

REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR EM DEGENERAÇÃO EXPERIMENTAL DO DISCO INTERVERTEBRAL

EXTRACELLULAR MATRIX REMODELING IN EXPERIMENTAL INTERVERTEBRAL DISC DEGENERATION

CINTIA PEREIRA DE OLIVEIRA¹, LUCIANO MILLER REIS RODRIGUES², MARIA VITÓRIA VENTURA DIAS FREGNI¹, ALBERTO GOTFRYD³, ANA MARIA MADE⁴, MARIA APARECIDA DA SILVA PINHAL¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a remodelação da matriz extracelular na degeneração do disco intervertebral através do modelo experimental degeneração do disco intervertebral. **Métodos:** O modelo de indução da degeneração discal, utilizando agulha 20G e rotação de 360°, foi aplicado por 30 segundos entre a sexta/sétima e oitava / nona vértebras coccígeas de ratos machos da linhagem Wistar. O nível intermediário, entre a sétima e oitava vértebras, foi tomado como controle, não sendo submetido à punção. A distribuição de constituintes da matriz extracelular envolvidos com mecanismos de remodelamento e inflamação, como proteoglicanos (agrecam, decorin, biglicam), fatores de crescimento (TGFβ), isoformas de heparanase (HPSE1, HPSE2), metaloprotease-9 (MMP9) e interleucinas (IL-6, IL-10) foram avaliadas no período pós-lesão (15 e 30 dias) e no grupo controle (discos coletados imediatamente após a punção, dia zero). No 15º dia, fase aguda da doença, notou-se redução da expressão dos constituintes da matriz extracelular, porém não houve diferenças na expressão de interleucinas. Aos 30 dias, as moléculas seguiram um padrão de expressão muito similar ao grupo controle (não acometido por degeneração discal). **Resultados:** Os resultados mostram que na fase aguda ocorrem alterações significativas na matriz extracelular e, na fase tardia, o disco intervertebral retorna a um perfil semelhante ao tecido não acometido por degeneração, provavelmente devido a um intenso processo de remodelamento da matriz extracelular que é capaz de regenerar o tecido lesionado. **Conclusão:** O modelo experimental utilizado demonstrou a ocorrência de alterações significativas da matriz extracelular durante o período analisado após a indução da degeneração do disco intervertebral. **Trabalho experimental.**

Descritores: Degeneração do disco intervertebral. Proteoglicanos. Interleucinas. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the remodeling of the extracellular matrix in intervertebral disc degeneration through the experimental model of intervertebral disc degeneration. **Methods:** The model of disk degeneration induction, using needle 20G and 360° rotation, was applied for 30 seconds between the 6th/7th, and 8th/9th coccygeal vertebrae of Wistar rats. The intermediary level, between the 7th and 8th vertebrae, was taken as control, not being subjected to puncture. The distribution of the extracellular matrix components involved in the remodeling and inflammation process, such as proteoglycans (aggrecan, decorin, biglycan), growth factors (TGFβ), heparanase isoforms (HPSE1, HPSE2), metalloproteinase-9 (MMP9) and interleukins (IL-6, IL-10) was analyzed during the post-injury period (15 to 30 days) and in the control group (discs collected immediately after the puncture, day zero). On the 15th day, acute phase of the disease, a reduced expression of extracellular matrix components had been observed, whilst there were no differences in the interleukins expression. At 30 days, the molecules followed a very similar pattern of expression in the control group (not affected by disc degeneration). **Results:** The results show that during the acute phase significant alterations in the extracellular matrix components occur and in the late phase intervertebral disc returns to a profile similar to noninvolved tissue, probably due to extensive remodeling process of the extracellular matrix that is capable of regenerating the damaged tissue. **Conclusion:** The experimental model used demonstrated the occurrence of significant changes in the extracellular matrix during the period analyzed after induction of intervertebral disc degeneration. **Laboratory investigation.**

Keywords: Intervertebral disc degeneration. Proteoglycans. Interleukins. Rats, Wistar.

