

BRUNO SACIOTO

**RELAÇÃO ENTRE AUTOFAGIA E APOPTOSE NO DISCO
INTERVERTEBRAL LOMBAR DEGENERADO**

Dissertação apresentada à Universidade de Caxias do Sul, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Caxias do Sul

2019

BRUNO SACIOTO

**RELAÇÃO ENTRE AUTOFAGIA E APOPTOSE NO DISCO
INTERVERTEBRAL LOMBAR DEGENERADO**

Dissertação apresentada à Universidade de Caxias do Sul, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Asdrubal Falavigna

Caxias do Sul

2019

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

S121r Saciloto, Bruno

Relação entre autofagia e apoptose no disco intervertebral lombar degenerado / Bruno Saciloto. – 2019.

53 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Orientação: Asdrubal Falavigna.

1. Disco intervertebral. 2. Autofagia. 3. Apoptose. I. Falavigna, Asdrubal, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 616.711

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

**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. ASDRUBAL FALAVIGNA

Bruno Saciloto

**RELAÇÃO ENTRE AUTOFAGIA E APOPTOSE NO DISCO
INTERVERTEBRAL LOMBAR DEGENERADO**

Presidente da banca:

Prof. Dr. Asdrubal Falavigna

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Crusius

Prof. Dr. Rafael Colombo

Prof. Dr. Daniel Marinowic

Dedicatória

À minha esposa Ana Elisa, mãe dos meus filhos, minha confidente e apoio em todos os momentos. Minha paixão e encantos por você sempre serão renovados, sempre tentando retribuir seu amor incondicional a mim e nossa família.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Asdrubal Falavigna, com seu conhecimento e experiência inestimáveis, direcionou a pesquisa em seus inúmeros momentos de dúvida. Obrigado pela paciência e sempre buscar o melhor em todos nós.

À Dra. Natalia Fontana Nicoletti e Dra. Manuela Peletti-Figueiró, tutoras da biologia celular desde seus conhecimentos mais básicos até os mais avançados. Sua ajuda na pesquisa e triagem dos artigos foi de fundamental importância. Obrigado pela paciência e perdão pelas perguntas ingênuas, vocês foram indispensáveis.

À AOSpine, entidade mundial e líder em ensino para patologias da coluna vertebral. Continuarei me aperfeiçoando, com espelho nos fundadores desta nobre instituição. Muito obrigado pela oportunidade e pela concessão de bolsa para custeio da mensalidade deste programa.

Ao Prof. Dr. Luciano Selistre, muito obrigado por sua prontidão e capacidade em auxiliar e guiar nos meandros da análise estatística.

Ao Laboratório de Entomologia da UCS (Prof. Dr. Wilson Sampaio de Azevedo Filho), ao permitir o uso da microscopia ótica essencial ao trabalho de análise das amostras.

À mestranda Cibele Tremea (Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais - Laboratório de Parasitologia da UCS), obrigado pelo auxílio nas instruções para utilização do ImageJ – NIH.

Ao Instituto de Citologia e Anatomia Patológica (Dra. Karina Salgado) – ICAP, obrigado ao manusear as amostras corretamente e disponibilizar sua estrutura para o corte das amostras.

À minha família e meus filhos Pedro e Júlia, obrigado pela paciência em suportar longos períodos distantes compreendendo meu objetivo final de crescer profissionalmente.

Aos meus sogros Edite e Vilmar, obrigado por me receberem em sua casa por tanto tempo, com tanto carinho como fariam a um filho.

Aos meus pais, pelos valores e ensinamentos básicos que sempre nortearam minhas atitudes. Muito obrigado!

Sumário

Dedicatória _____	v
Agradecimentos _____	vi
1. INTRODUÇÃO _____	1
2. REFERÊNCIAS _____	7
3. ARTIGO _____	13
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS _____	36

Esta dissertação de Mestrado Acadêmico Stricto Sensu é apresentada no formato exigido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Caxias do Sul. A mesma é constituída da secção de “Introdução com referências bibliográficas”, a inclusão do artigo original submetido/publicado em periódico Qualis A na classificação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior (CAPES), e as “Considerações Finais e Perspectivas”.

1. INTRODUÇÃO

A dor lombar é causa primária de incapacidade laborativa em países desenvolvidos (1). Pode atingir até 65% das pessoas, anualmente, acima dos 40 anos de idade, e até 84% em algum momento da vida (2). O custo de utilização dos sistemas de saúde aliado ao período afastado do trabalho representa a relevância do tópico, com estimativas de custos de até US\$ 50 bilhões de dólares (3,4). Na região Sul do Brasil a prevalência é de 72% na população geral, sendo 69,7% nas pessoas com idade inferior a 40 anos (5).

Determinam-se fatores de risco para o desenvolvimento de dor lombar crônica: ambiente de trabalho (p.ex. trabalhadores expostos à vibração), trauma lombar prévio, estilo de vida (sedentarismo, índice de massa corporal elevado), tabagismo, aterosclerose, senescência e predisposição genética (6–8). A progressão da doença degenerativa discal (DDD) e o aparecimento de sintomas dolorosos necessitam, além da predisposição genética, do principal gatilho extrínseco, que são os fatores ambientais de estilo de vida, tabagismo e obesidade (4,9,10).

O diagnóstico e planejamento do tratamento é realizado pela anamnese, exame neurológico e sua correlação com a ressonância nuclear magnética (RNM) (10). A DDD da coluna lombar pode ser classificada de acordo com o grau de desgaste do disco intervertebral (DIV) através da escala de Pfirrmann. A classificação de Pfirrmann varia entre as características normais do DIV (Grau 1) até o DIV de maior degeneração (Grau 5) (10,11). O tratamento cirúrgico é indicado em apenas 20% dos pacientes com hérnia de disco lombar (HDL), pois a hérnia é reabsorvida em aproximadamente 80% dos casos (12–15).

1.1 Anatomia e função do disco intervertebral

O DIV é um tecido fibrocartilaginoso avascular que inclui um núcleo pulposo (NP) interno e circundado pelo ânulo fibroso (AF), e ambos fixados no corpo vertebral através dos platôs cartilagosos (16). O AF é uma estrutura concêntrica lamelar de fibras de colágeno tipo I oblíquas, envolvendo o NP (17). O NP possui inicialmente células notocordais substituídas gradualmente por condrócitos (18). O NP é formado por proteoglicanos e colágeno tipo II (18). O platô cartilaginoso é composto por placas de cartilagem vascularizadas que permitem a difusão de nutrientes para o AF e o NP (17–19).

O microambiente do DIV é caracterizado por privação de nutrientes, havendo na sua degeneração níveis elevados de citocinas e estresse oxidativo (20–23). Com

a idade, baixas concentrações de tensão de oxigênio no centro do disco geram metabolismo anaeróbio, que resultam em altas concentrações de ácido lático e baixo pH (18). As deficiências no transporte metabólico parecem limitar tanto a densidade da matriz de colágeno, quanto a atividade metabólica das células discais (8). O processo degenerativo local metabólico ou mecânico (trauma, movimentos repetitivos) aumenta a produção de citocinas e estresse oxidativo, com perda progressiva da capacidade de remodelação tecidual (8). O conhecimento dos mecanismos de degeneração do DIV e o equilíbrio tecidual de apoptose/autofagia são importantes para melhor entender o mecanismo fisiopatológico da degeneração discal, seu tratamento e o prognóstico do paciente (24,25).

1.2 Apoptose

A apoptose é a morte programada da célula. Ela pode ser desencadeada pelo envelhecimento, pela resposta inflamatória acentuada ou secundária a um dano celular. A apoptose preserva a homeostase dos tecidos através da eliminação de células desnecessárias ou disfuncionais (26–28). A apoptose está associada com a senescência e a degeneração das células do DIV, demonstrando a importância dos estudos e das terapias vinculadas a supressão da apoptose para a terapêutica da DDD (26,29).

A apoptose pode ocorrer pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). No entanto, apesar das vias atuarem de maneiras distintas, ambas ativam uma cascata de reações proteolíticas envolvendo a ativação das caspases iniciadoras (2, 8, 9, 10) e executoras (3, 6, 7), resultando na amplificação do sinal apoptótico (26,29). A apoptose é iniciada com a ativação das caspases 8 e 10 na superfície celular (via extrínseca) (30). Em seguida, as caspases executoras 3, 6 e 7 são acionadas e responsáveis pela proteólise e a morfologia apoptótica da célula (31). Após liberação do citocromo C pela mitocôndria (via intrínseca), há uma ativação via APAF-1 da caspase iniciadora 9 (32). Ao remover a inibição da XIAP, há uma predominância do canal executor da caspase 3 (33) – vide figura 1.

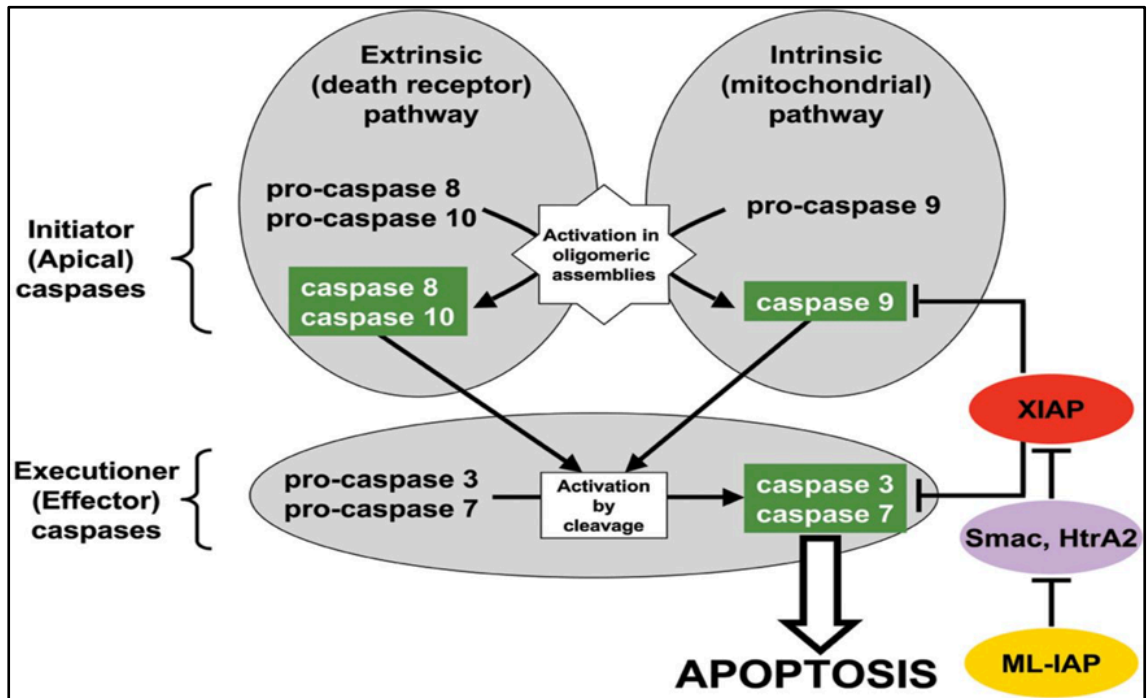


Figura 1 – Ilustração da via intrínseca e extrínseca da apoptose (31).

