



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA  
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI RESTRIÇÃO  
DE ACESSO**

**CAXIAS DO SUL  
2024**

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - UCS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Charles André Carazzo**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA DEGENERAÇÃO  
DISCAL HUMANA**

**Caxias do Sul**  
**2024**

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - UCS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Charles André Carazzo**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA DEGENERAÇÃO  
DISCAL HUMANA**

Tese apresentada à Universidade de  
Caxias do Sul, para obtenção do título de  
doutor em Ciências da Saúde.  
Orientador: Prof. Dr. Asdrubal Falavigna

**Caxias do Sul**  
**2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

C262a Carazzo, Charles André

Avaliação do estresse oxidativo na degeneração discal humana [recurso eletrônico] / Charles André Carazzo. – 2024.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2024.

Orientação: Asdrubal Falavigna.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Degeneração do disco intervertebral. 2. Dor lombar. 3. Estresse oxidativo. I. Falavigna, Asdrubal, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 616.7110

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROF. DR. JOSÉ MAURO MADI**

# **AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA DEGENERAÇÃO DISCAL HUMANA**

Tese de doutorado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ciências da Saúde da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde, Linha de Pesquisa: Farmacologia e Biomarcadores

**BANCA EXAMINADORA:**

**Prof. Dr. Rafael Colombo**  
Universidade de Caxias do Sul

**Prof. Dra. Ana Paula Longaray Dalamare**  
Universidade de Caxias do Sul

**Prof. Dr. Marcelo Ughini Cruisius**  
Universidade de Passo Fundo

**Prof. Dr. Asdrugal Falavigna**  
Universidade de Caxias do Sul  
Professor-orientador – Presidente da Banca Examinadora

**Caxias do Sul, 15 de Março de 2024**

## Dedicatória

Dedico esta obra a minha amada esposa **Natasha** e aos nossos filhos **Marco Antonio e Vitor Hugo**. A vocês, meu amor incondicional!

## Agradecimentos

Ao meu orientador **prof. Dr. Asdrubal Falavigna**, agradeço pela oportunidade de participar deste programa de pós-graduação. Obrigado pela sua orientação, apoio e sabedoria, os quais foram fundamentais para a realização deste estudo. Sua dedicação e encorajamento constante foram uma fonte inestimável de inspiração ao longo deste caminho acadêmico. Sou profundamente grato pela sua orientação meticulosa, paciência e compromisso em me ajudar a alcançar meus objetivos acadêmicos. Seu apoio inabalável e mentoria generosa moldaram não apenas este trabalho, mas também meu desenvolvimento como pesquisador e ser humano.

À **Dra. Manuela Peletti-Figueiró**, uma profissional exemplar, dotada de competência e conhecimento científico notáveis. Agradeço imensamente por todos os momentos de apoio, mesmo à distância, que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Obrigado por sua orientação, apoio e expertise ao longo desta jornada.

Aos parceiros desta pesquisa: **Dr. Daniel Rodrigo Marinowic** e **Dr. Fernando Antonio Costa Xavier** do Instituto do Cérebro (InsCer) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), meu agradecimento pela inestimável ajuda em realizar os testes de RT-qPCR para avaliação dos genes na degeneração discal.

Aos também parceiros desta pesquisa: **Dra. Luciana Bavaresco Andrade Touguinha** e **Dra. Catia dos Santos Branco** do Laboratório de Estresse Oxidativo da Universidade de Caxias do Sul (UCS), meu sincero agradecimento pela ajuda na realização dos testes bioquímicos utilizados neste trabalho.

Ao meu colega e amigo **Dr. Alexandre Pereira Tognon**, que teve papel imprescindível na realização dos cálculos estatísticos. Obrigado pela sua ajuda e paciência.

Aos **professores desta pós-graduação**, pessoas da mais alta competência, que contribuíram de forma grandiosa nesta jornada.



À **Universidade de Caxias do Sul**, agradeço pela oportunidade em realizar esta pós-graduação nesta notável instituição de ensino.

À **Faculdade de Medicina da Universidade de Passo Fundo** a qual sou docente, agradeço a confiança que em mim depositam diariamente em prol do ensino da medicina.

Ao **Instituto de Neurologia e Neurocirurgia de Passo Fundo** e meus colegas de equipe: **Paulo Sérgio Crusius, Adroaldo Basseggio Mallmann, Cláudio Albano Seibert, Dr. Marcelo Ughini Crusius, Dr. Cassiano Mateus Forcelini, Cassiano Ughini Crusius, Naiana Posenatto e Dr. Werner da Silva Petry**. agradeço por todo o apoio e confiança no meu trabalho.

A todos os colegas de pós-graduação que este curso me proporcionou. O convívio com vocês fez com que este doutorado fosse por demais agradável e alegre.

Aos **meus alunos, residentes e fellows** de agora e de outrora, pela compreensão e ajuda em me tornar um bom professor.

