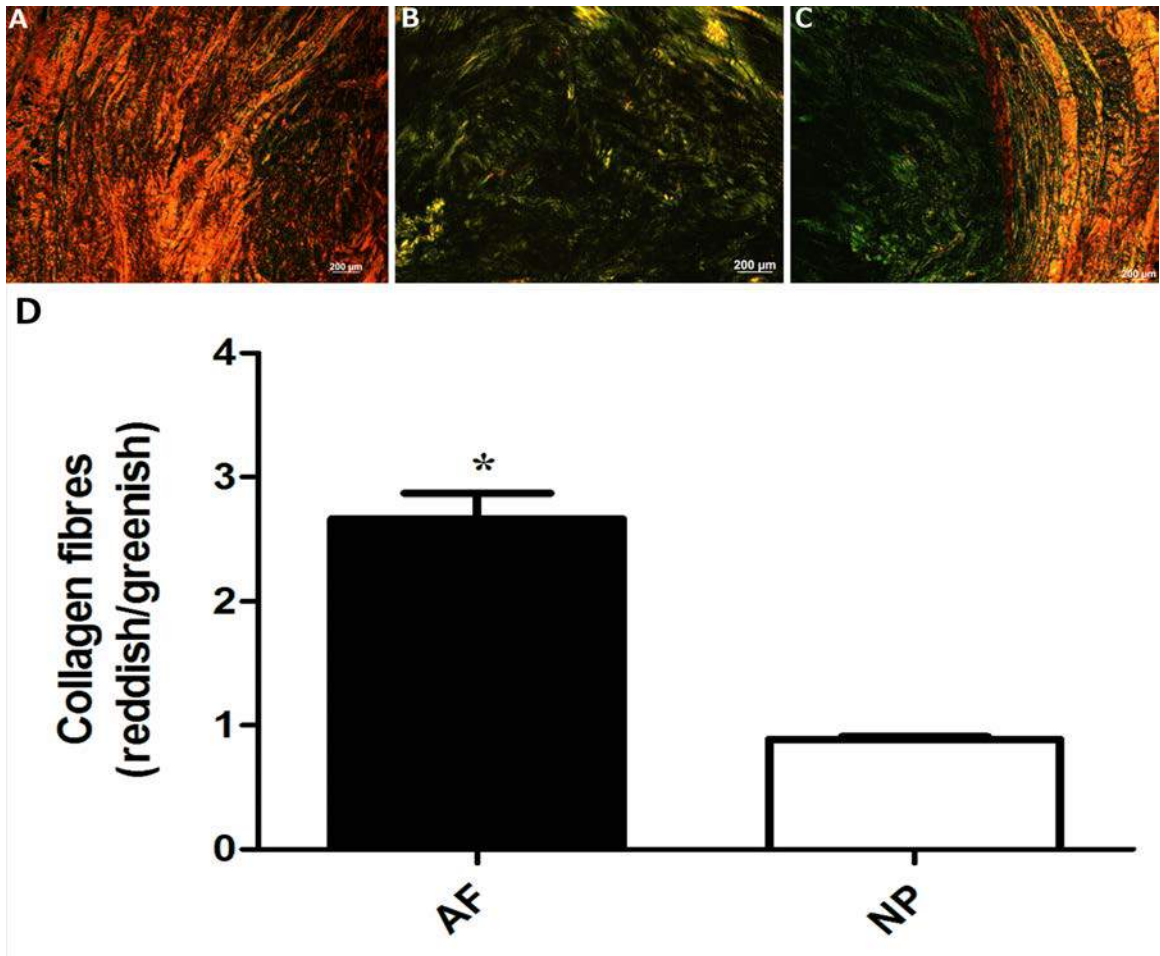


Figure 7: (A, B, C) Histological analysis of the bovine intervertebral disc stained using picrosirius red and visualised by polarised light microscopy. Higher greenish birefringence intensity (type II collagen) (B) was observed in the nucleus, and higher reddish birefringence intensity (Type I collagen) (A) was observed in the annulus. In (C), note the sharp transition in the birefringence intensity between annulus and nucleus pulposus. In (D), note the relationship between reddish/greenish collagen fibres. Quantitation was performed after split imaging in channels (red-green-blue) and analysed using ImageJ software (*) $p < 0.001$

Correlation among Intervertebral Disc Components

Numerical correlation among intervertebral disc sections is demonstrated in Table 1. A positive correlation was observed between CS and HA and K^+ . Conversely, a negative correlation between HA and Na^+

was observed with cell number, suggesting that the cells were more sensible to isolated changes in Na⁺ and HA than in K⁺ or CS levels.