XIAP: Inibidor da proteína de apoptose ligado ao X. Smac: é uma proteína mitocondrial que promove ativação da Caspase-9. HtrA2: serina protease htra2. ML-IAP: inibidor da apoptose produzido por melanoma.

1.3 Autofagia

A autofagia é um processo catabólico e evolutivo de degradação dos componentes citosólicos, como proteínas e organelas para formação dos lisossomos. Como consequência, influencia na homeostasia e manutenção energética ao fornecer energia em resposta aos estímulos intracelulares e extracelulares (p.ex. privação nutricional) (34,35). Muitas doenças degenerativas estão associadas à disfunção do processo autofágico (36).

Existem três tipos de autofagia: I-macroautofagia; II- microautofagia; III- autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia é responsável por 90% da autofagia celular e tem seu mecanismo de ação melhor estudado (36). A macroautofagia e a autofagia mediada por chaperonas são eventos modulados com o avanço da idade e podem estar relacionados com o agravamento da doença discal degenerativa (37). Na microautofagia, os componentes citosólicos são incorporados diretamente em lisossomos através da invaginação da membrana lisossomal (37).

O nível basal de autofagia permite a troca ou reciclagem de organelas danificadas, proteínas e conteúdos citoplasmáticos. Esta função permite uma

adaptação ao estresse pela entrega de substratos metabólicos às células para suplementar a demanda de energia, fortalecendo assim o crescimento e garantindo a sobrevivência celular (38). Ao estimular a via PI3K-AKT, sob indução da Rheb-GTP há um estímulo da mTOR e inibição do fluxo autofágico (36). Sob stress (acúmulo de organelas danificadas ou hiperosmótico p.ex.), há uma modulação negativa da mTOR resultando no favorecimento da autofagia (36). Com este fenômeno positivo sobre a mTOR há um acúmulo do complexo ULK, resultando em estímulo à Beclin 1, e subsequentemente ATG16L, constituindo o estágio do fagóforo (36). Nesse estágio há uma conjugação com as outras ATG 5 e 12, formando o complexo ATG5-ATG12-ATG16L (36). Esse complexo irá favorecer a fosfatidiletanolamina (PE) a converter a proteína LC3-I (citosólica) na LC3-II (intra-autofagossômica), que é marcadora na formação do autofagossomo e atividade lisossômica (Figura 2) (39).

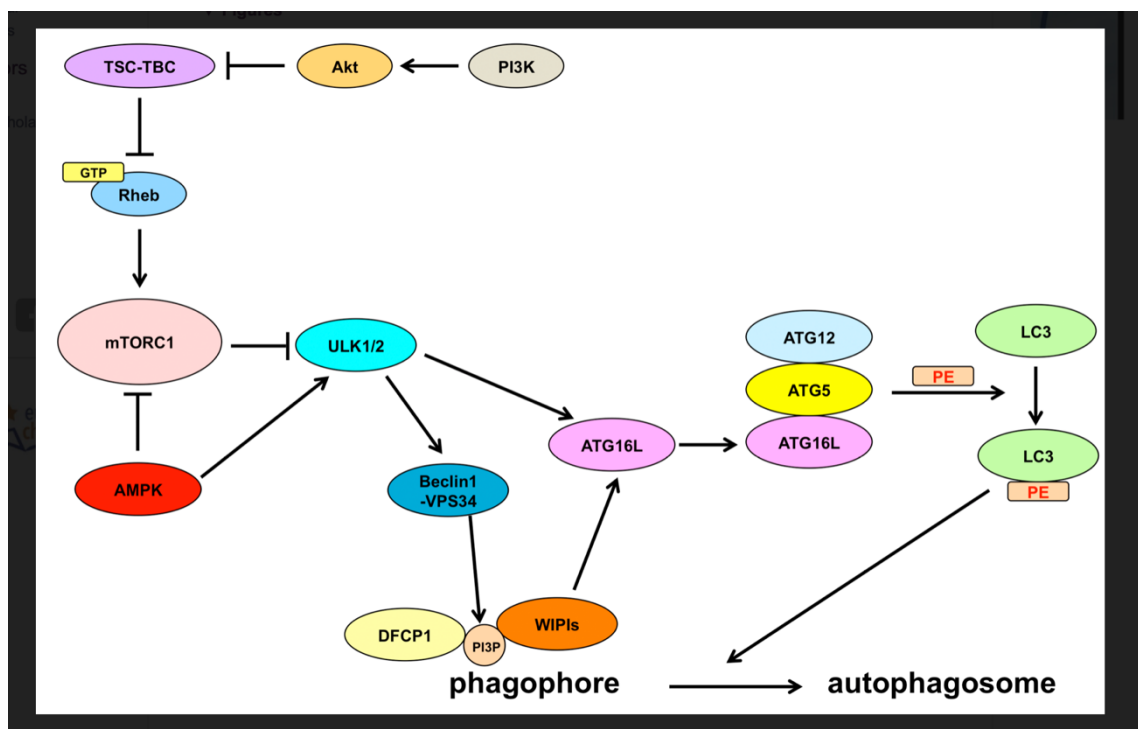


Figura 2 – Ilustração do processo de autofagia (36).

Em células de mamíferos a LC3 é expressa em múltiplas isoformas: LC3A, LC3B, LC3B2 e LC3C (40,41). Cadeia Leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (ou LC3) é uma proteína ubiquitina essencial para a formação da membrana autossômica (42). Essa proteína possui duas formas: LC3-I solúvel (18kDa), derivada de uma pro-LC3 30kDa após a clivagem pela proteína ATG4, e a forma membranosa LC3-II (16kDa), localizada na membrana interna e externa do autofagossomo (42).

Em diferentes tecidos ou linhagens celulares o aumento dos níveis de LC3A-II versus LC3B-II comporta-se de maneira distinta, sendo que não há a definição correta de qual a “melhor isoforma” a ser monitorada (43). O grau de ativação autofágica deve ser controlado para permitir a viabilidade celular pois, apesar da autofagia ser um sistema protetor das células, se executada em excesso, pode ocasionar um efeito deletério de morte celular (44–47).

1.4 Relação Apoptose e Autofagia

Apesar da sobrecarga mecânica, hipóxia ou estresse oxidativo do DIV, a preservação celular é mantida utilizando o controle de componentes celulares por macroautofagia e supressão da apoptose (48,49). Em ambientes predominantemente hostis, a autofagia inibe a apoptose e regula o metabolismo energético das células do DIV, inibindo o processo degenerativo. Apesar do avanço da ciência, existem controvérsias sobre a influência positiva ou negativa da autofagia sobre a apoptose celular no paciente com doença do DIV (47).

Quando nutrientes são suficientes, Beclin-1 e Bax/Bak ligam-se à Bcl-2 ou Bcl-xL impedindo o início da autofagia e apoptose (47). Após estímulo de situações de estresse oxidativo, há a interrupção da interação entre os componentes e indução dos processos autofágico e apoptótico: pró-apoptose BH3, fosforilação mediada por DAPK do domínio da Beclin-1, fosforilação mediada por JNK da Bcl-2, ligação da molécula DAMP/HMGB-1 à Beclin-1 (Figura 3) (47).

Sob condições de privação nutricional prolongada, Bcl-2 fosforilada liga-se diretamente à proteína pró-apoptótica Bax e inibe a apoptose (47). Porém, sob condições nutricionais extremas, JNK1 induz a hiper-fosforilação da Bcl-2, com dissociação subsequente da Bax e promoção da apoptose diretamente em vias ligadas à caspase 3 efetoras (47). Portanto, a dissociação da Bcl-2 originada da Beclin-1 promove também predominância à autofagia (anti-apoptótica), sendo a fosforilação mediada pela JNK, uma conexão importante entre ambos os fenômenos (50).

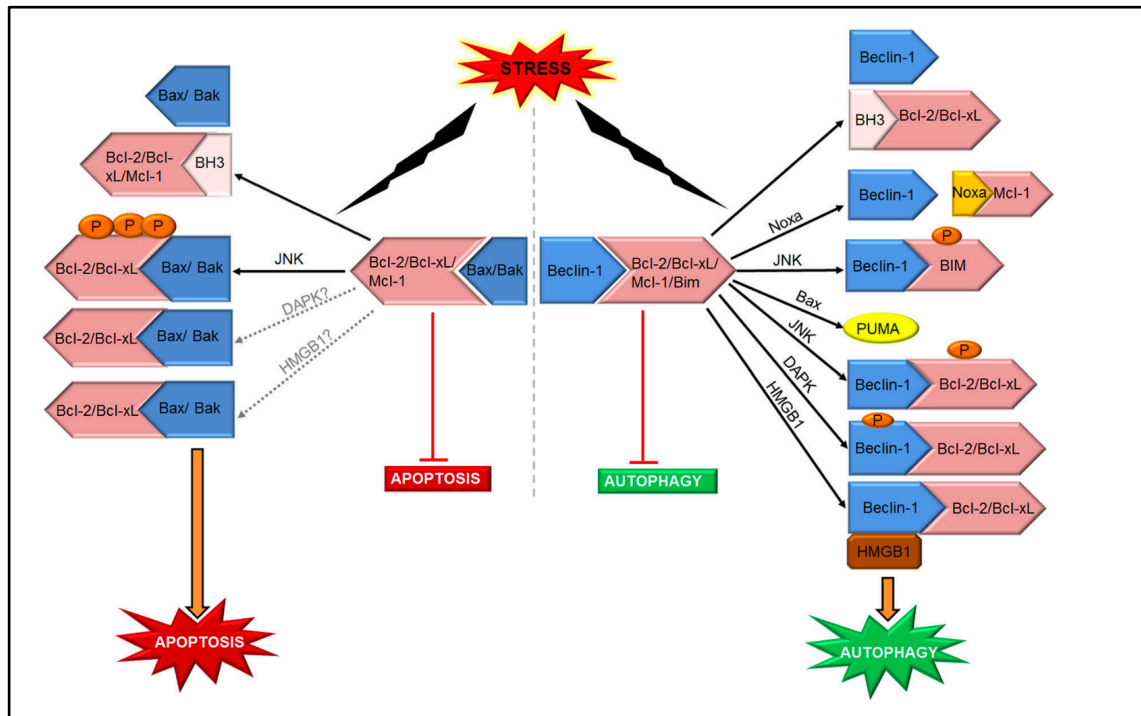


Figura 3: Ilustração da influência do estresse celular sobre a quebra do equilíbrio entre autofagia e apoptose (47).

O papel protetor da autofagia pode ser explicado na sua tentativa de prever o catabolismo da matriz extracelular no ambiente inflamatório do disco degenerado, porém sua resposta é variável mediante o estímulo e/ou stress oxidativo (49). Em situações de privação nutricional, há uma predominância da autofagia através de modulação da via mTOR (controle do balanço energético), e superexpressão do gene bcl-2 para inibição da apoptose (inibição da caspase 3 e aumento da expressão do colágeno tipo 2 e agrecan), com o objetivo de sobrevivência celular (51). Torna-se cada vez mais evidente que a apoptose e a autofagia são processos interligados, equilibrados, com vias complementares envolvidas na patogênese da DDD. Esta inter-relação é crítica para o destino da célula do DIV.

