

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**RODRIGO CALDONAZZO FÁVARO**

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA CELULAR MONONUCLEAR SOBRE A  
DEGENERAÇÃO DISCAL EM COELHOS**

**CURITIBA**

**2016**

**RODRIGO CALDONAZZO FÁVARO**

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA CELULAR MONONUCLEAR SOBRE A  
DEGENERAÇÃO DISCAL EM COELHOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa  
Co-orientador: Emiliano Neves Vialle

**CURITIBA**

**2016**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

F272i  
2016 Fávoro, Rodrigo Caldonazzo  
Influência da terapia celular mononuclear sobre a degeneração discal em coelhos / Rodrigo Caldonazzo Fávoro ; orientador: Francisco Diniz Affonso da Costa ; co-orientador: Emiliano Neves Vialle. – 2016.  
96 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2016

Bibliografia: f. 73-86

1. Colágeno. 2. Disco intervertebral. 3. Terapia baseada em transplantes de células e tecidos. 4. Histologia. I. Costa, Francisco Diniz Affonso da. II. Vialle, Emiliano Neves. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 22. ed. – 616.77



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Escola de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - *Stricto Sensu*

PUCPR

GRUPO MARISTA

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos vinte e um dia do mês de junho de 2016, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, “**INFLUÊNCIA DA TERAPIA MONONUCLEAR SOBRE A DEGENERAÇÃO DISCAL EM COELHOS**” apresentado por **RODRIGO CALDONAZZO FÁVARO** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Emiliano Neves Vialle – Presidente – Coorientador (HUC)	
Prof. Dr. Luis Roberto Gomes Vialle (PUCPR)	
Prof. Dr. Marcelo Abagge (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Emiliano Neves Vialle – Presidente –  
Coorientador (HUC)

Prof. Dr. Luis Roberto Gomes Vialle (PUCPR)

Prof. Dra. Marcelo Abagge (UFPR)

Conceito:

Aprovado

Conceito:

Aprovado

Parecer Final:

Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

Aprovado, desde que sejam feitas  
as modificações sugeridas pela  
Banca Examinadora.

Prof. Dr. Emiliano Neves Vialle  
Presidente - Coorientador da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Flávio Silva Pecoits -Filho  
Coordenador do PPGCS PUCPR

## **AGRADECIMENTOS**

Ao PROF. DR. FRANCISCO DINIZ AFFONSO DA COSTA, que me aceitou neste projeto e me manteve sob suas orientações durante o processo de estruturação desta tese.

Ao DR. EMILIANO NEVES VIALLE, que apoiou a estruturação deste modelo de pesquisa e prestou suporte na edição da tese.

Ao DR. ANDRE ARRUDA, que durante sua formação médica e de residência médica em ortopedia, conduziu juntamente com o Dr. Emiliano outros trabalhos nesta linha de pesquisa, prestando contribuição nas práticas cirúrgicas e de histologia deste estudo.

À PROFA. DRA. LUCIA DE NORONHA, que orientou o arsenal histológico para que fosse possível o desenrolar desta pesquisa.

Ao DR. JULIO FRANCISCO, que conduziu a equipe que trabalhou no preparo celular que tornou viável esta pesquisa.

Ao funcionário do laboratório de patologia SEIGO NAGASHIMA, que me ensinou a manusear os programas de computador necessários para a análise desta pesquisa.

À minha esposa, CAROLINE SGANZERLA FÁVARO, pela compreensão e suporte dispendidos nos momentos em que escolhi dedicar meu tempo para a execução deste projeto.