Table 1: Correlations among the variables in bovine intervertebral discs

Correlation		GAG	Cell Number	HA	Na ⁺
Cell Number	r	-0.185			
	p	0.193			
HA	r	0.419	-0.304		
	p	0.003	0.034		
Na ⁺	r	0.135	-0.423	0.201	
	p	0.203	0.007	0.075	
K ⁺	r	0.304	-0.266	0.145	0.716
	p	0.030	0.082	0.162	<0.001

Discussion

Disc structure and composition is well known. CS is the main GAG in the disc, and its concentration is higher in the nucleus than in the annulus.¹⁰ DS is also present; however, it was in a very low concentration compared with other cartilaginous tissues.⁶ Depending on the technique used, different results might be more specific to certain components that deserve special attention.

In our study, we demonstrated that the agarose gel electrophoresis method¹³ is capable of detecting up to 6 times the amount of GAGs found

by DMMB¹⁵ in the bovine intervertebral discs. This difference can occur due to several causes because DMMB cannot detect specific GAGs, as it depends on the negative charge of the components and not all CS are charged. To identify different GAGs using the DMMB method, an enzymatic treatment is mandatory; thus, this assay is more expensive than electrophoresis, which is capable of discriminating GAGs based on how they run compared with a control.

Hyaluronate that was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA-like fluorimetric method¹⁴ presented a bulky concentration because intervertebral discs have the highest amounts of this GAG compared with any other musculoskeletal tissue, corroborating the literature.^{7,21} However, the difference between both nuclear HA and GAGs was not significant, but the annulus and the total hyaluronate levels were higher using the ELISA-like method,¹⁴ demonstrating that it is a more sensible assay.

Disc matrices must be working properly to promote good intervertebral disc function, allowing resistance to the tension-compression loads during daily activities. GAGs play an important role in upholding the physiological balance and disc homeostasis. Nevertheless, nuclear and annulus cells that have different shapes and functions from each other are important to help extracellular matrix turnover and repair disc disruptions.

However, the sparse population of these cells limits their capacity to produce sufficient tissue with characteristics to resist tensile strength. We quantified cell density in each disc region by measuring DNA fluorescence using the PicoGreen assay method that has already been used by other authors.^{16,22} These authors observed similar DNA content in all disc regions, whereas we found an even sparser population of cells in the nucleus, which was corroborated by histological and biochemical studies.^{23–25}

The importance of Na^+ and K^+ homeostasis in normal cellular function is known. The intervertebral disc is an avascular structure, the metabolism of which is dependent on the diffusion and is due to the high fixed negative charge density that attracts high concentrations of cations to the matrix, which may affect nutrition and homeostasis. The varied distribution of these ions through tissue regions and depth²⁶ is of extreme relevance to knowledge of disc function because it is already known that chondrocytes are sensitive to their ionic environment.²⁷ We also observed a positive and strong correlation between cell density and Na^+ ion as well as HA concentration in all disc regions, demonstrating that not only chondrocyte-like cells but also annulus fibrosus cells (fibroblast-like) are sensitive to these changes.

It was possible to observe a high concentration of greenish collagen fibres in the nucleus. Because reddish fibres are considered thick and are most likely collagen type I,²⁸ we agreed that the annulus is mainly composed of this type of collagen. The nucleus pulposus is rich in collagen II,⁴ and based on our results, more HA is present in the nucleus, corroborating the results of other authors^{7,21} and is also related to the greenish fibres under polarised light, suggesting more relation to thinner or type II collagen fibres.

In summary, in this report, we demonstrated a positive correlation between HA and GAG and a negative correlation between HA and cell number, suggesting that fibroblast-like cells are also sensitive to changes in HA and ionic concentrations. HA could be closely related to thin collagen fibres (collagen type II).

Acknowledgments

FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

References

1. Vadalà G, Russo F, Di Martino A, Denaro V. 2013. Intervertebral disc regeneration: from the degenerative cascade to molecular therapy and tissue engineering. [Internet]. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* [cited

- 2014 Mar 23] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512973>.
2. Evans C. 2006. Potential biologic therapies for the intervertebral disc. [Internet]. *J. Bone Joint Surg. Am.* 88 Suppl 2:95–8 Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595452>.
 3. Cassinelli EH, Hall R a, Kang JD. 2001. Biochemistry of intervertebral disc degeneration and the potential for gene therapy applications. [Internet]. *Spine J.* 1(3):205–14 Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14588349>.
 4. Sivan SS, Hayes AJ, Wachtel E, et al. 2013. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. [Internet]. *Eur. Spine J.* [cited 2014 Mar 19] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23591805>.
 5. Oegema TR. 1993. Biochemistry of the intervertebral disc. [Internet]. *Clin. Sports Med.* 12(3):419–39 [cited 2014 Mar 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8364983>.
 6. Cole TC, Burkhardt D, Frost L, Ghosh P. 1985. The proteoglycans of the canine intervertebral disc. [Internet]. *Biochim. Biophys. Acta* 839(2):127–38 Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3921057>.
 7. Hardingham TE, Adams P. 1976. A method for the determination of hyaluronate in the presence of other glycosaminoglycans and its application to human intervertebral disc. [Internet]. *Biochem. J.* 159(1):143–7 Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1164046&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 8. Fields AJ, Rodriguez D, Gary KN, et al. 2014. Influence of biochemical composition on endplate cartilage tensile properties in the human lumbar spine. [Internet]. *J. Orthop. Res.* 32(2):245–52 [cited 2014 Jun 1] Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4039641&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