2. REFERÊNCIAS

1. Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2197–223.
2. Walker BF. The prevalence of low back pain: A systematic review of the literature from 1966 to 1998. *J Spinal Disord*. 2000;13(3):205–17.

3. Deyo RA. Low-back pain. *Sci Am* [Internet]. 1998 Aug [cited 2019 Jun 2];279(2):48–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674171>
4. Airaksinen O, Brox JI, Cedraschi C, Hildebrandt J, Klüber-Moffett J, Kovacs F, et al. Chapter 4: European guidelines for the management of chronic nonspecific low back pain. *Eur Spine J*. 2006;15(SUPPL. 2):192–300.
5. Falavigna A, De Braga GL, Monteiro GMC, Marcon G, De Castilhos I, Bossardi JB, et al. The epidemiological profile of a middle-aged population with low back pain in Southern Brazil. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015;40(6):E359–65.
6. Park J-B, Lee J-K, Park S-J, Kim K-W, Riew KD. Mitochondrial Involvement in Fas-Mediated Apoptosis of Human Lumbar Disc Cells. *J Bone Jt Surg* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2018 Jul 11];87(6):1338. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930545>
7. Rajasekaran S, Babu JN, Arun R, Armstrong BRW, Shetty AP, Murugan S. ISSLS prize winner: A study of diffusion in human lumbar discs: a serial magnetic resonance imaging study documenting the influence of the endplate on diffusion in normal and degenerate discs. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2017 Oct 28];29(23):2654–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564914>
8. Urban JPGG, Smith S, Fairbank JCTT. Nutrition of the Intervertebral Disc. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2017 May 18];29(23):2700–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564919>
9. Battié MC, Videman T, Kaprio J, Gibbons LE, Gill K, Manninen H, et al. The Twin Spine Study: Contributions to a changing view of disc degeneration. *Spine J* [Internet]. 2009 Jan [cited 2019 Jun 2];9(1):47–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111259>
10. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2019 Jun 2];26(17):1873–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568697>
11. Griffith JF, Wang Y-XJ, Antonio GE, Choi KC, Yu A, Ahuja AT, et al. Modified Pfirrmann Grading System for Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2007 Nov [cited 2019 Jun 2];32(24):E708–12. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00007632-200711150-00028>

12. Kim A, Yim N-H, Ma JY. Samsoeum, a traditional herbal medicine, elicits apoptotic and autophagic cell death by inhibiting Akt/mTOR and activating the JNK pathway in cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2013 Sep;13:233.
13. Teles AR, Righesso O, Gullo MCR, Ghogawala Z, Falavigna A. Perspective of Value-Based Management of Spinal Disorders in Brazil. *World Neurosurg* [Internet]. 2016 Mar [cited 2017 Oct 29];87:346–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26704211>
14. Falavigna A, Scheverin N, Righesso O, Teles AR, Gullo MC, Cheng JS, et al. Economic value of treating lumbar disc herniation in Brazil. *J Neurosurg Spine* [Internet]. 2016 Apr [cited 2017 Oct 29];24(4):608–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26654336>
15. Balagué F, Mannion AF, Pellisé F, Cedraschi C, Agildere A, Hurley D, et al. Non-specific low back pain. *Lancet* [Internet]. 2012 Feb 4 [cited 2017 May 23];379(9814):482–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982256>
16. Vergroesen PPA, Kingma I, Emanuel KS, Hoogendoorn RJW, Welting TJ, van Royen BJ, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: A vicious circle. *Osteoarthr Cartil*. 2015;23(7):1057–70.
17. Repanti M, Korovessis PG, Stamatakis M V, Spastris P, Kostis P. Evolution of disc degeneration in lumbar spine: a comparative histological study between herniated and postmortem retrieved disc specimens. *J Spinal Disord* [Internet]. 1998 Feb [cited 2017 Oct 28];11(1):41–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9493769>
18. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2007 [cited 2017 Oct 28];9(3):R45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498290>
19. Kim K-W, Chung H-N, Ha K-Y, Lee J-S, Kim Y-Y. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs. *Spine J* [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 May 18];9(8):658–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540815>
20. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am*

- [Internet]. 2003 [cited 2017 Oct 28];85-A Suppl 2:106–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721352>
21. Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology* [Internet]. 2002 [cited 2017 Oct 28];3(5):257–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12237562>
 22. Borenstein DG. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2001 Mar [cited 2017 Oct 28];13(2):128–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11224737>
 23. Luoma K, Riihimäki H, Luukkonen R, Raininko R, Viikari-Juntura E, Lamminen A. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2000 Feb 15 [cited 2017 Oct 28];25(4):487–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707396>
 24. Stanzer S, Janesch B, Resel M, Augustin T, Samonigg H, Bauernhofer T. The role of activation-induced cell death in the higher onset of spontaneous apoptosis of NK cell subsets in patients with metastatic epithelial cancer. *Cell Immunol* [Internet]. 2010 [cited 2018 Jul 26];261(2):99–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035932>
 25. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798–811.
 26. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2017 Oct 29];35(4):495–516. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>
 27. Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* [Internet]. 2001 [cited 2017 Oct 29];202:159–242. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11061565>
 28. Rubinstein AD, Kimchi A. Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci* [Internet]. 2012 Nov 15 [cited 2018 Oct 14];125(125):5259–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377657>
 29. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis , and why is it important ? *BMJ*. 2001;322(June):1536–8.
 30. Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science (80-)* [Internet]. 1998 Aug 28 [cited 2019 Jul 3];281(5381):1305–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721089>

31. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2019 Jul 3];384(Pt 2):201–32. Available from: <http://www.biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BJ20041142>
32. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* [Internet]. 1997 Nov 14 [cited 2019 Jul 3];91(4):479–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390557>
33. Green DR, Johnson C, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* (80-) [Internet]. 1998 Aug 28 [cited 2019 Jul 3];281(5381):1309–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721092>
34. Li D, Zhu B, Ding L, Lu W, Xu G, Wu J. Role of the mitochondrial pathway in serum deprivation-induced apoptosis of rat endplate cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014;452(3):354–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.054>
35. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-TT, Zhou T-TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* [Internet]. 2012 Dec [cited 2018 May 8];45(6):487–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030059>
36. Kiriya Y, Nishi H. The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Nov 9 [cited 2017 May 22];16(11):26797–812. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/11/25990/>
37. Li W, Yang Q, Mao Z. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2011 Mar 26 [cited 2017 May 22];68(5):749–63. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0565-6>
38. Klionsky D. Daniel Klionsky: A full plate for autophagy. Interview by Ben Short. *J Cell Biol* [Internet]. 2010 Apr 5 [cited 2017 Oct 29];189(1):8–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368614>
39. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) [Internet]. 2008 [cited 2019 Jul 3]. p. 77–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425443>
40. He H, Dang Y, Dai F, Guo Z, Wu J, She X, et al. Post-translational Modifications of Three Members of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a

- Novel Type of Modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2019 Jul 4];278(31):29278–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740394>
41. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol* [Internet]. 2011 Jul 27 [cited 2019 Jul 4];12(7):226. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21867568>
42. Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois CE, Sivridis E, Pouliliou S, et al. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. Srinivasula SM, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Sep 17 [cited 2019 Jul 2];10(9):e0137675. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0137675>
43. Zois CE, Koukourakis MI. Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: Towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies? *Autophagy* [Internet]. 2009 May 16 [cited 2019 Jul 4];5(4):442–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164950>
44. Xiao M, Li L, Li C, Zhang P, Hu Q, Ma L, et al. Role of Autophagy and Apoptosis in Wound Tissue of Deep Second-degree Burn in Rats. Olson JE, editor. *Acad Emerg Med* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Sep 18];21(4):383–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/acem.12352>
45. Jiang L-B, Cao L, Dong J. Does autophagy activation really inhibit calcification of endplate chondrocytes under intermittent cyclic mechanical tension? *Bone* [Internet]. 2015 Jun [cited 2017 May 18];75:240–1. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328214003950>
46. Mattiolo P, Yuste VJ, Boix J, Ribas J. Autophagy exacerbates caspase-dependent apoptotic cell death after short times of starvation. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2017 Oct 29];98(4):573–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26441250>
47. Mukhopadhyay S, Kumar P, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis : where do they meet ? *Apoptosis* [Internet]. 2014 Apr 12 [cited 2017 Oct 29];19(4):555–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24415198>
48. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* (80-). 2004;306(5698):990–5.

49. Martinet W, Agostinis P, Vanhooecke B, Dewaele M, Meyer GRYDE. Autophagy in disease : a double-edged sword with therapeutic potential. *Clin Sci*. 2009;116:697–712.
50. Wei Y, Sinha S, Levine B. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* [Internet]. 2008 Oct [cited 2018 Sep 30];4(7):949–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769111>
51. Sudo H, Minami A. Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression. *J Orthop Res* [Internet]. 2010 Dec [cited 2017 May 25];28(12):1608–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589931>

3. ARTIGO

Crosstalk between autophagy and apoptosis in intervertebral disc degeneration

Bruno Saciloto¹, Natália Fontana Nicoletti², Manuela Peletti-Figueiró², Asdrubal Falavigna^{1,2}

1 Health Sciences Post-Graduate Program, University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

2 Cell Therapy Laboratory (LATEC), University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

Corresponding author:

Asdrubal Falavigna MD, PhD

Laboratory of Basic Studies on Spinal Cord Pathologies Department of Neurosurgery, University of Caxias of Sul

Coordinator of Post-Graduation Program in Health Science.

Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 95070-560, Brazil

E-mail: asdrubalmd@gmail.com

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from AOSpine Latin America through Master's scholarship for Bruno Saciloto.

Entomology Laboratory – UCS - Prof. Wilson Sampaio de Azevedo Filho

Our thanks to ICAP Laboratory – Karina Salgado, MD and Statistical Analysis – UCS – Prof. Luciano Selistre, MD, PhD.

Conflict of Interest Statement

The authors have declared no conflicting interest.

PROOF READING SERVICE – TRADUÇÃO COM CERTIFICADO

Key Words: Intervertebral Disc Degeneration, Autophagy, Apoptosis, Crosstalk

Abbreviations and Acronyms

IVD: intervertebral disc

DDD: degenerative disc disease

LBP: low back pain

IDD: intervertebral disc degeneration

NP: nucleus pulposus

ECM: extracellular matrix

ATG: autophagy related genes

LC3: microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B

MRI: magnetic resonance imaging

AU: arbitrary units

GLM: generalizes linear model

WCOR: Harris hematoxylin solution

APAF1: Apoptotic protease activating factor 1

TNFR1: tumor necrosis factor receptor 1

Fas: apoptosis antigen 1

DISC: death-inducing signaling complex

m-TOR: mammalian target of rapamycin

TOR: target of rapamycin

PKA: Ras-c-AMP-dependent protein kinase A

SIRT1: sirtuin 1

AF: annulus fibrosus

ABSTRACT

Study Design: Basic-Science Paper

Objective: To describe the relationship between autophagy and apoptosis and the possible signaling pathways involved in degenerative lumbar intervertebral disc.