Aos meus pais **Vaneila e Gilberto**, e minha irmã **Giusva** que precocemente aprenderam a conviver com a minha ausência, mas que sempre demonstraram amor incondicional e incentivo para que eu pudesse perseguir todos meus objetivos.

Ao meu cunhado e amigo **Arthur Balen**, obrigado pela inestimável ajuda na confecção das figuras e gráficos do artigo.

À minha **família e amigos**, obrigado todos que de alguma forma contribuíram com minha caminhada.

À minha esposa **Natasha** meu agradecimento especial. Seu amor inabalável, compreensão e encorajamento foram fundamentais para que eu pudesse enfrentar os desafios deste percurso acadêmico. Sua presença constante, mesmo nos momentos mais difíceis, trouxe conforto e inspiração, tornando possível a realização deste sonho. Agradeço de coração por todo o seu apoio, sacrifício e compreensão. Este trabalho não teria sido concluído sem você ao meu lado. Obrigado por ser minha parceira de vida e por fazer parte desta conquista. Te amo !

Aos meus filhos **Marco Antonio e Vitor Hugo**, quero expressar o meu mais profundo agradecimento por serem a luz dos meus dias e o motivo do meu esforço constante. Mesmo nos momentos em que minha presença foi limitada, vocês sempre estiveram lá, com amor e compreensão além das palavras. Cada sorriso de vocês foi um impulso de ânimo e cada abraço, uma lembrança do que realmente importa na vida. Saibam que o amor e o apoio que recebo de vocês são inestimáveis e me dão forças para seguir em frente, enfrentando todos os desafios que a vida nos apresenta. Vocês são verdadeiros tesouros em minha vida, e tudo o que faço é com o intuito de proporcionar um futuro melhor e que tenham orgulho do pai de vocês.

À **Deus**, sem a fé divina nossos caminhos são em vão.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DDL - Discopatia degenerativa lombar  
DIV - Disco intervertebral  
NP - Núcleo pulposo  
AF - Anel fibroso  
PC - Platô Cartilaginoso  
EO - Estresse Oxidativo  
IL-6 - Interleucina 6  
TNF-  $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral -  $\alpha$   
SASP – Fenótipo Secretor Associado a Senescência Celular  
NF- $\kappa$ B - Fator Nuclear Kappa B  
EROs - Espécies Reativas ao Oxigênio  
NOS – Espécies Reativas ao Nitrogênio  
ERs – Espécies Reativas  
TRX - Tireorredoxina  
PRDX/PAG1 - Peroxirredoxina  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio  
ON - Óxido Nítrico  
GSK3 $\beta$  - Glicogênio Sintase Quinase 3 beta  
HDAC4 - Histona Desacetilase 4  
ONOO– - Peroxinitrito  
iNOS - Óxido Nítrico Sintetase Induzível  
MMPs – Metaloproteinases

## RESUMO

**Introdução e justificativa:** A doença degenerativa dos discos intervertebrais é uma das principais causas de dor lombar, sendo associada a múltiplos fatores ambientais, ocupacionais, epigenéticos e genéticos. O tratamento inicialmente é conservador, incluindo medicamentos, infiltrações e fisioterapia. A cirurgia é indicada apenas nos casos refratários, sintomáticos e com concordância clínica-radiológica. Para o conhecimento fisiopatológico do processo degenerativo, é necessário a compreensão dos mecanismos de morte e regeneração celular. O Estresse Oxidativo tem sido estudado como um dos principais fatores moleculares que induzem a degeneração discal e tem atraído interesse dos pesquisadores pela sua relação com as doenças neurodegenerativas e a fatores biológicos ligados ao envelhecimento.

**Objetivos:** Avaliar o estresse oxidativo no disco intervertebral humano na doença degenerativa lombar através de marcadores proteicos, genéticos e bioquímicos para auxiliar na compreensão do papel do estresse oxidativo na degeneração do disco.

**Métodos:** Amostras de disco intervertebral foram obtidas de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para distúrbios da coluna lombar, divididos em grupos leves (graus de Pfirrmann II e III) e graves (graus de Pfirrmann IV e V). As seguintes análises foram realizadas: I - imunohistoquímica para avaliar a expressão das proteínas antioxidantes TRX e PRDX/PAG1, II - RT-qPCR para verificar a expressão dos genes NF- $\kappa$ B, GSK3 $\beta$  e P21/CDKN1A, e III - Testes bioquímicos para quantificar a proteína sulfidril e determinar a produção de óxido nítrico para verificar os níveis de estresse oxidativo.