Citação: Oliveira CP, Rodrigues LMR, Fregni MVV, Gotfryd A, Made AM, Pinhal MAS. Remodelamento da matriz extracelular em degeneração experimental do disco intervertebral. Acta Ortop Bras. [online]. 2013;21(3):144-9. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Oliveira CP, Rodrigues LMR, Fregni MVV, Gotfryd A, Made AM, Pinhal MAS. Extracellular matrix remodeling in experimental intervertebral disc degeneration. Acta Ortop Bras. [online]. 2013;21(3):144-9. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

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

1. Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina ABC. Santo André, SP, Brasil.
2. Disciplina do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina do ABC. Santo André, SP, Brasil.
3. Faculdade de Medicina de Santos. Santos, SP, Brasil.
4. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina ABC. Santo André, SP, Brasil.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina do ABC. Santo André, SP, Brasil.

Correspondência: Luciano Miller Reis Rodrigues. Rua Borges Lagoa, 1065, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 04038-032. luciano.miller@uol.com.br

Artigo recebido em 14/10/2012, aprovado em 04/12/2012.

INTRODUÇÃO

A degeneração do disco intervertebral é um processo multifatorial, que afeta principalmente indivíduos durante o envelhecimento, mas, em alguns casos, jovens também. O processo degenerativo frequentemente resulta em dor lombar, muitas vezes prejudicial à capacidade laborativa, e os tratamentos existentes não impedem a sua progressão, resultando em alto custo para o sistema de saúde tanto para tratamento clínico quanto cirúrgico. Atualmente, sabe-se que a degeneração discal é decorrente de alterações celulares, bioquímicas e estruturais progredindo para uma redução do número de células no disco intervertebral e dos constituintes da matriz extracelular.¹⁻³

A matriz extracelular do disco intervertebral é uma estrutura complexa, constituída de água, proteoglicanos, fibras elásticas e colágeno, principalmente tipo I e II presentes no ânulo fibroso (AF). No núcleo pulposo (NP) predominantemente são encontrados proteoglicanos (PG) de alto peso molecular (agrecam, versicam, perlecum), que carregados negativamente e ligados a cadeias laterais com os glicosaminoglicanos (GAG), exercem papel fundamental assegurando resistência à compressão do disco durante os movimentos. Os proteoglicanos de baixo peso molecular (decorim, biglicam, fibromodulina, lumicam) interagem com outras moléculas da matriz extracelular como colágenos e fatores de crescimento sinalizando processos na degeneração discal.⁴⁻⁶

Heparan sulfato (HS) é um glicosaminoglicano (GAG) importante na organização da matriz extracelular. Suas cadeias são clivadas pela heparanase (HPSE), uma endo- β -glucuronidase, liberando oligossacarídeos que potencializam a ação de fatores de crescimento, citocinas e constituintes envolvidos com a angiogênese e osteogênese. Estudos indicam que a heparanase também está envolvida com outros processos, como invasão celular e inflamação. Duas isoformas dessa enzima foram descritas na literatura: heparanase-1 (HPSE1), que possui atividade enzimática, e heparanase-2 (HPSE2), cuja função ainda é desconhecida.⁷⁻⁹

O processo inflamatório na degeneração discal é desencadeado por mediadores bioquímicos como (TNF- α , prostanglandina E), que estimulam a resposta imunológica, e, em consequência, liberam citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), e fatores de crescimento, provocando dor.¹⁰

Metaloproteinases (MMP) são enzimas que também estão envolvidas na degradação da matriz extracelular, relacionadas com alterações estruturais do disco intervertebral.¹¹

No presente estudo, utilizando modelo animal foi avaliada a distribuição dos principais constituintes funcionais e estruturais da matriz extracelular que estão envolvidos no processo de degeneração do disco intervertebral, com objetivo de melhorar o monitoramento das moléculas ligadas à progressão da doença, entendendo melhor a fisiopatologia da degeneração discal. Os resultados poderão elucidar mecanismos moleculares relacionados com o processo de degeneração discal, evidenciando moléculas que futuramente poderão ser utilizadas para diagnóstico, prognóstico ou terapia alvo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo Animal