Summary of Background Data: Autophagy and apoptosis are regulatory cellular mechanisms that determine many pathologies, including degenerative intervertebral disc disease. The interactions between these events in the damage or protection of intervertebral disc cells and in cellular homeostasis remain controversial.

Methods: The sample size was twenty patients who underwent lumbar spine surgery for symptomatic disc herniation or spondylolisthesis. The intervertebral discs were classified by magnetic resonance as Pfirrmann grade IV and grade V. Six patients were operated on two levels, resulting in twenty-six intervertebral discs that were submitted to immunohistochemistry (anti-LC3A, anti-LC3A/B, anti-caspase8, anti-caspase9) to verify the protein expression of autophagy and apoptosis markers.

Results: The autophagic markers had greater protein expression in the human intervertebral disc (Pfirrmann Grades IV and V). Under these conditions, autophagy and apoptosis showed a negative correlation. Regarding apoptosis, caspase 8 presented the highest protein expression, which allows inferring the preference for the extrinsic pathway in cell death.

Conclusions: Autophagy had the greatest protein expression negative profile compared to apoptosis. Caspase 8 had the highest protein expression in apoptosis.

Level of Evidence: 4.

Key words: intervertebral disc degeneration, autophagy, apoptosis, crosstalk

1. INTRODUCTION

Degenerative disc disease (DDD) has been considered the commonest cause of low back pain (LBP) symptoms, with a heavy social and economic burden¹⁻³. Clinical and radiological correlation through magnetic resonance imaging (MRI) is essential for proper management, since intervertebral disc (IVD) degeneration is an aging process⁴⁻⁶. External and internal factors associated with DDD are labor-related (i.e. excessive vibration), smoking, aging and genetic predisposition⁵⁻⁷.

Apoptosis is programmed cell death responsible for maintaining homeostasis by the induction of death of pathological cells⁸. However, the excess of apoptosis is harmful and can cause DDD⁹. Signaling caspases 8 and 9 and effector caspase 3 are the commonest way to detect apoptosis¹⁰. Apoptosis can occur via two main pathways, extrinsic and intrinsic^{11,12}. Caspase 8 is increased when the extrinsic pathway is activated and caspase 9 when the intrinsic pathway is activated^{11,12}. Even though caspase 8 and 9 act in distinct molecular processes, both activate a proteolytic cascade which ultimately results in the apoptotic signal¹³.

Autophagy is a homeostatic mechanism through which a basal level of autophagy recycles and exchanges the damaged organelles, proteins and cytoplasmic components^{14,15}. It functions as an adaptation to stress through delivery of metabolic substrates to cells in an event of energy shortage, providing cell survival and growth¹⁴. There is progressive breakdown of extracellular matrix (ECM) components as a response to different stimuli such as nutrient deprivation causing excessive autophagy, accumulation of IL-1 β and TNF leading to cell death^{8,9,16,17}. Autophagy Related Genes ATG types 3, 4 and 7 as well LC3 and SQSTM1 proteins are essential to the autophagic process¹⁸. In mammalian cells, LC3 is expressed in multiple isoforms: LC3A, LC3B, and LC3C^{13,19}. The increasing levels of LC3A-II versus LC3B-II behave in different ways in different tissues or cell lineages, not defining which is the “best isoform” to be monitored¹⁴. Even though autophagy acts mainly as a protector of the degenerative state, if excessive it may result in autophagic cell death^{16,17}.

IVD preservation is achieved by the cellular balance via autophagy and apoptotic suppression^{20,21}. This study aims to better understand the crosstalk between autophagy and apoptosis and the signaling pathways involved in IVD degeneration.

2. PATIENTS AND METHODS

2.1. Ethics statement

This study was conducted in accordance with ethical standards and approved by the Ethics Committee of the University of Caxias do Sul (CEP/UCS 2.503.156). The patients were invited by an informed consent form.

2.2. Patient Selection

The symptomatic patients with spondylolisthesis or lumbar disc herniation were evaluated and treated initially with analgesic and anti-inflammatory medication, epidural infiltration, postural care, motor physical therapy and muscle strengthening. Radiological investigation with lumbar spine X-ray and magnetic resonance imaging (MRI) were performed if the symptoms persisted for two weeks. The surgical indication was determined by pain aggravation and progressive loss of motor function, with a clinical-radiological concordance. The final decision for surgery was made by the patient and their family after explaining the efficacy and risks of surgery, and postoperative care. The patient was invited to enter the study and signed the informed consent form if it was decided to perform surgery. The exclusion criteria were the presence of previous lumbar spine surgery or infection.

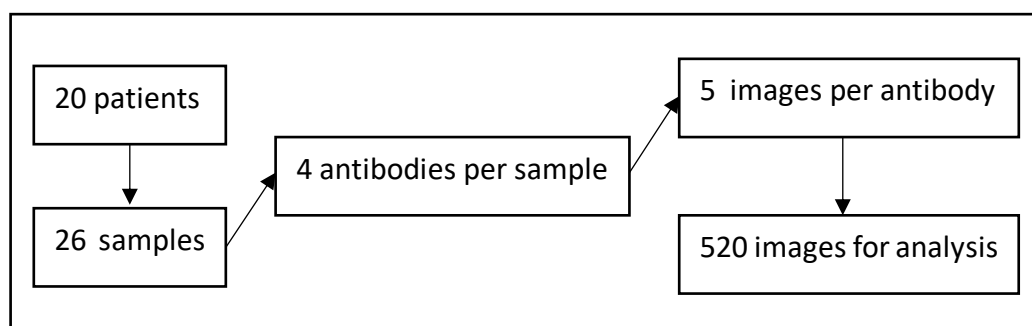


Fig.1: Number of patients and results for analysis.

2.3. Radiological and clinical evaluation

The severity of the lumbar spine IVD was determined by magnetic resonance using the Pfirrmann scale⁴. The Pfirrmann scale ranks the severity of IVD from grade I (normal) to grade V (severe degeneration) by acquisition of T2-weighted fast average spin-echo images⁴.

The clinical evaluation was performed by the Oswestry lumbar functionality (ODI) questionnaire²². The scale consists of 10 questions with six alternatives, value ranges from 0 to 5. The total score is divided by the number of questions answered

multiplied by the number 5 and the result of this division is multiplied by 100. ODI is classified as minimum disability (0 - 20%), moderate disability (21-40%), severe disability (41-60%), patient who appears invalid (61-80%), and bed-restricted individuals (81-100%)²².

2.4 IVD samples and tissue fixation

The fragments of IVD removed during the surgical procedure were collected and washed twice in sterile vats protected from the light, containing buffered 10% formalin (pH 7.4). This material was transported to the Cell Therapy Laboratory of the University of Caxias do Sul. All samples remained in buffered formalin 10% (pH 7.4) for 24h for complete tissue fixation. After this period, they were catalogued and analyzed macroscopically, where size, coloring, texture and other elements of the piece were evaluated to aid in the study.

2.5 Hematoxylin and Eosin staining

Samples were then dehydrated with consecutive ethyl alcohol 100% baths, diaphanized in xylol and embedded in paraffin. The blocks containing the selected samples were cut into 3 μ m sections using Leica microtome RM 2120RT (Leica, Bannockburn, IL, U.S.A.) with high profile razors (Leica, Bannockburn, IL, U.S.A.).

Hematoxylin and Eosin staining was obtained by standard protocol. Thus, the slides were diaphanized, dehydrated and stained with Harris Hematoxylin solution (WCOR) followed by Yellowish Eosin (Sigma-Aldrich[®], Missouri, USA). The final step of the slides was performed with Eukitt[®] quick-hard mounting medium (Fluka Analytical - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Images were analyzed using conventional optical microscopy Leica DM2500 (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, U.S.A.). The images were captured with the LAS V4.4 software microscope (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, U.S.A.). It should be noted that such basic staining was used only as a way of visual support of the quality of the tissue before the images of immunohistochemistry that were generated, not being part of the analysis and results of the study.

2.6 Immunohistochemistry

Immunopositivity for the relation between apoptosis and autophagy expression was assessed on paraffin tissue sections (3 μ m thick) by using polyclonal antibody anti-

Caspase 8 (1:1000, Cat. Number PA1-29159, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA), polyclonal antibody anti-Caspase 9 (1:500, Cat Number PA1-29160, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA), polyclonal antibody anti-LC3A/Cleaved (1:10, Cat Number PA5-35196, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) and polyclonal antibody anti-LC3A/LC3B (1:200, Cat Number PA1-16931, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). High-temperature antigen retrieval was performed by immersion of the slides into Standard Saline Citrate 2X (3M Sodium Chloride and 0,3M citric acid, pH 7) at 98–100°C. The peroxidase was blocked by incubating the sections with 3% hydrogen peroxide for 20min. The nonspecific protein binding was blocked with 15% milk serum solution for 12 min. After incubation at 37°C (30 minutes) and room temperature (45 minutes) with primary antibodies, the slides were washed with PBS 1X (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.02% KH₂PO₄, 0.088% Na₂HPO₄) and incubated with the secondary antibody (HiDef Detection Amplifier Mouse & rabbit, Cell Marque Corporation, Califórnia, EUA) for 12 minutes at room temperature and by detection polymer (HiDef DetectionHRP Polymer Detector, Cell Marque Corporation, Califórnia, EUA) for 12 minutes more at room temperature. The sections were washed in PBS 1X (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.02% KH₂PO₄, 0.088% Na₂HPO₄), and the visualization was completed by using 3,3'-diaminobenzidine (Cell Marque Corporation, Califórnia, EUA) in chromogenic solution and counterstained lightly with Harris's Hematoxylin (WCOR) solution. Images were examined with a Leica DM2500 optical microscope (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, U.S.A.) and the images were captured with the LAS V4.4 software microscope (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, U.S.A.). Five images of each sample were captured at x200 magnification ²³.

Digitized RGB images were analyzed using Image NIH (National Institute of Health) Image J 1.52a Software (NIH, Bethesda, MD, USA) to quantify the immunopositive Caspase 8, Caspase 9, LC3A/Cleaved, LC3A/LC3B. A specific macro was created for each antibody to quantify the immunopositivity of the labeled proteins in the immunohistochemical reactions based on the color of the pixel.

The dark-to-medium brown regions in the sample were selected and used as positive immunolabeling. When necessary, the brightness intensity within ImageJ was used to aid the program analysis. The software generated a macro, which allowed determining the optical density of the positive regions as arbitrary units (AU). All immunohistochemical reactions had the presence of at least one positive control for

the primary antibody used (anti-caspase 9, anti-caspase 8, cleaved anti-LC3A and anti-LC3A/3B), ensuring the immunohistochemical assay.

2.7 Statistical Analysis

Data was stored in the Excel 2007 program. Statistical analysis was performed through the R Project for Statistical Computing 3.6.1 (free software Foundation's GNU General Public License) for FreeBSD and Linux. The evaluation was performed in five images giving greater statistical strength to the tests. All immunohistochemistry data were correlated with radiological and clinical information of patients using the Spearman correlation test and Mann-Whitney U test with generalized linear model gamma (GLM). Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

3. RESULTS

Specimens from human nucleus pulposus were obtained from 20 patients who were submitted to lumbar surgery for degenerative disc disease (DDD) or lumbar disc herniation. From the entire number of patients, we obtained 26 biological samples of IVD for the study.