**Resultados:** A proteína TRX mostrou expressão positiva predominante em condrócitos e fibroblastos, com expressão significativamente maior nos graus de doença mais leves ( $75,32 \pm 6,65$ ) em comparação com os mais graves ( $68,98 \pm 8,25$ ) ( $p \leq 0,001$ ). PRDX/PAG1 exibiu expressão mais alta em aglomerados de condrócitos NP e em doenças mais leves ( $65,70 \pm 12,15$ ) ( $p < 0,001$ ). Todos os genes avaliados mostraram tendência de aumento da expressão nos graus mais graves da doença e apresentaram uma correlação estatística positiva de Pearson, especialmente o gene P21/CDKN1A, que demonstrou hiperexpressão genética com diferença estatística significativa nos graus mais graves de patologia ( $p = 0,038$ ). A proteína sulfidril foi mais abundante em graus leves em comparação com graus graves de patologia ( $14,42 \pm 6,37$  vs.  $7,52 \pm 3,26$ ,  $p = 0,009$ ). A quantidade de óxido nítrico produzida foi maior entre aqueles com degeneração grave em comparação com aqueles com degeneração moderada ( $9,29 \pm 2,55$  vs.  $8,02 \pm 0,92$ ,  $p = 0,290$ ).

**Conclusões:** A degeneração do disco lombar resulta de vários fatores, incluindo estressores mecânicos, metabólicos, inflamatórios e genotóxicos. De acordo com este estudo, os graus mais graves desta patologia (Escala de Pfirrmann) ocorrem devido à redução da atividade antioxidante (TRX, PRDX/PAG1, proteínas sulfidril), aumento da expressão de genes inflamatórios e senescentes (NF- $\kappa$ B, GSK3 $\beta$ , P21/CDKN1A) e elevada produção de óxido nítrico, levando em última análise à apoptose celular.

**Palavras-chave:** Degeneração do disco intervertebral; degeneração do disco lombar; disco intervertebral; dor lombar; estresse oxidativo; tioredoxina; peroxirredoxina; NF- $\kappa$ B; GSK3 $\beta$ ; p21; óxido nítrico, sulfidril.

## Abstract

**Introduction and Justification:** Degenerative disc disease is one of the leading causes of low back pain, associated with multiple environmental, occupational, epigenetic, and genetic factors. Initial treatment is conservative, including medications, injections, and physiotherapy. Surgery is indicated only in refractory cases, symptomatic patients with clinical-radiological agreement. To understand the pathophysiology of the degenerative process, it is necessary to comprehend the mechanisms of cell death and regeneration. Oxidative stress has been studied as one of the main molecular factors inducing disc degeneration and has attracted researchers' interest due to its relationship with neurodegenerative diseases and biological factors associated with aging.

**Objectives:** To evaluate oxidative stress in the human intervertebral disc in lumbar degenerative disease through protein, genetic, and biochemical markers to aid in understanding the role of oxidative stress in disc degeneration.

**Methods:** Intervertebral disc samples were obtained from patients undergoing surgical treatment for lumbar spine disorders, divided into mild (Pfirrmann grades II and III) and severe (Pfirrmann grades IV and V) groups. The following analyses were performed: I - immunohistochemistry to assess the expression of antioxidant proteins TRX and PRDX/PAG1, II - RT-qPCR to verify the expression of genes NF- $\kappa$ B, GSK3 $\beta$ , and P21/CDKN1A, and III - Biochemical tests to quantify the sulfhydryl protein and determine nitric oxide production to ascertain oxidative stress levels.

**Results:** TRX protein showed predominantly positive expression in chondrocytes and fibroblasts, with significantly higher expression in milder disease grades ( $75.32 \pm 6.65$ ) compared to the more severe ones ( $68.98 \pm 8.25$ ) ( $p \leq 0.001$ ). PRDX/PAG1 exhibited higher expression in clusters of NP chondrocytes and in milder diseases ( $65.70 \pm 12.15$ ) ( $p < 0.001$ ). All evaluated genes showed a tendency for increased expression in the most severe degrees of the disease and presented a positive Pearson statistical correlation, particularly the P21/CDKN1A gene, which demonstrated genetic hyperexpression with significant statistical difference for the most severe degrees of pathology ( $p = 0.038$ ). The sulfhydryl protein was more abundant in mild grades compared to severe grades of pathology ( $14.42 \pm 6.37$  vs.  $7.52 \pm 3.26$ ,  $p = 0.009$ ). The amount of nitric oxide produced was higher among those with severe degeneration compared to those with moderate degeneration ( $9.29 \pm 2.55$  vs.  $8.02 \pm 0.92$ ,  $p = 0.290$ ).

**Conclusions:** Lumbar disc degeneration results from various factors, including mechanical, metabolic, inflammatory, and genotoxic stressors. According to this study, the most severe grades of this pathology (Pfirrmann Scale) occur due to reduced antioxidant activity (TRX, PRDX/PAG1, sulfhydryl proteins), increased expression of inflammatory and senescent genes (NF- $\kappa$ B, GSK3 $\beta$ , P21/CDKN1A), and elevated nitric oxide production, ultimately leading to cellular apoptosis.

**Keywords:** Intervertebral disc degeneration; lumbar disc degeneration; intervertebral disc; low back pain; oxidative stress; thioredoxin; peroxiredoxin; NF- $\kappa$ B; GSK3 $\beta$ ; p21; nitric oxide, sulfhydryl.