Aos meus pais, SÉRGIO TRAGUETA FÁVARO e MARIA TEREZA CALDONAZZO FÁVARO, pelo exemplo, amor e educação que me deram, sem nunca pedir nada em troca.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A degeneração discal associada a dor lombar tem importante impacto financeiro em nossa sociedade, tanto pelos custos em diagnóstico e tratamento, quanto pela limitação laboral que gera. Seu tratamento é desafiador, e na maioria das vezes não visa controlar ou modular o processo degenerativo, limitando-se a remover ou imobilizar a fonte da dor. O desenvolvimento de terapias celulares busca preencher esta lacuna terapêutica e reduzir a agressividade dos tratamentos cirúrgicos atuais. **OBJETIVOS:** Analisar as alterações histológicas do colágeno no ânulo fibroso após lesão experimental padronizada, e avaliar a influência da injeção de células mononucleares autólogas sobre estas alterações. **MÉTODOS:** 32 coelhos New Zealand foram submetidos a punção dos discos intervertebrais lombares seguida da injeção intradiscal de células mononucleares provenientes da crista ilíaca versus injeção de solução salina nos seguintes períodos de tempo: dois meses após a lesão (CT2M e SS2M), duas semanas (CT2S e SS2S), imediatamente após a lesão (CTCP e SSCP) e sem induzir a degeneração (CTSP e SSSP). Após dois meses da intervenção proposta para cada grupo, os animais foram submetidos a eutanásia e as alterações do colágeno nos discos intervertebrais avaliadas histologicamente no ânulo fibroso como um todo (AF) e separadamente em suas camadas: A camada externa do ânulo fibroso (CEAF) e a camada interna do ânulo fibroso (CIAF). Vinte e seis coelhos (seis óbitos) com 72 discos intervenção e 115 discos controle foram analisados. **RESULTADOS:** Quando comparamos os grupos de CT aos seus pares de SS notamos que no AF houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,025$ ). Esta diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (76,1%) comparado ao CT2S (53,32%). Analisando as camadas separadamente na CEAF houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,018$ ). Novamente, esta diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (56,7%) comparado ao CT2S (13,28%). Na CIAF não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. **CONCLUSÃO:** O colágeno do tipo III é comum no ânulo fibroso e é mais abundante na CEAF do que o colágeno do tipo I. A diminuição do colágeno do tipo III associada ao aumento de colágeno do tipo I na CEAF são fatores determinantes de degeneração discal. O procedimento de injeção de células mononucleares é seguro, reprodutível e é capaz de reduzir as alterações na distribuição do colágeno do tipo I e III no AF de discos degenerados se aplicado até 2 semanas após a indução da degeneração.

**Palavras-chave:** Colágeno. Disco intervertebral. Terapia celular. Histologia. Coelho.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Lumbar disc degeneration and its related low back pain have significant financial impact on our society, both the costs in diagnosis and treatment, as the labor limitation it generates. Treatment is challenging, and most often does not seek to control or modulate the degenerative process, merely to remove or immobilize the source of the pain. The development of cell therapies seeks to fill this treatment gap and reduce the aggressiveness of current surgical treatments.

**OBJECTIVES:** To evaluate the histological changes of collagen in the anulus fibrosus after patterned experimental injury and evaluate the influence of autologous mononuclear cells injection on these.

**METHODS:** 32 New Zealand rabbits were subjected to lumbar intervertebral disc puncture followed by intradisc injection of mononuclear cells from iliac crest versus saline injection in the following time periods: two months after injury (CT2M and SS2M), two weeks (CT2S and SS2S), immediately after injury (CTCP and SSCP) and without inducing degeneration (CTSP and SSSP). After two months of cell therapy the animals were euthanized and collagen changes in the intervertebral discs evaluated histologically in the fibrous annulus as a whole (AF) and separately in its layers: The outer layer of fibrous annulus (CEAF) and the inner layer the fibrous annulus (CIAF). Twenty-six rabbits (six deaths) with 72 disks intervention and 115 control records were analyzed.

**RESULTS:** Comparing the CT groups to their SS peers, we noted that into AF there was a statistically significant difference between the CT2S and SS2S groups ( $p = 0.025$ ). This difference was due to an increase in type I collagen in SS2S group (76.1%) compared to CT2S (53.32%). Analyzing the layers separately in CEAF there was a statistically significant difference between the CT2S and SS2S groups ( $p = 0.018$ ). Again, this difference resulted from an increase in type I collagen in SS2S group (56.7%) compared to CT2S (13.28%). In CIAF there was no statistically significant difference between groups.

**CONCLUSION:** Collagen Type III is common in the fibrous annulus and it is more abundant in CEAF than collagen type I. The reduction of type III associated with increased collagen type I collagen in CEAF are determining factors of disc degeneration. The mononuclear cell injection procedure is safe, reproducible and it is capable of reducing changes in collagen type I and III distribution of degenerated discs AF if applied up to 2 weeks after the induction of degeneration.