3.1 General aspects

A total of 26 samples of human nucleus pulposus were obtained from 20 patients, 6 of the patients had removal of 2 IVD discs (Table 1). The sex was equally distributed as male ($n=10$) and female ($n=10$). Median age was 49 (range 35-72). The mean and standard deviation of the preoperative ODI questionnaire was 65.8 ± 6.14 (range 55-75) (Table 1).

3.2 Autophagy had a greater protein expression

LC3A had the greatest protein expressed in AU through ImageJ analysis when compared with LC3A/LC3B, Caspase 8 and Caspase 9 (Figure 1). Higher median values related to superior autophagic activity were observed, perhaps associated with

the degenerative degree of the samples (Pfirrmann Grades IV and V only).

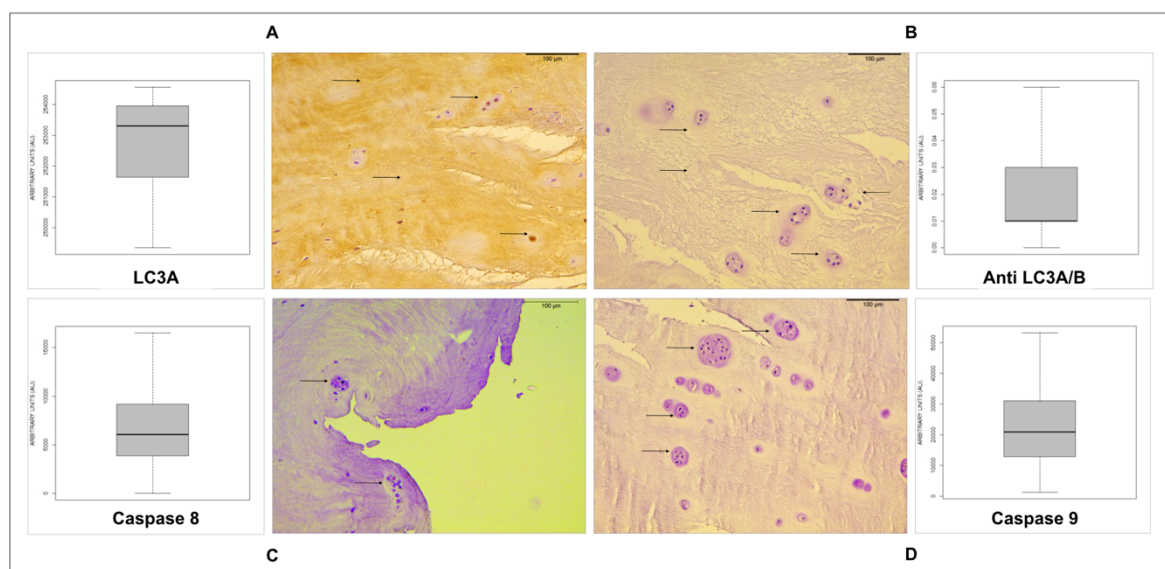


Figure 1: Protein expression in autophagy and apoptosis. Values showed in a boxplot demonstrate the median and interquartile range values and next is the protein expression as visualized in immunohistochemistry (x200 magnification). Black arrows mark the protein expression in optical microscopy. Examples of four samples for (A) antibody anti-LC3A, (B) antibody anti-LC3A/LC3B; C) antibody anti-caspase8; D) antibody anti-caspase9.

3.3 Autophagy versus apoptosis

A statistically significant result ($p < 0.001$) was observed between autophagy markers (LC3A and LC3A/LC3B) and apoptotic ones (caspase 8 and caspase 9).

A negative Rho (-0.58) between the autophagy and apoptosis was observed by Spearman correlation. Autophagy is negatively correlated with apoptosis in DDD - Pfirrmann Grades IV and V ($p < 0.001$).

3.4 LC3A vs Caspase 8

GLM analysis showed a positive relation between protein expression of LC3A and caspase 8 ($P < 0.002$), insinuating a prevalence of the extrinsic apoptotic pathway over the intrinsic one.

3.5 Pfirrmann vs Autophagy and Apoptosis

The GLM analysis between Pfirrmann grade, autophagy and apoptosis, showed a statistical significant ($p < 0,03$) result only at the variables IVD Grade V and caspase 9.

4. DISCUSSION

An inverse correlation was found between autophagy and apoptosis in Pfirrmann Grades IV and V IVDs. As autophagy specific protein expression, we found LC3A predominant.

Baseline and response profile expression for both LC3A-II and LC3B-II can assess the autophagic flux²⁴. The confocal microscopy with double immunofluorescence showed a lack of autophagosomes LC3A-II and LC3B-II proteins expression²⁴. The present study showed an immunohistochemistry marking with a prominent cytoplasmic localization of LC3A and nucleolar region of LC3A/LC3B. A similar finding was observed in another study²⁴. Isoform LC3C is poorly or not expressed in most normal tissues^{19,25,26}.

Autophagy has a variety of pathophysiological roles, such as starvation adaptation, intracellular protein and organelle clearance, development, anti-aging, elimination of microorganisms, cell death, tumor suppression and antigen presentation¹⁵. Autophagy can harm the cells when there is a loss of balance between destruction and construction, with higher levels of destruction²⁷.

If the PI3K-AKT pathway is induced under stress (Theb-GTP), mTOR is influenced and autophagic flow is inhibited²⁸. The stress causes a negative modulation over mTOR resulting in a pro-autophagy phenomenon²⁸. When mTOR is suppressed, the ULK complex leads to a Beclin-1 stimulation and subsequently ATG16L, which characterizes the phagophore stage²⁸. In conjunction with ATG5 and ATG12, it forms the ATG5-ATG12-ATG16L complex, which will ultimately favor the conversion of cytosolic LC3-I into intra-autophagosomal LC3-II through phosphatidylethanolamine (PE), constituting a marker of autophagosome formation and lysosomal activity with higher protein expression of the latter (Figure 2)²⁹.

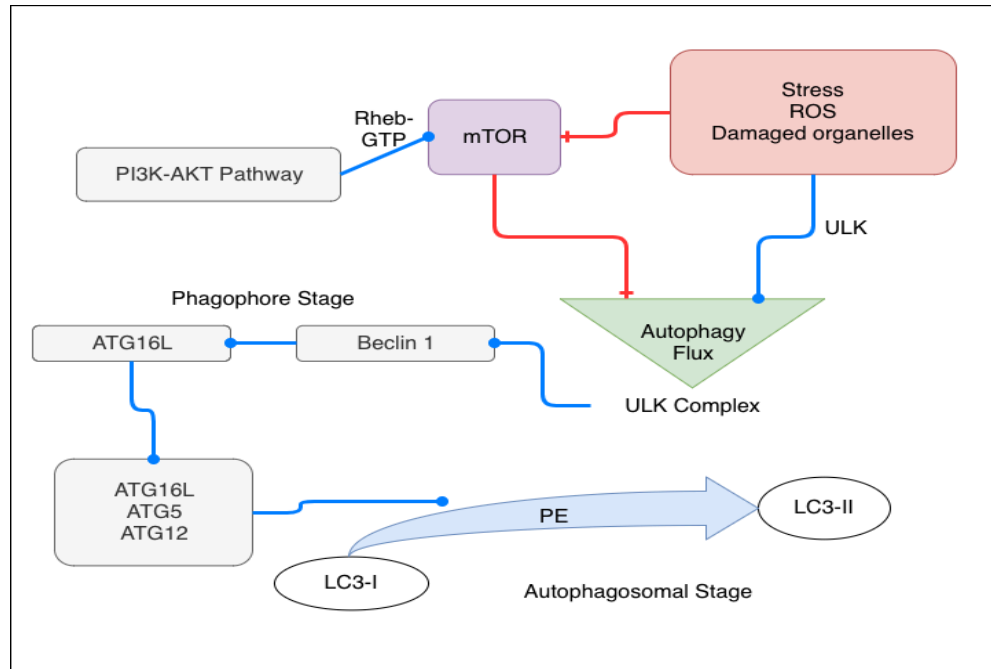


Figure 2: The autophagosome formation and determination of the autophagic flux and autophagosome formation – schematic drawing. Blue arrows indicate stimulation and red arrows indicate suppression.

Hence, with our results trending toward a dominant autophagic phenomenon via LC3A expression, we hypothesize that the constant axial compression and translational movement influenced the IVD degeneration process. The degeneration might act or attenuate the natural apoptotic effect in NP cells, enabling a protective or pro-survival effect of NP cells³⁰.

Rat NP cells exposed to compression underwent ROS-mediated autophagy, leading to cell degeneration and increased levels of Beclin 1 and processing of LC3B-I to LC3B-II, a marker for autophagosome formation³¹. Appropriate autophagic activity enhances the survival of NP cells under conditions of serum deprivation, whereas excessive autophagy triggers apoptosis of NP cells³². In a similar model, protein expression significantly increased in LC3 and Beclin 1 in IVD with exposition to 20% compression, as well as the ratio of LC3-II to LC3-I, with the autophagy being suppressed under higher (>20%) mechanical tension as apoptosis progresses⁸.

A group of cysteine proteases or caspases are activated via extrinsic or intrinsic signaling pathways when an apoptotic cascade is initiated¹¹. Caspase 9 (recruited by APAF-1), resulting from interaction to cytochrome-C, forms the apoptosome and leads to nuclear breakdown through effector caspases^{11,33}.

Our results showed that caspase 9 was more active in advanced degenerated discs, Pfirrmann V, hypothesizing that cell degeneration is accompanied by a radiological progression into final deterioration of the disc itself. The intrinsic pathway is regulated by various proteins: NF- κ B and Bcl-2 protein families³⁴. Anti-apoptotic Bcl-2 members repress apoptosis by blocking the release of cytochrome c whereas the pro-apoptotic members promote apoptosis³⁵.

A significant inverse correlation between apoptosis and autophagy was observed in the present study. The inverse correlation was mainly represented by antibody anti-LC3A versus protein expression of caspase 8, showing that an increase in autophagy resulted in suppression of an extrinsic apoptotic pathway. To initiate the extrinsic pathway, also called cytoplasmic, there is an activation of pro-apoptotic receptors such as tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1), death receptors (DRs) and Fas on the cell surface³⁶. Death-inducing signaling complex (DISC) is formed with initiator caspase 8 and 10 as procaspases, driving their autocatalytic process and releasing into cytoplasm and activating effector caspases^{36–38}.

IVD cell senescence is positively related to degree of DDD in adults³⁹. After senescence is initiated, it will result in a decrease in the number of viable and functional disc cells because their replication cannot resist disc cell loss caused by apoptosis or cell death⁴⁰. Furthermore, nutrient deprivation may significantly induce autophagosome formation⁴¹. Hypoxia also activates autophagy, through hypoxia-inducible-factor (HIF) and downstream TOR inhibition of AMP-activated protein kinase (AMPK)⁴¹. Since our sample consisted only of Pfirrmann grades IV and V, we assume that a progressive state of DDD was in progress, which corroborated other publications cited above that documented the same predominance of autophagy over apoptosis^{8,30,31,41}.