Para o modelo animal de degeneração do disco intervertebral foram utilizados três ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 12 semanas de idade (maturidade esquelética completa), pesando entre 300 e 350 gramas. Todos os ratos foram submetidos à indução da degeneração e apenas o primeiro animal foi eutanasiado logo após o procedimento cirúrgico, classificado

como controle (ou dia zero). O segundo animal foi eutanasiado 15 dias após a indução do processo de degeneração do disco intervertebral e o terceiro animal eutanasiado após 30 dias. Os animais permaneceram aos cuidados do biotério da faculdade após a indução da degeneração até o momento da eutanásia. Para a indução da degeneração do disco intervertebral foi realizada antisepsia na cauda com solução de álcool iodado, os animais foram anestesiados com associação de ketamina (88 mg/kg) e xilazina 2% (12 mg/kg) por via intraperitoneal. O plano anestésico profundo foi confirmado pela ausência de reflexo da córnea e pela ausência de reação à dor profunda dada pela compressão dos interdígitos das patas. Os níveis entre a sexta e a sétima e entre a oitava e a nona vértebras coccígeas foram identificados por palpação. A indução da degeneração foi realizada por punção percutânea com uma agulha de 20G. A agulha foi introduzida até o núcleo pulposo, girada 360° e mantida na mesma posição por 30 segundos, conforme trabalho de Zhang et al.¹² O nível intermediário, localizado entre a sétima e a oitava vértebras coccígeas, foi tomado como controle, visto que não foi submetido à punção. Após confirmação do plano profundo anestésico, foram colhidos 5 mL de sangue arterial proveniente da aorta abdominal, por acesso transabdominal, causando a eutanásia por choque hipovolêmico. Após a eutanásia, os segmentos das caudas com os discos para estudo foram extraídos por bisturi lâmina nº 15. Os discos intervertebrais retirados foram armazenados em frascos, devidamente identificados, com solução de formaldeído (10%) e encaminhados para o laboratório de Biologia Molecular para análises imunohistoquímicas. Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal, processo 003/2011. Cumprir ser observado que o modelo utilizado de degeneração discal em ratos reproduz as alterações morfológicas e bioquímicas similares àquelas observadas nos processos degenerativos dos discos intervertebrais humanos.¹³

Imunohistoquímica

Áreas representativas de degeneração do disco intervertebral foram escolhidas com base na coloração dos cortes de tecido por hematoxilina-eosina (HE). Cortes com 3 μ m de espessura, embebidos em parafina e fixados em formalina, foram desparafinizados e rehidratados. A recuperação do antígeno foi realizada pelo aquecimento das lâminas a 100 °C por 30 minutos em um tampão citrato 10 mmol/L, pH 6,0. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% por 35 minutos. Os cortes foram, então, incubados *overnight* a 4°C com os anticorpos primários: anti-HPSE1 (HPA1 L-19), anti-HPSE2 (HPA2 C-17), anti-agrecam (4F4), anti-decorim (N-15), anti-biglicam (L-15), TGF β 1 (sc-146), anti-MMP-9 (H-129), anti-interleucina-6 (sc-130326) e anti-interleucina-10 (H-160) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Finalmente, as lâminas foram incubadas com um complexo de estreptavidina marcado com peroxidase (LSAB[®], DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos. Os cortes foram revelados, utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por 1 minuto e foram contra-corados com hematoxilina. Algumas amostras foram incubadas com tampão fosfato 1 M na ausência do anticorpo primário, como controles negativos. A presença de coloração marrom foi considerada evidência de expressão positiva das respectivas moléculas na célula.

Quantificação digital

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

foi realizada por um método de análise digital por computador. As fotomicrografias de 640x480 pixels foram obtidas de campos consecutivos não-coincidentes em aumento de 400X com uma câmera digital 4300 Nikon Coolpix® ajustada para os mesmos parâmetros. As imagens obtidas foram analisadas pelo sistema de processamento e análise de imagens ImageLab® (Softium Informática®, São Paulo, Brasil), ajustado para a escala micrométrica (µm).

Índice de positividade (IP)

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

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

Intensidade de expressão (ItE)

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

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

Índice de expressão (IE)

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

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

RESULTADOS

Cortes do disco intervertebral de cada animal foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por patologista, para avaliação dos parâmetros histológicos. Observou-se que as alterações se concentraram, em sua maioria, na região cartilaginosa (central), exceção feita à presença de neovasos na região fibrosa (periférica) do disco intervertebral. A degeneração discal induzida em nível distal, entre a oitava e nona vértebras coccígeas, (Tabela 1) demonstrou níveis moderados de apoptose celular em todo o processo degenerativo, além de redução do processo de regeneração nas amostras coletadas aos 30 dias após a indução da degeneração. Na matriz extracelular, foi observado no decorrer do processo degenerativo leve presença de calcificação, diminuição da degeneração mixóide, crescimento gradativo de degeneração eosinofílica e formação de neovasos apenas aos 30 dias após a indução da degeneração discal. Os discos intervertebrais degenerados proximal e distal foram coletados, mas não foram observadas diferenças significativas entre os discos.