**Key-words:** Collagen. Intervertebral disc. Cell and Tissue-Based Therapy. Histology. Rabbit.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Preparo Cirúrgico .....	40
Figura 2 – Preparo da agulha para executar a punção .....	41
Figura 3 – Exposição dos discos e punção.....	41
Figura 4 – Coleta da coluna vertebral. ....	45
Figura 5 – Preparo histológico.....	46
Figura 6 – Ferramenta DinoCapture.....	47
Figura 7 – Ferramenta Image Pro Plus. ....	48



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição percentual do colágeno no ânulo fibroso Grupo Controle. ...	49
Gráfico 2 – Comparação percentual da distribuição do colágeno na camada interna do ânulo fibroso (CIAF) entre os diferentes grupos injetados com Células Tronco e o Grupo Controle.....	52
Gráfico 3 – Comparação percentual da distribuição do colágeno na camada externa do ânulo fibroso (CEAF) entre os diferentes grupos injetados com Células Tronco e o Grupo Controle.....	53
Gráfico 4 – Comparação percentual da distribuição do colágeno no ânulo fibroso (AF) entre os diferentes grupos injetados com Células Tronco e o Grupo Controle. ....	54
Gráfico 5 – Comparação percentual da distribuição do colágeno na camada interna do ânulo fibroso (CIAF) entre os diferentes grupos injetados com Solução Salina e o Grupo Controle.....	56
Gráfico 6 – Comparação percentual da distribuição do colágeno na camada externa do ânulo fibroso (CEAF) entre os diferentes grupos injetados com Solução Salina e o Grupo Controle.....	58
Gráfico 7 – Comparação percentual da distribuição do colágeno no ânulo fibroso (AF) como um todo entre os diferentes grupos injetados com Solução Salina e o Grupo Controle.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos Experimentais usando terapias baseadas em células no tratamento da degeneração discal. ....	30
Tabela 2 – Estudos Clínicos usando terapias baseadas em células no tratamento da degeneração discal. ....	36
Tabela 3 – Distribuição dos coelhos nos Grupos injetados com células Tronco. ....	44
Tabela 4 – Distribuição dos coelhos nos Grupos injetados com Solução Salina. ....	44
Tabela 5 – Comparação entre os grupos injetados com células tronco e o grupo controle. ....	50
Tabela 6 – Diferença estatisticamente significativa entre os grupos na CIAF. ....	51
Tabela 7 – Comparação entre os grupos injetados com células tronco e o grupo controle. ....	55
Tabela 8 – Diferença estatisticamente significativa entre os grupos Solução Salina e Controle na CEAF e no AF. ....	57
Tabela 9 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco e os grupos definidos pelo uso da solução salina na CIAF. ....	60
Tabela 10 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco e os grupos definidos pelo uso da solução salina na CEAF. ....	60
Tabela 11 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco e os grupos definidos pelo uso da solução salina no AF. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEDTA	Ácido EtilenoDiamino Tetra-Acético
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
AF	Ânulo Fibroso
ARN-m	Ácido RiboNucleico Mensageiro
CCI-5	Citocina Inflamatória 5
CEAF	Camada Externa do Ânulo Fibroso
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIAF	Camada Interna do Ânulo Fibroso
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclo-Oxigenase
CT	Células Tronco
CT2M	Grupo Células Tronco injetadas dois Meses após a punção
CT2S	Grupo Células Tronco injetadas duas Semanas após a punção
CTCP	Grupo Células Tronco injetadas concomitante com a punção
CTM	Células Tronco Mesenquimais
CTM-MO	Células Tronco Mesenquimais derivadas da Medula Óssea
CTM-TA	Células Tronco Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo
CTSP	Grupo Células Tronco injetadas em discos que não foram puncionados
DG2+	receptor DisialoGangliosidio 2 positivo
DIV	Disco Intervertebral
ESTRO	Antígeno Celular Estromal
FCD-5	Fator de Crescimento e Diferenciação 5
FCE-1	Fator de Crescimento Epitelial tipo 1
FCI-1	Fator de Crescimento Semelhante à insulina do tipo 1
FNT	Fator de Necrose Tumoral
FTC-β	Fator Transformador de Crescimento Beta
GAG	Glicosaminoglicanos
HE	Hematoxilina – Eosina
IL	Interleucina
ITMPS	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases
LP	Lisato Plaquetário