9. Haneder S, Ong MML, Budjan JM, et al. 2014. (23)Na-magnetic resonance imaging of the human lumbar vertebral discs: in vivo measurements at 3.0 T in healthy volunteers and patients with low back pain. [Internet]. *Spine J.* :1–8[cited 2014 Jun 1] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472875>.
10. Oshima H, Ishihara H, Urban JP, Tsuji H. 1993. The use of coccygeal discs to study intervertebral disc metabolism. *J. Orthop. Res.* 11:332–338.
11. Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. 2008. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? [Internet]. *Eur. Spine J.* 17(1):2–19[cited 2012 Oct 31] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2365516&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
12. Urban MR, Fermor B, Lee RB, Urban JP. 1998. Measurement of DNA in intervertebral disc and other autofluorescent cartilages using the dye hoechst 33258. [Internet]. *Anal. Biochem.* 262(1):85–8[cited 2014 Mar 2] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9735153>.
13. Dietrich CP, Dietrich SM. 1976. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. [Internet]. *Anal. Biochem.* 70(2):645–7[cited 2014 Feb 27] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/131498>.
14. Martins JR., Passerotti CC, Maciel RM., et al. 2003. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients [Internet]. *Anal. Biochem.* 319(1):65–72[cited 2013 May 11] Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269703002513>.
15. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett a J. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. [Internet]. *Biochim. Biophys. Acta* 883(2):173–7 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3091074>.
16. McGowan K. 2002. Biochemical quantification of DNA in human articular and septal cartilage using PicoGreen® and Hoechst 33258 [Internet]. *Osteoarthr. Cartil.* 10(7):580–587[cited 2013 Mar 5]

Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458402907946>.

17. Kim YJ, Sah RL, Doong JY, Grodzinsky AJ. 1988. Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. [Internet]. *Anal. Biochem.* 174(1):168–76[cited 2014 Feb 26] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2464289>.
18. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, et al. 1989. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? [Internet]. *Histochemistry* 93(1):27–9[cited 2014 Apr 28] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1707974>.
19. Roos A, Boron WF. 1981. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61:296–434.
20. Fuster DG, Alexander RT. 2014. Traditional and emerging roles for the SLC9 Na⁺/H⁺ exchangers. [Internet]. *Pflugers Arch.* 466(1):61–76[cited 2014 Jun 1] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24337822>.
21. Inkinen RI, Lammi MJ, Agren U, et al. 1999. Hyaluronan distribution in the human and canine intervertebral disc and cartilage endplate. [Internet]. *Histochem. J.* 31(9):579–87 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10579627>.
22. Rodriguez AG, Slichter CK, Acosta FL, et al. 2011. Human disc nucleus properties and vertebral endplate permeability. [Internet]. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 36(7):512–20[cited 2013 May 2] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062730/>.
23. Maroudas a, Stockwell R a, Nachemson a, Urban J. 1975. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. [Internet]. *J. Anat.* 120(Pt 1):113–30 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1231728&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
24. Urban JPG, Smith S, Fairbank JCT. 2004. Nutrition of the intervertebral disc. [Internet]. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 29(23):2700–9 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564919>.

25. Setton L a, Chen J. 2004. Cell mechanics and mechanobiology in the intervertebral disc. [Internet].*Spine* (Phila. Pa. 1976). 29(23):2710–23 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564920>.
26. Maroudas A. 1968. Physicochemical properties of cartilage in the light of ion exchange theory. [Internet].*Biophys. J.* 8(5):575–95[cited 2014 Mar 19] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1367401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
27. Mobasher A. 1998. Correlation between [Na⁺], [glycosaminoglycan] and Na⁺/K⁺ pump density in the extracellular matrix of bovine articular cartilage. [Internet].*Physiol. Res.* 47(1):47–52[cited 2014 Feb 27] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9708701>.
28. Montes GS, Junqueira LC. 1991. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. [Internet].*Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86 Suppl 3(Suppl III):1–11[cited 2014 Jun 6] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1726969>.