A análise da imunomarcagem para o proteoglicano de alto peso molecular agregam revelou redução de 22% na expressão deste proteoglicano, após 15 dias da indução da degeneração intervertebral, comparativamente ao grupo controle. Entretanto, os resultados mostram que ocorreu aumento de 37% na expressão do agregam após 30 dias de degeneração discal, quando comparada ao controle. (Figura 1) Os níveis de expressão foram confirmados pela quantificação digital das imagens. (Figura 2)

Os proteoglicanos de baixo peso molecular, decorim e biglicam, apresentaram notável redução da expressão aos 15 dias, respectivamente, 41% e 59%. (Figuras 1 e 4) Porém, 30 dias após a indução do processo de degeneração discal, foi observado aumento de 61% na expressão de decorim e 19% de biglicam, ambos comparados ao controle.

O fator de crescimento TGF-β apresentou considerável redução (69%), quando comparado aos discos intervertebrais do animal eutanasiado aos 15 dias, após indução da degeneração e amostras do grupo controle, é interessante ser observado que o TGF-β apresentou significativa redução (24%) de expressão aos 30 dias após degeneração discal em relação ao grupo controle.

A análise da expressão das isoformas de heparanase evidenciou redução de 29% na imunomarcagem do anticorpo anti-heparanase-1, nas amostras obtidas no 15º dia após a indução do processo de degeneração discal, mantendo discreta redução (6%) no 30º dia, em comparação com o grupo controle. (Figura 3)

Comparando-se a imunomarcagem da isoforma de heparanase-2 (HPSE2) com o grupo controle, observamos também discreta redução na expressão (4%) no 15º dia e aumento de aproximadamente 15% no 30º dia, após a indução da degeneração intervertebral. Os níveis de expressão foram confirmados pela quantificação digital das imagens. (Figura 4)

A metaloproteinase-9 (MMP-9) apresentou redução de 36% na expressão no 15º dia, comparativamente aos discos não degenerados.

Tabela 1. Avaliação patológica após indução da degeneração em disco intervertebral de ratos.

Dias após indução da degeneração	Apoptose	Regeneração	Fratura/Fissura	Calcificação	Degeneração Mixóide	Degeneração eosinofílica	Infiltrado Inflamatório	Neovasos
0 dias	(++)	(+++)	0	0	(+++)	0	0	0
15 dias	(++)	(+++)	0	(+)	(+)	(+)	0	0
30 dias	(++)	(+)	0	(+)	(+)	(++)	0	(+)

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

Novamente, um aumento de 31% da expressão de MMP-9 pôde ser observado no 30º dia, com relação ao grupo controle.

Quanto às moléculas envolvidas no processo inflamatório, foi evidente a diminuição da expressão de interleucina-6 (IL-6) nas

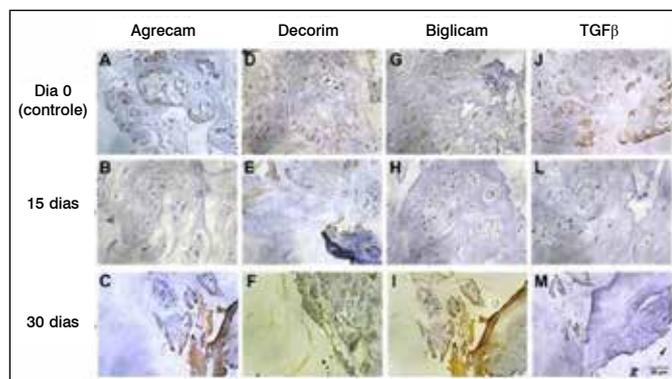


Figura 1. Reações de imunohistoquímica para análise de expressão de proteoglicanos e TGF-β. (A, B e C), tecidos marcados com anticorpo primário anti-agrecam 4F4; (D, E e F), tecidos marcados com anticorpo primário anti-decorim N-15; (G, H e I), Tecidos marcados com anticorpo primário anti-biglicam L-15; (J, L e M), tecidos marcados com anticorpo primário anti-TGFβ1(sc-146).