MACV-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1
MEMD	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
MMPS	Matriz Metaloproteinases
MPST	Metaloproteinases com Modificadores de Trombospondina
NP	Núcleo Pulposo
POM	Proteína Óssea Morfogênica
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
PV	Placa Vertebral
RM	Ressonância Magnética
RX	Radiografias
SS2M	Grupo Solução Salina injetada dois Meses após a punção
SS2S	Grupo Solução Salina injetada duas semanas após a punção
SBF	Soro Bovino Fetal
SSCP	Grupo Solução Salina injetada concomitante com a punção
SSSP	Grupo Solução Salina injetada em discos que não foram puncionados
Tiq2+	receptor de Tirosina Quinase 2 Positivo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
3.1	ANATOMIA .....	17
3.2	HISTOLOGIA DO DISCO INTERVERTEBRAL NORMAL E DEGENERADO ..	17
<b>3.2.1</b>	<b>O Disco Normal</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2.2</b>	<b>O Disco Degenerado</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.3</b>	<b>O Colágeno na Degeneração Discal</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Avaliação do Colágeno na Degeneração Discal</b> .....	<b>21</b>
3.3	MODELOS DE ESTUDO DA DEGENERAÇÃO DISCAL .....	22
3.4	TRATAMENTOS ATUAIS DA DEGENERAÇÃO DISCAL .....	23
<b>3.4.1</b>	<b>Tratamento conservador e cirúrgico</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Tratamento com terapias regenerativas</b> .....	<b>24</b>
3.5	TIPOS DE TERAPIAS CELULARES PARA REGENERAÇÃO DISCAL .....	26
<b>3.5.1</b>	<b>Estudos Experimentais</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Estudos Clínicos</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	ANIMAL .....	39
4.2	ANESTESIA .....	39
4.3	ABORDAGEM CIRÚRGICA .....	40
4.4	OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO .....	41
4.5	INJEÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO / PLACEBO (SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA) .....	42
4.6	DELINEAMENTO DOS GRUPOS .....	43
4.7	EUTANÁSIA .....	45
4.8	ANÁLISE HISTOLÓGICA E CITOLÓGICA .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
5.1	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DEFINIDOS PELO USO DAS CÉLULAS TRONCO E O GRUPO CONTROLE .....	49
5.2	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DEFINIDOS PELO USO DA SOLUÇÃO SALINA E O GRUPO CONTROLE .....	54
5.3	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DEFINIDOS PELO USO DAS	

	CÉLULAS TRONCO E OS GRUPOS DEFINIDOS PELO USO DA SOLUÇÃO SALINA.....	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
6.1	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO COLÁGENO NO ÂNULO FIBROSO APÓS LESÃO EXPERIMENTAL.....	67
6.2	ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA INJEÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS SOBRE ESTAS ALTERAÇÕES.....	68
6.2.1	<b>Comparação entre os grupos definidos pelo uso da solução salina entre si e com o grupo controle.....</b>	<b>68</b>
6.2.2	<b>Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco entre si e com o grupo controle.....</b>	<b>69</b>
6.2.3	<b>Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco entre si e com o grupo controle.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
	<b>ANEXO A – PRÊMIOS E TÍTULOS DESTA LINHA DE PESQUISA .....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A degeneração discal faz parte do processo de envelhecimento e compreende a perda das características estruturais, biológicas e bioquímicas do disco intervertebral (DIV) (1). Caracteriza-se pela apresentação de células disfuncionais e um decréscimo dos seus componentes intracelulares, levando à perda gradual de fluido intradiscal (2). Isto acarreta uma desidratação discal que inclui uma cascata de fatores que podem levar a sintomas e limitação funcional. O principal sintoma da degeneração discal sintomática é a dor lombar crônica (3).

A etiologia da degeneração discal é multifatorial e tanto fatores ambientais quanto constitucionais exercem papéis com variáveis graus de importância (4). Fatores como esforço físico, má postura, obesidade, ocupação, cigarro, álcool e diabetes estão envolvidos na etiologia da degeneração discal sintomática (5).

Dados de estudos recentes apontam que a degeneração discal é praticamente onipresente e, aumenta com a idade, com a prevalência de 70% na faixa etária até 50 anos, e mais de 90% naqueles com idade superior a 50 anos (6). A dor lombar é a segunda maior causa de consulta médica nos Estados Unidos. Em todo o mundo, cerca de 60 a 80% das pessoas terão dor lombar durante a vida. Ela acomete principalmente indivíduos entre a terceira e quinta décadas de vida (7) - parcela que representa a maior parte da população economicamente ativa das sociedades, gerando diversas consequências sociais.