Hypoxia and nutrient starvation in IVD cells are common. The cells at the center of the IVD only acquire nutrition from fluid flow or diffusion through the vertebral endplates⁴². The metabolism in disc cells is partly anaerobic, leading to high lactic acid concentrations and low pH conditions⁴². Bid, cytochrome C and activated caspase 9 and 3 were intensively detected in herniated NP tissues⁴³.

Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis may function independently with a crosstalk between them³⁷. An activation of caspase 8 is observed promoting a processing of tBid, which subsequently stimulates Bax and Bak to engage intrinsic

pathway³⁷. Upregulation of proapoptotic receptors, such as DR5 by p53 (tumor suppression) may also augment extrinsic signaling³⁴.

Messenger RNA expressions of LC3-II/I and Beclin-1 were smaller in nucleus pulposus (NP) cells from DDD compared to cells from lumbar vertebral fracture, signaling that autophagy may develop a protective role in IVD degeneration⁴⁴. Similar correlations in SIRT1, caspase 3, collagen II and apoptosis levels in the degenerative NP were observed in the literature^{44,45}. Human NP had similar results to those of other different tissues^{46,47}. Apoptotic pathway proteins were analyzed in Pfirrmann grade IV with higher amounts of cleaved caspases 3 and 9 in a group with low nutrition compared to a normal one⁴⁸. Also, in a group with low nutrition (starvation) Bax protein expression was increased and Bcl-2 was attenuated, indicating a more advanced stage of degeneration⁴⁸.

If starvation was induced, autophagy was moderately increased and apoptosis of the cells maintained at a low level⁴⁹. When it was stimulated to an extremely high level, apoptosis increased⁴⁹. Early and moderate autophagy were beneficial to the survival of the IVD cells, while late and excessive autophagy led to death⁵⁰. Also, it can represent a desperate attempt to mitigate the stress of the cells before apoptosis activation⁴⁹. A regulatory process, linking autophagy and apoptosis, enables a more controlled and precise response to a stress signal⁴⁹. Autophagy and apoptosis shared the same set of cellular regulatory proteins and they could be induced by the same stimuli⁵¹. The interactions between autophagy and apoptosis on damage or protection of the IVD cells and the homeostasis of disc matrix, remain controversial⁵².

Our sample was constituted by degenerative IVD, Pfirrmann grades IV and V. It would be unethical to operate on grades I through III. Autophagy and apoptosis are key elements in determining cell fate, as well as their complex interactions and individual characteristics. It is difficult to identify a single exclusive factor that would change the balance and decide for a pro-survival or pro-death concept.

5. CONCLUSION

Autophagy had the greatest protein expression in human DDD. Under such conditions, autophagy and apoptosis showed a negative correlation. Caspase 8 had the highest protein expression in apoptosis, meaning a preference for the extrinsic pathway in human IVD Pfirrmann Grades IV and V IVD.

Figures Legends

Table 1: Demographic data from patients, as well pre-operative Oswestry Disability Scale (ODI).

Figure 1: Protein expression in autophagy and apoptosis. Values showed in a boxplot demonstrate the median and interquartile range values and next is the protein expression as visualized in immunohistochemistry (x200 magnification). Black arrows mark the protein expression in optical microscopy. Examples of four samples for (A) antibody anti-LC3A, (B) antibody anti-LC3A/LC3B; C) antibody anti-caspase8; D) antibody anti-caspase9.

Figure 2: The autophagosome formation and determination of the autophagic flux and autophagosome formation – schematic drawing. Blue arrows indicate stimulation and red arrows indicate suppression.

6. REFERENCES

1. Murray CJL, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2197-2223. doi:10.1016/S0140-6736(12)61689-4
2. Walker BF. The prevalence of low back pain: A systematic review of the literature from 1966 to 1998. *J Spinal Disord*. 2000;13(3):205-217. doi:10.1097/00002517-200006000-00003
3. Adams MA. Biomechanics of back pain. *Acupunct Med*. 2004;22(4):178-188. doi:10.1136/AIM.22.4.178
4. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(17):1873-1878. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568697>. Accessed June 2, 2019.
5. Rajasekaran S, Babu JN, Arun R, Armstrong BRW, Shetty AP, Murugan S. ISSLS prize winner: A study of diffusion in human lumbar discs: a serial magnetic resonance imaging study documenting the influence of the endplate

- on diffusion in normal and degenerate discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(23):2654-2667. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564914>. Accessed October 28, 2017.
6. Urban JPG, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(3):120-130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12723977>. Accessed October 28, 2017.
 7. Park J-B, Lee J-K, Park S-J, Kim K-W, Riew KD. Mitochondrial Involvement in Fas-Mediated Apoptosis of Human Lumbar Disc Cells. *J Bone Jt Surg*. 2005;87(6):1338. doi:10.2106/JBJS.D.02527
 8. Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, et al. Autophagy in the Degenerating Human Intervertebral Disc: In Vivo Molecular and Morphological Evidence, and Induction of Autophagy in Cultured Annulus Cells Exposed to Proinflammatory Cytokines-Implications for Disc Degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015;40(11):773-782. doi:10.1097/BRS.0000000000000865
 9. Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy*. 2016;12(2):245-260. doi:10.1080/15548627.2015.1071759
 10. Booth LA, Tavallai S, Hamed HA, Cruickshanks N, Dent P. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cell Signal*. 2014;26(3):549-555. doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.028
 11. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
 12. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis , and why is it important ? *BMJ*. 2001;322(June):1536-1538.
 13. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol*. 2011;12(7):226. doi:10.1186/gb-2011-12-7-226
 14. Zois CE, Koukourakis MI. Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: Towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies? *Autophagy*. 2009;5(4):442-450. doi:10.4161/auto.5.4.7667
 15. Bampton ETW, Goemans CG, Niranjana D, Mizushima N, Tolkovsky AM. The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy*. 2005;1(1):23-36. doi:10.4161/auto.1.1.1495

16. Mattiolo P, Yuste VJ, Boix J, Ribas J. Autophagy exacerbates caspase-dependent apoptotic cell death after short times of starvation. *Biochem Pharmacol.* 2015;98(4):573-586. doi:10.1016/j.bcp.2015.09.021
17. Mukhopadhyay S, Kumar P, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis : where do they meet ? *Apoptosis.* 2014;19(4):555-566. doi:10.1007/s10495-014-0967-2
18. Adams MA, Roughley PJ. What is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It? *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(18):2151-2161. doi:10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c
19. He H, Dang Y, Dai F, et al. Post-translational Modifications of Three Members of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a Novel Type of Modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem.* 2003;278(31):29278-29287. doi:10.1074/jbc.M303800200
20. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science (80-).* 2004;306(5698):990-995.
21. Zhang S-J, Yang W, Wang C, et al. Autophagy: A double-edged sword in intervertebral disk degeneration. *Clin Chim Acta.* 2016;457:27-35. doi:10.1016/j.cca.2016.03.016
22. Vigatto R, Alexandre NMC, Filho HRC. Development of a Brazilian Portuguese Version of the Oswestry Disability Index. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007;32(4):481-486. doi:10.1097/01.brs.0000255075.11496.47
23. Peletti-Figueiró M, De Aguiar IS, Paesi S, et al. Histological markers of degeneration and regeneration of the human intervertebral disk. *Coluna/Columna.* 2017;16(1):42-47. doi:10.1590/S1808-185120171601170833
24. Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, et al. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. Srinivasula SM, ed. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137675. doi:10.1371/journal.pone.0137675
25. Wu J, Dang Y, Su W, et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339(1):437-442. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.211
26. Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene.* 2012;31(40):4397-4408. doi:10.1038/onc.2011.613

27. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007;21(22):2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207
28. Kiriya Y, Nochi H. The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26797-26812. doi:10.3390/ijms161125990
29. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol 445. ; 2008:77-88. doi:10.1007/978-1-59745-157-4_4
30. Li S, Hua W, Wang K, et al. Autophagy attenuates compression-induced apoptosis of human nucleus pulposus cells via MEK/ERK/NRF1/Atg7 signaling pathways during intervertebral disc degeneration. *Exp Cell Res.* 2018;370(1):87-97. doi:10.1016/j.yexcr.2018.06.012
31. Ma K-GK-G, Shao Z-WZ-W, Yang S-HS-H, et al. Autophagy is activated in compression-induced cell degeneration and is mediated by reactive oxygen species in nucleus pulposus cells exposed to compression. *Osteoarthr Cartil.* 2013;21(12):2030-2038. doi:10.1016/j.joca.2013.10.002
32. Chen J-WWJ-WJW, Ni B-BBB-BB Bin, Zheng X-FFX-FXF, Li BB, Jiang S-DDS-D, Jiang L-SSL-S. Hypoxia facilitates the survival of nucleus pulposus cells in serum deprivation by down-regulating excessive autophagy through restricting ROS generation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;59:1-10. doi:10.1016/j.biocel.2014.11.009
33. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
34. Zhang FAN, Zhao X, Shen H, Zhang C. Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration (Review). *Int J Mol Med.* 2016;37(6):1439-1448. doi:10.3892/ijmm.2016.2573
35. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei A a. in BASIC SCIENCE Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *A Cancer J Clin.* 2005;55:178-194. doi:10.3322/canjclin.55.3.178
36. Stanzer S, Janesch B, Resel M, Augustin T, Samonigg H, Bauernhofer T. The role of activation-induced cell death in the higher onset of spontaneous apoptosis of NK cell subsets in patients with metastatic epithelial cancer. *Cell Immunol.* 2010;261(2):99-104. doi:10.1016/j.cellimm.2009.11.006
37. Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor

- agonists. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(12):1001-1012. doi:10.1038/nrd2637
38. Zhang C, Zhang F. The Multifunctions of WD40 Proteins in Genome Integrity and Cell Cycle Progression. *J genomics*. 2015;3:40-50. doi:10.7150/jgen.11015
39. Gruber HE, Ingram JA, Norton HJ, Hanley EN. Senescence in Cells of the Aging and Degenerating Intervertebral Disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(3):321-327. doi:10.1097/01.brs.0000253960.57051.de
40. Zhao L, Tian B, Xu Q, Zhang C, Zhang L, Fang H. Extensive mechanical tension promotes annulus fibrosus cell senescence through suppressing cellular autophagy. *Biosci Rep*. 2019;39(4):BSR20190163. doi:10.1042/BSR20190163
41. Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*. 2008;90(2):313-323. doi:10.1016/j.biochi.2007.08.014
42. Sakai D, Grad S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:159-171. doi:10.1016/j.addr.2014.06.009
43. Erwin WM, Islam D, Davies-Inman R, Fehlings MG, Tsui FW. Notochordal Cells Protect Nucleus Pulposus Cells from Apoptosis: Implications for the Mechanisms of Intervertebral Disc Degeneration. *Spine J*. 2012;22(9):1-15. doi:10.1016/j.spinee.2012.08.127
44. Jiang W, Zhang XX, Hao J, et al. SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells. *Sci Rep*. 2014;4:7456. doi:10.1038/srep07456
45. Wang D, Hu Z, Hao J, et al. SIRT1 inhibits apoptosis of degenerative human disc nucleus pulposus cells through activation of Akt pathway. *Age (Omaha)*. 2013;35(5):1741-1753. doi:10.1007/s11357-012-9474-y
46. Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*. 2007;26(37):5489-5504. doi:10.1038/sj.onc.1210616
47. Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(3):791-801. doi:10.1002/art.27305