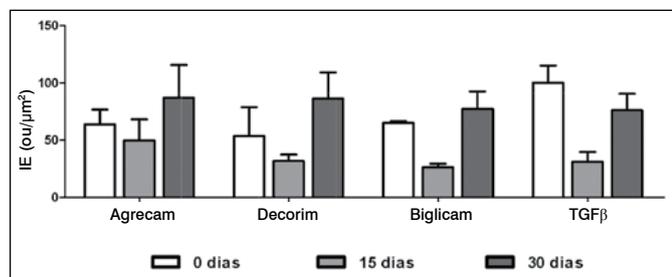


Figura 2. Os valores indicam a quantificação digital das reações de imunohistoquímica dos discos intervertebrais proximal e distal de ratos, após 0 dias; 15 dias e 30 dias de degeneração. Os valores indicam o índice de expressão (IE), obtido por quantificação digital após reações de imunohistoquímica.

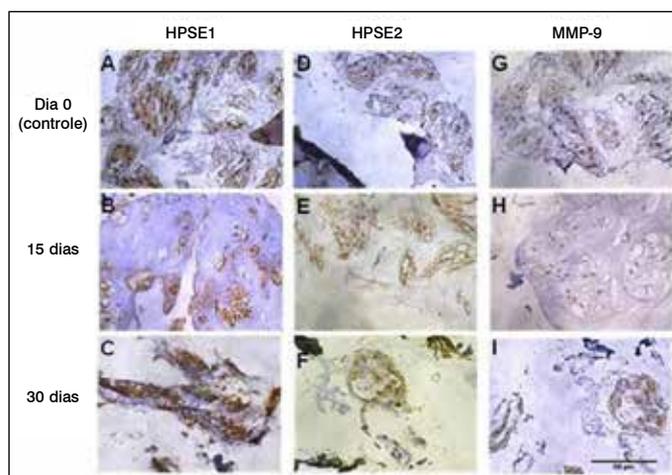


Figura 3. Reações de imunohistoquímica para análise de expressão de isoformas de heparanase (HPSE1 e HPSE2) e metaloproteinase-9 (MMP-9). (A, B e C), tecidos marcados com anticorpo primário anti-HPSE1 (HPA1 L-19); (D, E e F),

amostras de disco intervertebral que sofreram processo de degeneração, independente do tempo após a indução do processo degenerativo, 15 dias ou 30 dias, a diminuição observada foi, respectivamente, (15% e 3%), quando comparadas às amostras controle. (Figura 5)

A expressão de interleucina-10 (IL-10) apresentou notável redução aos 15 dias e discreta diminuição aos 30 dias após a indução do processo degenerativo, respectivamente, (51% e 1%) em relação ao grupo controle. A quantificação digital comprova os resultados obtidos nas reações de imunohistoquímica. (Figura 6) Em geral, as análises das imunomarcações com anticorpos específicos nas amostras do disco intervertebral dos ratos evidenciaram redução na expressão dos constituintes da matriz extracelular no 15º dia após indução da degeneração e, no 30º dia, retorno aos níveis próximos aos observados nas amostras obtidas de discos não degenerados.

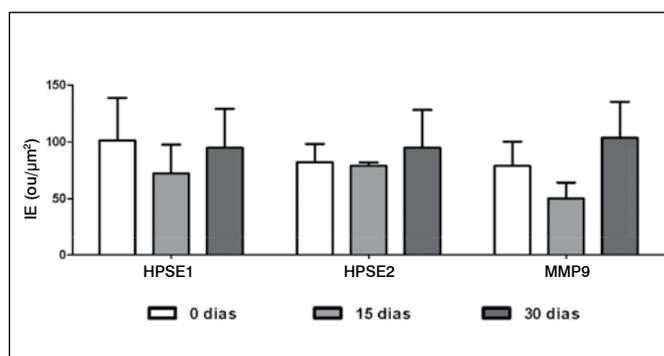


Figura 4. Os valores indicam a quantificação digital das reações de imunohistoquímica dos discos intervertebrais proximal e distal de ratos, após 0 dias; 15 dias e 30 dias de degeneração. Os valores indicam o índice de expressão (IE), obtido por quantificação digital após reações de imunohistoquímica.