Segundo dados americanos, 20 bilhões de dólares ao ano são gastos em custos diretos para tratamento da dor lombar crônica; somados às despesas indiretas, esse valor ultrapassa os 100 bilhões de dólares (8). A dor lombar e a dor cervical são a primeira e a quarta causas, respectivamente, de invalidez nos Estados Unidos (9).

Quanto a patogênese da degeneração discal, acredita-se que o núcleo pulposos (NP) é requerido na geração e manutenção da integridade estrutural do disco e é a primeira estrutura a ser afetada durante a degeneração. Sua degeneração está caracterizada por um desequilíbrio gerido por suas células, na proporção de síntese e degradação de sua matriz (10). Em uma visão geral, estas mudanças da matriz levam a uma redução da pressão osmótica, diminuição da hidratação, e finalmente disfunção mecânica. Eventualmente o NP perde sua habilidade de distribuir as forças compressivas entre os discos vertebrais, que são

transferidas de uma maneira não uniforme ao ânulo fibroso (AF) gerando áreas de aumento de pressão e risco de micro-trauma. Estas alterações na distribuição de forças e micro-traumas resultam em lesões no AF e culminam com perda da altura do disco (11). Nos estágios avançados da degeneração, o NP pode extravasar pelo AF gerando uma hérnia discal. O processo de reparação, na maioria das vezes insuficiente, cursa com inflamação, neovascularização e proliferação de terminações nervosas, todos esses associados a dor lombar (12). A degeneração do DIV não impacta apenas em seu tecido, mas também nas estruturas anatômicas ao seu redor como as facetas, raízes nervosas, músculos e ligamentos levando a dor lombar (13).

A fim de amenizar esse quadro alarmante, diversas estratégias terapêuticas têm sido tentadas, incluindo desde modalidades não invasivas - como medicação antiinflamatória e fisioterapia - até procedimentos cirúrgicos, como artrodese, terapia intradiscal eletrotérmica e substituição total do disco (7). Entretanto, todos esses métodos apresentam eficácia limitada por não gerarem melhoras expressivas nem provocarem uma volta ao estado não patológico do disco e estruturas adjacentes. Isso ocorre porque os meios terapêuticos atuais direcionam-se ao tratamento dos sintomas e não à interrupção e/ou recuperação do processo degenerativo (7). Como alternativas de aplicação de novas tecnologias, diversos modelos biológicos de tratamento têm sido propostos. Através do uso de elementos celulares, propõe-se a atuação direta na modulação do processo degenerativo, por meio da introdução de células potencialmente capazes de reconstruir o tecido lesado (14), permitindo que o processo de envelhecimento ocorra de modo gradual e com sintomas reduzidos ou ausentes.

Ao analisarmos detalhadamente os modelos experimentais atuais para terapia celular em discos intervertebrais apresentam falta de uniformidade dos procedimentos e ausência de dados. Além disso, são escassos os estudos que objetivam a investigação do potencial efeito terapêutico das células-tronco autólogas mononucleares. Sendo assim, a partir de um modelo animal previamente estudado e validado nessa Instituição de Ensino (15), pretende-se verificar o possível potencial terapêutico das células-tronco mononucleares na Doença Degenerativa Discal. Partindo-se do pressuposto de que cerca de 0,01% a 0,05% do aspirado da medula óssea é composto de células tronco mesenquimais (CTM) (16) e que, o transplante de células mononucleares não necessita obrigatoriamente de cultura celular – simplificando o processo –, busca-se uma possível alteração no desenvolvimento



patofisiológico através da terapêutica celular autóloga sem replicação celular e prováveis modificações das características celulares que ocorreriam através do meio de cultura. Além disso, através desse projeto de pesquisa, aborda-se o tempo ideal para transplante celular após a indução de degeneração discal, analisando em série e em diferentes grupos.