48. Miyazaki S, Kakutani K, Yurube T, et al. Recombinant human SIRT1 protects against nutrient deprivation-induced mitochondrial apoptosis through autophagy induction in human intervertebral disc nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):253. doi:10.1186/s13075-015-0763-6
49. Rubinstein AD, Kimchi A. Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci.* 2012;125(125):5259-5268. doi:10.1242/jcs.115865
50. Ni B-B, Li B, Yang Y-H, et al. The effect of transforming growth factor beta1 on the crosstalk between autophagy and apoptosis in the annulus fibrosus cells under serum deprivation. *Cytokine.* 2014;70(2):87-96. doi:10.1016/j.cyto.2014.07.249
51. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):741-752. doi:10.1038/nrm2239
52. Chen J-W, Ni B-B, Li B, et al. The Responses of Autophagy and Apoptosis to Oxidative Stress in Nucleus Pulposus Cells : Implications for Disc Degeneration. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(4):1175-1189. doi:10.1159/000366330

APPENDICES I

Table 1

	Disc Level	Pfirschmann	Age	Gender	Oswestry
P1	L4-L5	4	46	F	65
P2	L4-L5	4	46	M	75
	L5-S1	5			75
P3	L4-L5	5	68	F	70
P4	L4-L5	4	46	F	75
P5	L4-L5	4	49	M	65
P6	L4-L5	4	39	M	65
P7	L5-S1	4	35	F	60
P8	L3-L4	4	72	F	70
	L5-S1	5			
P9	L5-S1	4	51	M	60
P10	L4-L5	5	57	M	55
	L5-S1	4			
P11	L3-L4	5	64	F	65
	L4-L5	5			
P12	L5-S1	5	39	M	70
P13	L4-L5	4	66	F	65
P14	L4-L5	4	43	F	70
	L5-S1	4			
P15	L4-L5	4	44	M	75
P16	L5-S1	5	38	M	60
P17	L4-L5	4	48	F	65
P18	L4-L5	4	46	F	55
P19	L4-L5	4	59	M	60
	L5-S1	5			
P20	L3-L4	5	71	M	70

APPENDICES II
FIGURE 1

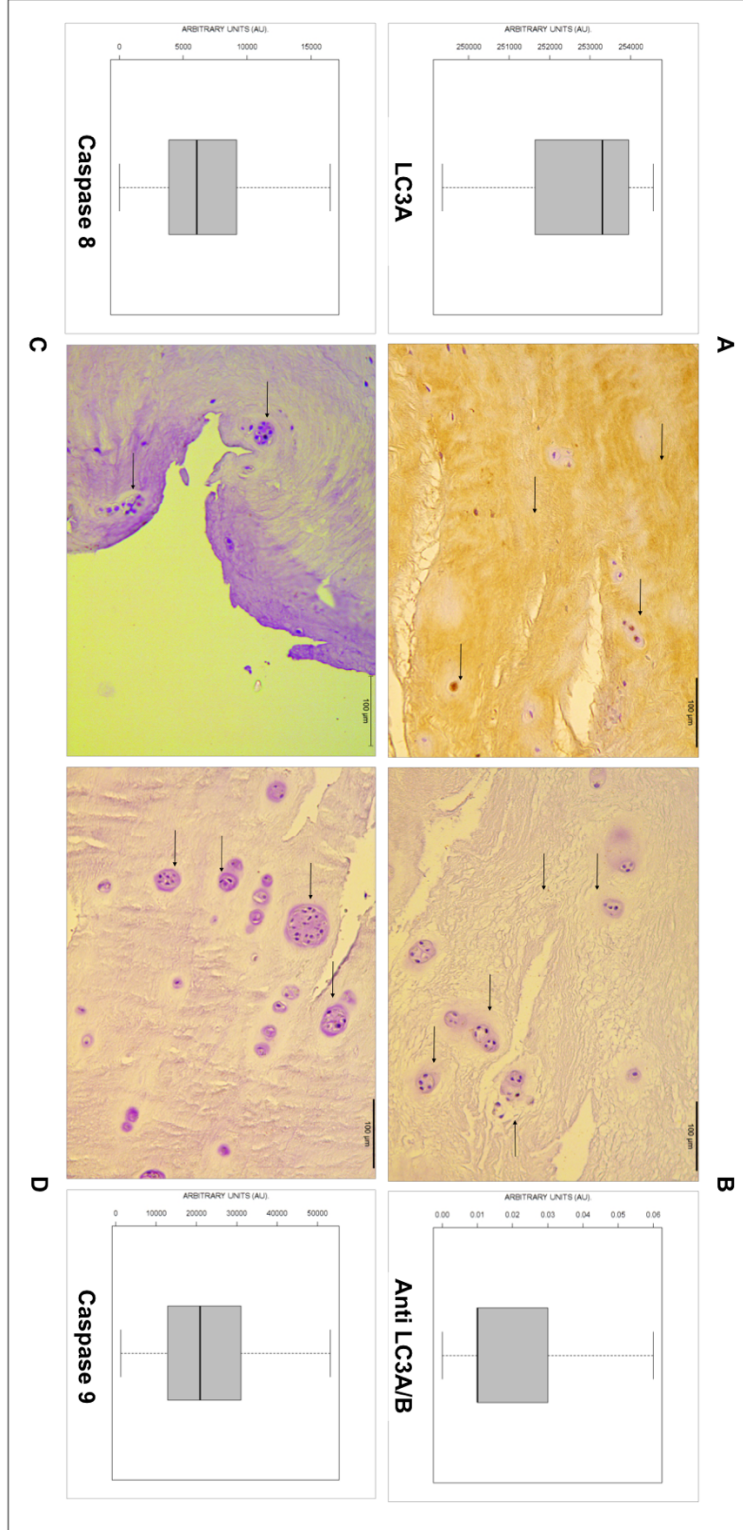
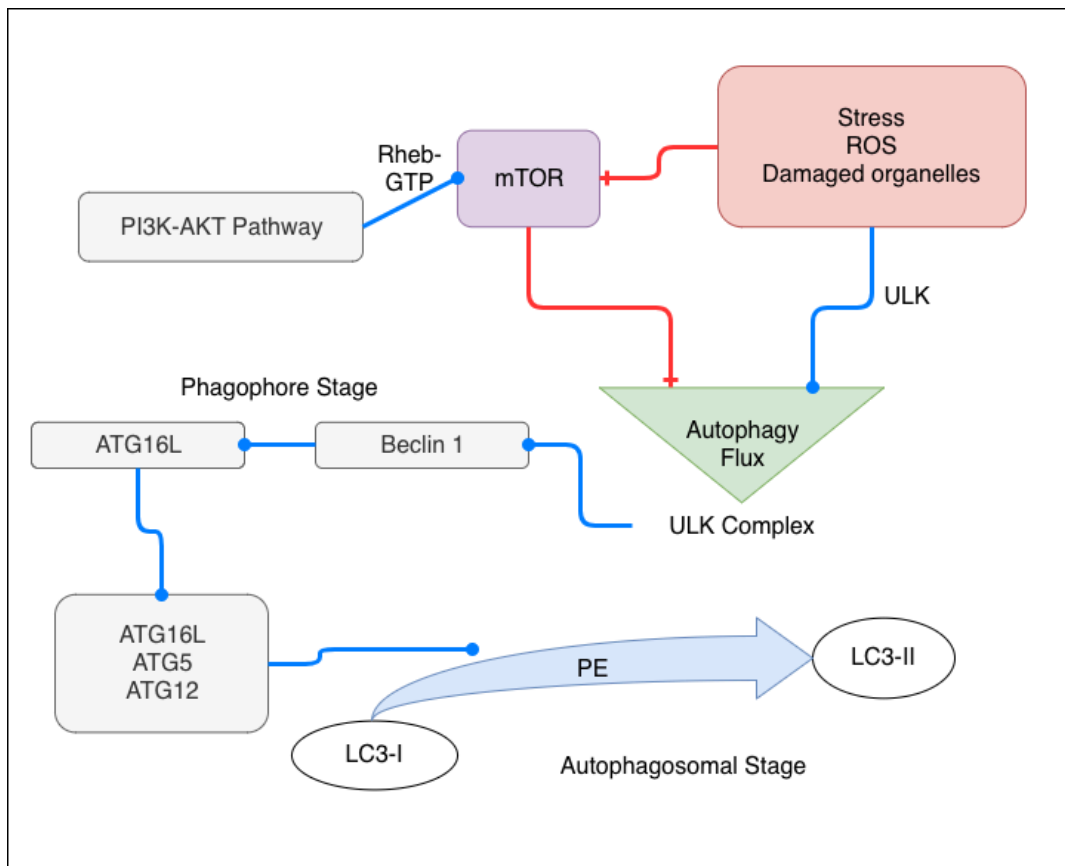


FIGURE 2



SUBMISSION – WORLD NEUROSURGERY

***** Automated email sent by the system *****

Dear Dr. Bruno Saciloto,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: World Neurosurgery

Title: Crosstalk between autophagy and apoptosis in intervertebral disc degeneration

Corresponding Author: Asdrubal Falavigna

Co-Authors: Bruno Saciloto, MD; Manuela P Figueiro, PhD; Natalia F Nicoletti, PhD.

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register

here: <https://ees.elsevier.com/worldneurosurgery/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Bruno&lname=Saciloto&email=brunosaciloto@gmail.com>

Or log

in: <https://ees.elsevier.com/worldneurosurgery/default.asp?acw=&pg=logIn.asp&email=brunosaciloto@gmail.com>

Thank you,

World Neurosurgery

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

É evidente a carência de marcadores biológicos e moleculares que auxiliem no diagnóstico das doenças degenerativas do disco. Considerando que os processos de degeneração celular podem estar envolvidos na progressão da degeneração discal, os marcadores-alvo selecionados neste estudo podem surgir como biomarcadores de avaliação da progressão da DDD da coluna lombar com o intuito de serem aplicados na prática médica. Tal compreensão será necessária para prover um tratamento mais eficaz e direcionado aos pacientes de doença prevalente e de alto impacto econômico-social como a dor lombar.

O seguimento deste trabalho terá como metas: (1) a análise quali-quantitativa do DIV; (2) a mensuração da atividade da caspase 3 (executora); (3) a verificação da caspase 8 e 9 sob citometria de fluxo; (4) a correlação entre os graus de apoptose e densidade de colágeno no disco intervertebral sob citometria de fluxo (item inédito na literatura); e (5) a dosagem de marcadores para autofagia mediada por chaperonas.