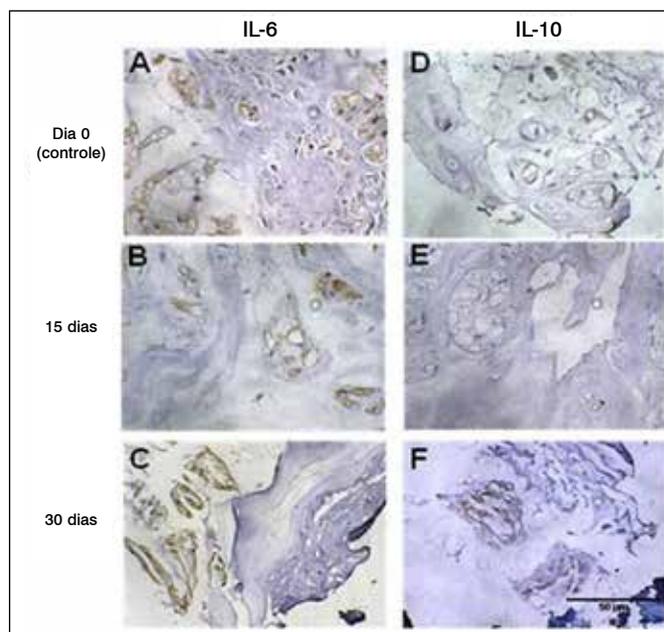


Figura 5. Reações de imunohistoquímica para análise da expressão de interleucinas (IL-6 e IL-10). (A, B e C), tecidos marcados com anticorpo primário anti-interleucina-6 (sc-130326); (D, E e F), tecidos marcados com anticorpo primário anti-interleucina-10 (H-160).

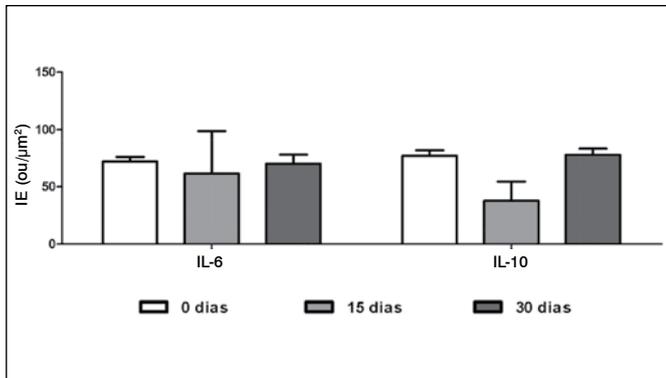


Figura 6. Os valores indicam a quantificação digital das reações de imunohistoquímica dos discos intervertebrais proximais e distais de ratos, após 0 dias; 15 dias e 30 dias de degeneração. Os valores indicam o índice de expressão (IE), obtido por quantificação digital após reações de imunohistoquímica.

DISCUSSÃO

Os resultados observados neste estudo piloto de indução da degeneração do disco intervertebral em ratos mostram variação na expressão dos componentes da matriz extracelular em diferentes períodos. No 15º dia houve redução da expressão de componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, TGF- β), bem como de enzimas que participam do processo de remodelamento da matriz (heparanase e MMP-9), enquanto, no 30º dia, a avaliação da expressão de tais componentes foi semelhante aos valores obtidos no grupo controle (sem degeneração discal).

Após 30 dias de degeneração discal, notamos diminuição no processo de regeneração, calcificação e formação de neovasos, caracterizando um tecido que já sofreu remodelamento quando comparado aos 15 dias após a indução da degeneração onde notamos intensa regeneração tecidual.

Dados da literatura evidenciam diminuição na atividade de enzimas envolvidas na degradação do proteoglicano agregam, as agreganases, associados à progressão da degeneração do disco intervertebral.¹⁴ Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com dados da literatura, visto que houve diminuição significativa dos proteoglicanos de heparan sulfato no 15º dia.

Melrose e colaboradores também evidenciaram aumento do biglicam e fibromodulina (proteoglicanos de baixo peso molecular), após seis meses de indução da degeneração do disco intervertebral em ovelhas.¹⁵

Há indícios de que o fator de crescimento TGF- β esteja associado à regulação da expressão de proteoglicanos de baixo peso molecular, como biglicam e decorim, resultando em alterações dos componentes da matriz extracelular associadas a doenças fibróticas.¹⁶

Sowa et al.¹⁷ demonstraram a diferença entre o processo de envelhecimento natural do disco intervertebral e modelos que produzem degeneração do disco intervertebral. O comportamento do TGF no processo de indução de degeneração discal foi semelhante do encontrado no nosso estudo, sendo que logo após o processo de degeneração ter sido induzido, observa-se diminuição dos níveis de expressão dos componentes da matriz extracelular, principalmente dos proteoglicanos decorim e biglicam, seguida por aumento na expressão de tais compostos como uma tentativa da reparação da lesão provocada.