## 2 OBJETIVOS

São objetivos desta pesquisa:

- a) analisar as alterações histológicas do colágeno no ânulo fibroso do disco intervertebral após lesão experimental;
- b) avaliar a influência da injeção de células mononucleares autólogas sobre estas alterações.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 ANATOMIA**

O DIV humano é uma estrutura articular muito complexa que, macroscopicamente, pode ser dividida em três componentes distintos: 1) O NP representando a massa homogênea gelatinosa localizada no centro do disco; 2) O AF consistindo das camadas de fibras de colágeno concêntricas que circundam o NP e; 3) as placas vertebrais (PV) que separam o NP e AF das vértebras adjacentes (17).

O DIV é considerado o maior tecido avascular do corpo humano, o que é um fator determinante em suas funções metabólicas. A principal fonte de nutrição do disco provém da pobre vascularização através da PV e, por isso, ele apresenta uma adaptação anaeróbica de seu metabolismo devido a sua baixa oxigenação (18).

#### **3.2 HISTOLOGIA DO DISCO INTERVERTEBRAL NORMAL E DEGENERADO**

É de suma importância para os objetivos deste projeto o entendimento da degeneração discal macroscopicamente e, principalmente, ao nível histológico, enfatizando o papel do colágeno neste processo.

##### **3.2.1 O Disco Normal**

O DIV de um adulto consiste de uma grande quantidade de matriz extracelular com uma pequena quantidade de células que correspondem a aproximadamente 1% do seu volume. Estas células parecem ser parte de duas populações fenotípicas diferentes (19): as células do AF e da PV são mais alongadas e se parecem com fibroblastos, enquanto as do NP são mais arredondadas ou ovaladas e parecem mais com condrócitos, podendo apresentar uma cápsula ao seu redor (20). Estas duas populações comportam-se de maneira distinta, tanto na maneira como respondem a cargas aplicadas a elas quanto na matriz molecular que sintetizam quando crescem em culturas. As células do NP geralmente produzem apenas colágeno do tipo II enquanto as células do AF produzem colágeno do tipo I e do tipo II (19).

Os discos humanos têm entre 15 e 25 lamelas no ânulo. No início da vida humana elas aparecem como discretas bandas de fibras de colágeno. No entanto, com o passar dos anos, elas aumentam sua complexidade com mais bifurcações e interdigitações, e cada lamela aumenta em largura. Sob a perspectiva da luz polarizada, podemos observar claramente a orientação das bandas de colágeno (21).

A análise bioquímica do disco pode identificar os componentes moleculares e, de uma maneira grosseira, quantificá-los. No entanto, existe uma grande variação na distribuição de muitos desses componentes de acordo com a localização do disco e a extensão de cada um só torna-se aparente com técnicas histoquímicas, imunohistoquímicas ou de microscopia eletrônica. A elastina constitui apenas 2% do peso de um AF seco, sugerindo que não seja o seu maior componente isolado. No entanto, ela pode contribuir muito no funcionamento do disco por causa de sua localização específica discreta no disco normal, basicamente entre as lamelas, com poucas fibras cruzando perpendicularmente (22).

Vários tipos de colágeno demonstram preferência de localização em certos lugares do DIV. Os colágenos do tipo III e VI são encontrados predominantemente próximos das células discais, isso parece refletir sua função no disco (23,24).

Nervos e vasos sanguíneos têm presença limitada nos discos de adultos saudáveis, estando restritos aos poucos milímetros externos do AF. Um pequeno número de mecanorreceptores também está presente, mais comumente com uma morfologia de complexos de Golgi e alguns receptores de Ruffini e ainda, raros corpúsculos de Pacini (25).

### **3.2.2 O Disco Degenerado**

A maioria das mudanças relacionadas a idade na PV e no DIV ocorrem ao final da primeira década de vida. Mesmo antes disso, nos primeiros 2 anos de vida, algumas mudanças microscópicas são vistas, incluindo diminuição da proliferação das células do NP, formação de fissuras, alterações na densidade celular e degeneração da matriz na PV (17). Isso coincide ou pode resultar da diminuição de vasos sanguíneos no AF, nas vertebras e nas PVs. O número de vasos sanguíneos que perfuram o osso e as PVs diminui drasticamente entre o sexto e o trigésimo meses de vida (26).