ANEXOS

Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 17-06-2009 09:05:52

Página 1/2

Id = 976

São Paulo, 06 de Março de 2009
CEP 0151/09

Ilmo(s). Sr(a).

Pesquisador(a) DELIO EULALIO MARTINS FILHO

Co-Investigadores: Valdeci Manoel de Oliveira; Carlos Fernando Pereira da Silva Herrero; Marcelo Wajchenberg; Helton Luis Aparecido Defino ; Eduardo Barros Puertas;

Disciplina/Departamento Ortopedia e Traumatologia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador Ausente

CARTA DE APROVAÇÃO E PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:

'Avaliação anatômica e histológica da placa terminal e dos discos intervertebrais da coluna lombar de humanos'

ÁREA TEMÁTICA ESPECIAL: Não há envio de documentação para análise

CARACTERÍSTICA DO ESTUDO: ESTUDO CLÍNICO OBSERVACIONAL - COM CADÁVERES

RISCO PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVOS: Realizar um estudo anatômico dos discos intervertebrais lombares de humanos de diferentes idades, avaliando os tipos celulares presentes no disco e sua quantidade, a quantidade de apoptose na placa terminal e nos núcleo pulposo e a densidade celular, se existe diferença na densidade dependendo da distância da placa terminal, presença e distribuição da vascularização e da calcificação da placa terminal e sua relação com exames de ressonância magnética e radiografias simples.

RESUMO: Serão utilizados 10 cadáveres adultos, com aproximadamente 24 horas após o óbito, sem história conhecida de doença lombar ou de cirurgia prévia na coluna. Será retirada toda a coluna lombar de L1 a L5, durante a necropsia realizada no SVO da Universidade de São Paulo. Serão realizadas imagens de ressonância magnética e radiografias no departamento de Diagnóstico por imagem da UNIFESP.

FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: Fundamentação adequada

MATERIAL E METODO: Materiais e métodos adequadamente descritos

TCLE: TCLE adequadamente apresentado

DETALHAMENTO FINANCEIRA: Sem financiamento externo

CRONOGRAMA: 18 meses

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 11/03/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o término do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 17-06-2009 09:05:52

Página 2/2

Id = 976

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. O. Medina Pestana'.

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação anatômica e histológica da placa terminal e dos discos intervertebrais da coluna lombar de humanos

Peço autorização ao representante legal do cadáver do Sr(a) _____ que se encontra no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital Universidade de São Paulo – USP, para retirar a coluna lombar a fim de se realizar o estudo “Avaliação anatômica e histológica da placa terminal e dos discos intervertebrais da coluna lombar de humanos”, tendo este estudo como objetivos principais compreender melhor a anatomia e o processo de degeneração do disco intervertebral que possa contribuir na elucidação da etiologia da dor lombar. Em qualquer etapa desse estudo, o(a) senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o médico Délio Eulálio Martins Filho, cujo local de contato é a Disciplina de Ortopedia e Traumatologia localizada à rua Borges Lagoa, 783, 5 andar – fone: 5579-9872. Se o (a) Senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, que entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisas, localizado à Rua Botucatu, 572 – 1º andar – conjunto 14 – fone 5571-1062 e fax: 5539-7162. Lembro que é garantida a liberdade de consentimento e caso não deseje autorizar a retirada da coluna lombar não haverá qualquer prejuízo à verificação da causa do óbito. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras peças anatômicas de outras pessoas, não sendo divulgada a identificação de nenhuma dessas. O (a) senhor(a) terá o direito de ser mantido (a) atualizado (a) sobre os estudos parciais ou finais da pesquisa. Lembro também que os dados e o material coletado somente poderão ser utilizados para esta pesquisa. Acredito que o(a) representante legal tenha sido suficientemente informado(a) a respeito das informações que leu ou que foram lidas para ele(ela), descrevendo o estudo “Avaliação anatômica e histológica da placa terminal e dos discos intervertebrais da coluna lombar de humanos”. Eu discuti com o médico Délio Eulálio Martins Filho sob a minha decisão de autorizar a retirada da coluna lombar para este estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do

estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Data ____/____/____

Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da Testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido do representante legal do cadáver para realização deste estudo.

Data ____/____/____

Dr. Délio Eulálio Martins Filho

FONTES CONSULTADAS

Armitage P, Berry G. The planning of statistical investigations. In: Armitage P, Berry G, Mathews JNS, editors. Statistical methods in medical research. 2.ed. Oxford: Blackwell, 1987. p.179-85.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.

Weiszflog W. Michaelis Moderno Dicionário da Língua Portuguesa. [Internet]. São Paulo: Melhoramentos; 2004. Disponível no endereço eletrônico: michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php