A HPSE1 está envolvida em processos de remodelamento da

matriz extracelular por clivar cadeias de heparan sulfato. Os oligossacarídeos gerados pela HPSE1 interagem mais intensamente com fatores de crescimento, citocinas e fatores angiogênicos, e potencializam a ação de tais componentes, sinalizando eventos patológicos. A enzima HPSE1 também participa de processos de substituição de cartilagem por osso, durante a junção condro-óssea, através da retirada de cadeias de heparan sulfato dos proteoglicanos. Este evento é observado para o proteoglicano de heparan sulfato, perlecan diretamente relacionado à remodelação óssea e núcleo pulposo do disco intervertebral.^{7,18,19}

Esses dados descritos na literatura confirmam o aumento da expressão de HPSE1 observado em nosso estudo durante o processo de degeneração intervertebral tardia (30 dias). Nota-se também correlação entre a expressão de HPSE1 e MMP-9, relatado por Purushothaman e colaboradores.²⁰ Ainda, em estudo anterior realizado pelo nosso grupo demonstramos a relação direta entre o grau de degeneração do disco intervertebral e a expressão da HPSE1.⁸ O resultado obtido neste estudo prévio foi pioneiro em demonstrar a relação direta entre HPSE1, HPSE2 e o processo de degeneração discal em humanos.⁸

A HPSE2 não possui atividade enzimática e sua função até o momento ainda é desconhecida. Foi descrito que HPSE2 pode modular a atividade enzimática da HPSE1.²¹

O fato da isoforma HPSE2 não apresentar alteração significativa de expressão aos 15 dias após o processo de degeneração, pode explicar a diminuição da expressão da isoforma HPSE1, que possivelmente sofre modulação negativa pela HPSE2.

Holm e colaboradores e Akyol e colaboradores relataram aumento dos níveis de IL-1, IL-10 e citocinas em processos de degeneração tardia.^{22,23}

Considerando, que o 30º dia, no modelo experimental de degeneração discal em ratos adultos, equivalem ao processo tardio de degeneração, podemos afirmar que os resultados encontrados confirmam os achados obtidos na literatura.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória envolvida em processos degenerativos sintomáticos. Estudo realizado em 2009 por Holm e cols., com degeneração do disco intervertebral em porcos, não demonstrou níveis aumentados de IL-6 durante o processo degenerativo do disco intervertebral.²² Igualmente, no presente estudo, não foi observado alteração significativa da expressão de IL-6 nos discos intervertebrais degenerados, quando comparados ao grupo controle. Esse resultado pode ser justificado pelo tipo de inflamação presente no processo de degeneração do disco intervertebral, que corresponde a um processo inflamatório crônico. Quando se trata de um processo inflamatório agudo, normalmente há aumento significativo de IL-6, porém, nos estados inflamatórios crônicos esse aumento nem sempre é observado.

Observamos diminuição da IL-10 no 15º dia após indução da degeneração intervertebral, sugerindo que nesta fase possivelmente ocorre processo inflamatório. Este resultado corrobora com a literatura que demonstra a IL-10 como uma interleucina anti-inflamatória no disco intervertebral.²²

Este trabalho demonstra que no modelo de degeneração proposto ocorre uma mudança profunda nos diversos constituintes da matriz extracelular. Tais resultados abre diversas possibilidades para futuros estudos para melhor compreensão dos diversos fatores que agem no disco intervertebral durante o desenvolvimento do processo de degeneração evidenciando possibilidades de futuras terapias e possíveis marcadores de prognóstico da doença.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que na fase aguda da doença (15º dia) houve alterações significativas dos constituintes da matriz extracelular, enquanto, em uma fase mais tardia (30º dia), o tecido retornou a um perfil de expressão de moléculas semelhante ao tecido normal, provavelmente por ter ocorrido intenso processo de remodelamento da matriz extracelular.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