ANEXO – PARECER DO CEP



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - RS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação do Grau da Discopatia Degenerativa Lombar com a Genotoxicidade, Apoptose

e Autofagia **Pesquisador:** Asdrubal Falavigna

Area Temática:

Versão: 1

CAAE: 82871617.5.0000.5341

Instituição Proponente: Fundação Universidade de Caxias do Sul - FUCS/RS **Patrocinador**

Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.503.156

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto intitulado Relação do Grau da Discopatia Degenerativa Lombar com a Genotoxicidade, Apoptose e Autofagia. Os pacientes sintomáticos com discopatia degenerativa lombar (DDL) serão avaliados e tratados inicialmente com medicação analgésica e antiinflamatórios, seja por via oral ou infiltração, cuidados posturais, fisioterapia motora e fortalecimento muscular. Não havendo melhora clínica em 2 semanas, os pacientes serão encaminhados para investigação radiológica através de raios-X simples de coluna e RM. A escolha do tratamento cirúrgico será feita unicamente pelo paciente após discussão, com seus familiares e esclarecidas suas dúvidas quanto ao resultado médico. Se a decisão do paciente for realizar a cirurgia, o mesmo será informado sobre o projeto de pesquisa a ser desenvolvido. Os pacientes serão plenamente informados de que o envio do disco intervertebral para análise e estudo da relação da DDL com a genotoxicidade, apoptose e autofagia. Este estudo não irá modificar o procedimento cirúrgico, uma vez que o mesmo é desprezado no lixo hospitalar. Ou seja, o planejamento, a técnica cirúrgica e suas etapas de acompanhamento não mudam com a participação ou não no projeto de pesquisa. Se o paciente estiver participando da pesquisa, partes dos fragmentos do disco retirado no processo cirúrgico para o tratamento do paciente serão armazenados em recipientes específicos contendo: I- PBS 1X (Tampão fosfato alcalino) para a avaliação de danos no DNA (Ensaio Cometa e Micronúcleos), II Formalina 10% tamponada para análise histopatológica e imunohistoquímica e III- Nitrogênio Líquido para a verificação de fragmentação no DNA.

Endereço: FRANCISCO GETULIO VARGAS **Bairro:** PETROPOLIS

UF: RS **Município:** **Telefone:** (54)3218-2829

CEP: 95.070-560

Fax: (54)3218-2100 **E-mail:** cep-ucs@ucs.br

CAXIAS DO SUL



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - RS

Continuação do Parecer: 2.503.156

Todos os recipientes utilizados na coleta serão encaminhados ao Laboratório de Terapia Celular da Universidade de Caxias do Sul para a realização das análises.

Os discos intervertebrais degenerados serão obtidos somente mediante o consentimento e assinatura do TCLE. O estudo contará com a participação de 40 pacientes. O anonimato dos pacientes serão sempre mantidos durante todo o estudo. Esta pesquisa não se trata de um estudo piloto. Foram determinados 40 pacientes, pois esta patologia apresenta 5 graus de degeneração, sendo importante para a presente proposta de pesquisa a correlação dos dados obtidos com os graus de severidade da doença. Cabe ressaltar, que para todos os ensaios avaliados neste estudo haverá representatividade amostral dos distintos graus de degeneração, permitindo a definição dos fatores prognósticos envolvidos na degeneração do disco intervertebral. O grupo controle será feito com a participação de 5 pacientes que tenham indicação cirúrgica para retirada do DIV por outras patologias, que não a degeneração do disco intervertebral. Isto permite gerar evidências comparativas adequadas e correlação estatística na definição da relação da genotoxicidade, autofagia e apoptose na DDL. Dessa forma, cabe salientar, que o disco intervertebral controle negativo da

DDL será proveniente de pacientes com escoliose em que houver a necessidade da retirada do disco intervertebral. Todos esses pacientes possuem indicação cirúrgica para a resolução do seu problema de saúde. É importante salientar que os pacientes que concordarem em doar o disco intervertebral a ser usado na pesquisa como controle negativo da DDL e participar do estudo mediante assinatura e concordância do TCLE, não serão tratados cirurgicamente com o objetivo de realizar a pesquisa. Todos os preceitos éticos já informados acima, serão seguidos também com estes pacientes. Para avaliação histológica, os discos intervertebrais coletados em formalina 10% tamponada (pH7,4) serão enviados diretamente ao Laboratório de Terapia Celular da Universidade de Caxias do Sul onde serão processados e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Masson. Ainda, serão utilizados marcadores imunohistoquímicos para Caspase 3, 8 e 9 (apoptose); LC3A/B, MAP1LC3A, SQSTM1/p62 e Histona H3 (autofagia). Para análise genotóxica serão utilizados o Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste estudo será avaliar através de ensaios de genotoxicidade as células do disco intervertebral e a severidade da DDL, além de, determinar os fatores de autofagia e apoptose relacionados com a patologia e correlacionar todos os resultados obtidos com os dados clínicoradiológicos

Endereço: FRANCISCO GETULIO VARGAS **Bairro:** PETROPOLIS

UF: RS **Município:** **Telefone:** (54)3218-2829

CEP: 95.070-560

Fax: (54)3218-2100 **E-mail:** cep-ucs@ucs.br

CAXIAS DO SUL



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - RS

Continuação do Parecer: 2.503.156

dos pacientes.

Objetivo Secundário:

- Verificar a histopatologia do disco intervertebral degenerado por meio de colorações histológicas.- Determinar danos no DNA do disco intervertebral degenerado pelas técnica do Ensaio Cometa; Micronúcleos e fragmentação de DNA.- Avaliar os eventos de apoptose e autofagia no disco intervertebral degenerado por meio da técnica de imunohistoquímica.- Mensurar a atividade das caspases 3 e 9.- Relacionar os resultados obtidos na avaliação histopatológica, genotóxica, autofágica e apoptótica.- Correlacionar os dados clínicos com as informações radiológicas de raio-X e Ressonância Magnética (RM).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Segundo os Itens II.22 e IV.3.b, da Resolução CNS no 466 de 2012 toda pesquisa apresenta riscos nas dimensões física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano. Além disso, a participação na pesquisa, pode acarretar riscos ligados à manutenção do sigilo e confidencialidade durante a coleta e uso dos dados. Apesar de estes riscos existirem em qualquer pesquisa, os pesquisadores responsáveis pelo

estudo manterão o máximo de sigilo e confidencialidade possível quanto as informações do paciente. A pesquisa será realizada somente com o material do disco intervertebral descartado na cirurgia. Portanto, os riscos que podem vir a existir do processo cirúrgico estão relacionados somente ao tratamento da doença e não a pesquisa proposta.

Benefícios: Através deste estudo poderemos ter benefícios para futuros pacientes com esta patologia: (1) melhor entendimento da doença, de seus possíveis fatores etiológicos e dos mecanismos associados; (2) definição de marcadores prognósticos que possam auxiliar no tratamento da patologia e na definição de fatores degenerativos; e (3) determinação de aspectos relevantes da biologia da DDL em futuras pesquisas aplicadas que possam

contribuir com os aspectos terapêuticos da doença. Os benefícios obtidos na presente pesquisa auxiliarão futuros pacientes a terem menos sofrimento físico, psicológico e social.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem desenhada e que cumpre os preceitos éticos de proteção ao participante do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto assinada pelo Prof. Dagoberto Godoy. TCLE adequado. Consentimento da entidade

Endereço: FRANCISCO GETULIO VARGAS **Bairro:** PETROPOLIS

UF: RS **Município:** **Telefone:** (54)3218-2829

CEP: 95.070-560

Fax: (54)3218-2100 **E-mail:** cep-ucs@ucs.br

CAXIAS DO SUL



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - RS

Continuação do Parecer: 2.503.156

Hospital Saúde assinada pelo diretor técnico.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul, de acordo com as atribuições definidas nas Resoluções CNS 466/12 e CNS 510/16, aprova o projeto para dar início à pesquisa.

E dever do CEP acompanhar o desenvolvimento da pesquisa, por meio de relatórios parciais e final. Solicitamos que os relatórios contemplem o andamento da pesquisa, as modificações de protocolo, cancelamento, encerramento, publicações decorrentes da pesquisa e outras informações pertinentes. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e as suas justificativas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1051799.pdf	21/12/2017 14:24:24		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Saude_PDF.pdf	21/12/2017 14:19:50	Asdrubal Falavigna	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Autofagia_Apoptose_IDD.docx	21/12/2017 14:19:41	Asdrubal Falavigna	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PB_Autofagia_Apoptose_IDD.docx	21/12/2017 14:19:20	Asdrubal Falavigna	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	21/12/2017 14:16:31	Asdrubal Falavigna	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: FRANCISCO GETULIO VARGAS Bairro: PETROPOLIS

UF: RS Município: Telefone: (54)3218-2829

CEP: 95.070-560

Fax: (54)3218-2100 E-mail: cep-ucs@ucs.br

CAXIAS DO SUL



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - RS

Continuação do Parecer: 2.503.156

CAXIAS DO SUL, 20 de Fevereiro de 2018

Assinado por:

Luciane Andreia Bizzi (Coordenador)

Endereço: FRANCISCO GETULIO VARGAS **Bairro:** PETROPOLIS

UF: RS **Município:** **Telefone:** (54)3218-2829

CEP: 95.070-560

Fax: (54)3218-2100 **E-mail:** cep-ucs@ucs.br

CAXIAS DO SUL

UNIVERSIDADE DE CAXIAS
DO SUL - RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação do Grau da Discopatia Degenerativa Lombar com a Genotoxicidade, Apoptose e Autofagia

Pesquisador: Asdrubal Falavigna

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 82871617.5.0000.5341

Instituição Proponente: Fundação Universidade de Caxias do Sul - FUCS/RS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.503.156

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto intitulado Relação do Grau da Discopatia Degenerativa Lombar com a Genotoxicidade, Apoptose e Autofagia. Os pacientes sintomáticos com discopatia degenerativa lombar (DDL) serão avaliados e tratados inicialmente com medicação analgésica e antiinflamatórios, seja por via oral ou infiltração, cuidados posturais, fisioterapia motora e fortalecimento muscular. Não havendo melhora clínica em 2 semanas, os pacientes serão encaminhados para investigação radiológica através de raios-X simples de coluna e RM. A escolha do tratamento cirúrgico será feita unicamente pelo paciente após discussão, com seus familiares e esclarecidas suas dúvidas quanto ao resultado médico. Se a decisão do paciente for realizar a cirurgia, o mesmo será informado sobre o projeto de pesquisa a ser desenvolvido. Os pacientes serão plenamente informados de que o envio do disco intervertebral para análise e estudo da relação da DDL com a genotoxicidade, apoptose e autofagia. Este estudo não irá modificar o procedimento cirúrgico, uma vez que o mesmo é desprezado no lixo hospitalar. Ou seja, o planejamento, a técnica cirúrgica e suas etapas de acompanhamento não mudam com a participação ou não no projeto de pesquisa. Se o paciente estiver participando da pesquisa, partes dos fragmentos do disco retirado no processo cirúrgico para o tratamento do paciente serão armazenados em recipientes específicos contendo: I- PBS 1X (Tampão fosfato alcalino) para a avaliação de danos no DNA (Ensaio Cometa e Micronúcleos), II Formalina 10% tamponada para análise histopatológica e imunohistoquímica e III- Nitrogênio Líquido para a verificação de fragmentação no DNA.

Endereço: FRANCISCO GETULIO VARGAS
Bairro: PETROPOLIS **CEP:** 95.070-560
UF: RS **Município:** CAXIAS DO SUL
Telefone: (54)3218-2829 **Fax:** (54)3218-2100 **E-mail:** cep-ucs@ucs.br