1. Liang C, Li H, Tao Y, Zhou X, Li F, Chen G, Chen Q. Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. *J Transl Med.* 2012;10:49.
2. Rodrigues LM, Rachel TT, Mader AM, Milani C, Ueno FH, Pinhal MAS. Análise comparativa Histopatológica entre hernia de disco contida e extrusa. *Coluna/Columna.* 2011; 10 (1): 55-7.
3. Smith LJ, Chiaro JA, Nerurkar NL, Cortes DH, Horava SD, Hebela NM, et al. Nucleus pulposus cells synthesize a functional extracellular matrix and respond to inflammatory cytokine challenge following long-term agarose culture. *Eur Cell Mater.* 2011;22:291-301.
4. Cs-Szabo G, Ragasa-San Juan D, Turumella V, Masuda K, Thonar EJ, An HS. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27(20):2212-9.
5. Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. *J Orthop Res.* 1987;5(2):198-205.
6. Smith LJ, Nerurkar NL, Choi KS, Harfe BD, Elliott DM. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. *Dis Model Mech.* 2011;4(1):31-41.
7. Brown AJ, Alicknavitch M, D'Souza SS, Daikoku T, Kirn-Safran CB, Marchetti D, et al. Heparanase expression and activity influences chondrogenic and osteogenic processes during endochondral bone formation. *Bone.* 2008;43(4):689-99.
8. Rodrigues LM, Theodoro TR, Matos LL, Mader AM, Milani C, Pinhal MA. Heparanase isoform expression and extracellular matrix remodeling in intervertebral disc degenerative disease. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(5):903-9.
9. Sela S, Natanson-Yaron S, Zcharia E, Vlodaysky I, Yagel S, Keshet E. Local retention versus systemic release of soluble VEGF receptor-1 are mediated by heparin-binding and regulated by heparanase. *Circ Res.* 2011;108(9):1063-70.
10. Sinclair SM, Shamji MF, Chen J, Jing L, Richardson WJ, Brown CR, et al. Attenuation of inflammatory events in human intervertebral disc cells with a tumor necrosis factor antagonist. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011;36(15):1190-6.
11. Wuertz K, Vo N, Kletsas D, Boos N. Inflammatory and catabolic signalling in intervertebral discs: the roles of NF- κ B and MAP kinases. *Eur Cell Mater.* 2012;23:103-19.
12. Zhang H, La Marca F, Hollister SJ, Goldstein SA, Lin CY. Developing consistently reproducible intervertebral disc degeneration at rat caudal spine by using needle puncture. *J Neurosurg Spine.* 2009;10(6):522-30.
13. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005;30(1):5-14.
14. Yurube T, Takada T, Suzuki T, Kakutani K, Maeno K, Doita M, et al. Rat tail static compression model mimics extracellular matrix metabolic imbalances of matrix metalloproteinases, aggrecanases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R51.
15. Melrose J, Smith SM, Fuller ES, Young AA, Roughley PJ, Dart A, et al. Biglycan and fibromodulin fragmentation correlates with temporal and spatial annular remodelling in experimentally injured ovine intervertebral discs. *Eur Spine J.* 2007;16(12):2193-205.
16. Hildebrand A, Romarís M, Rasmussen LM, Heinegård D, Twardzik DR, Border WA, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J.* 1994;302 (Pt 2):527-34.
17. Sowa G, Vadalà G, Studer R, Kempel J, Lucu C, Georgescu H, et al. Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;33(17):1821-8.
18. Kram V, Zcharia E, Yacoby-Zeevi O, Metzger S, Chajek-Shaul T, Gabet Y, et al. Heparanase is expressed in osteoblastic cells and stimulates bone formation and bone mass. *J Cell Physiol.* 2006;207(3):784-92.
19. Sanderson RD, Yang Y, Suva LJ, Kelly T. Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis. *Matrix Biol.* 2004;23(6):341-52.
20. Purushothaman A, Chen L, Yang Y, Sanderson RD. Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32628-36.
21. Levy-Adam F, Feld S, Cohen-Kaplan V, Shteingauz A, Gross M, Arvatz G, et al. Heparanase 2 interacts with heparan sulfate with high affinity and inhibits heparanase activity. *J Biol Chem.* 2010;285(36):28010-9.
22. Holm S, Mackiewicz Z, Holm AK, Kontinen YT, Kouri VP, Indahl A, et al. Pro-inflammatory, pleiotropic, and anti-inflammatory TNF-alpha, IL-6, and IL-10 in experimental porcine intervertebral disk degeneration. *Vet Pathol.* 2009;46(6):1292-300.
23. Akyol S, Eraslan BS, Etyemez H, Tanriverdi T, Hanci M. Catabolic cytokine expressions in patients with degenerative disc disease. *Turk Neurosurg.* 2010;20(4):492-9.