Boos descreveu essas mudanças progressivas em detalhes e criou um sistema de classificação. As mudanças incluem um aumento no número e extensão das fissuras e lesões, presença de material granular e neovascularização do aspecto externo do AF (17). Proliferação celular, formação de “cluster” e aumento da morte celular também ocorrem (27), possivelmente por apoptose e necrose (28). A perda de demarcação entre o ânulo e o núcleo também aumenta com a idade, a partir da segunda década. Outras lesões da PV incluindo fraturas, afinamento, alteração da densidade celular, microfraturas no osso subcondral adjacente e esclerose óssea também ocorrem com o envelhecimento. Essas mudanças da PV precedem as do NP, com alterações no AF (particularmente na região externa).

Ainda que a degeneração não seja completamente compreendida, é sabido que ela é gerida por células. No nível celular existe uma mudança no número de células que inicialmente aumentam (possivelmente na tentativa de regenerar o tecido) e depois diminuem, respectivamente nas fases iniciais e tardias dos estágios de degeneração (29).

Também são vistas mudanças ao nível molecular, existe um aumento de citocinas pro-inflamatórias, incluindo interleucina (IL)-1 $\beta$ , -6, fator de necrose tumoral (FNT)- $\alpha$  e prostaglandina E2 produzidas pelas células discais (30,31). Isto acontece sem um contrabalanço de antagonistas de citocinas e leva a aumento da resposta inflamatória e catabolismo da matriz (32). Este aumento de citocinas estimula a expressão de enzimas degradadoras de matriz, conhecidas por matriz metaloproteinases (MMPS), desintegrinas e metaloproteinases com modificadores de trombospondina (MPSTs). Expressão aumentada de MMPS -1,-3,-7,-9,-10 (33), -13, e MPSTs -1,4,-5,9, e -15 tem sido descritas na degeneração do DIV, predominantemente no NP (30). Crucialmente, este aumento na expressão de enzimas degradadoras ocorre sem um aumento concomitante de seus inibidores endógenos, inibidor tecidual de metaloproteinases (ITMPS), resultando em níveis elevados de enzimas ativadas que degradam os componentes da matriz extracelular. Ao lado dessas mudanças catabólicas, o excesso de citocinas dentro do disco, particularmente IL-1, altera a expressão de genes anabólicos e proteínas da matriz (30). Isto inclui a diminuição da síntese de agregans no NP e a mudança na expressão do colágeno de tipo II para tipo I (30). Esta mudança na composição da matriz, em particular a perda de agregan, resulta em redução da osmolaridade, levando a desidratação do NP (34). Assim que a pressão hidrostática dentro do NP é

perdida, ocorre uma distribuição anormal de cargas com grande carga sobre o AF (35). Estes acometimentos estruturais e mecânicos podem potencialmente levar a micro-traumas e herniação do tecido do NP através do AF lesado (36).

Diferentes tipos de moléculas estruturais da matriz podem ser produzidos como o colágeno do tipo I, III, VI e X, elastina, fibronectina, amiloide, ou sua distribuição pode ser alterada (22,23,37-39). Os glicosaminoglicanos (GAG) estão reduzidos na degeneração discal como foi demonstrado por coloração com corantes metacromáticos (ex. toluidina). O NP transforma-se de uma estrutura gelatinosa para uma textura mais fibrosa. A relação proteoglicanos/colágeno (mensurada pela relação GAG/hidroxiprolina) é maior em paciente com discos Grau II de Thompson (23:1) e menor naqueles discos Thompson Grau IV (5:1) (40).

Com o avanço da degeneração, mudanças na matriz estrutural incluindo desorganização e fissuras lamelares figuram nos discos degenerados assim como o neocrescimento de vasos sanguíneos e fibras nervosas nociceptivas dentro de um disco normalmente avascular através do AF em direção ao NP, permitindo respectivamente a infiltração de células imunes e resultando em dor (3,12,41,42).

Uma vez que essas mudanças são similares as que ocorrem com o envelhecimento, existe uma dificuldade em diferenciar a degeneração discal que ocorre fisiologicamente no envelhecimento da degeneração que ocorre como processo patológico (17).

Parte dos pesquisadores sugerem que essas mudanças mórbidas são simplesmente a aparição precoce do processo de envelhecimento provocados pela tensão funcional severa, sendo que nenhuma alteração morfológica microscópica pode ser identificada exclusivamente na degeneração ou no processo natural de envelhecimento (43). Já macroscopicamente, a redução na altura do disco pode figurar apenas no disco degenerado e não no envelhecido (44).

### **3.2.3 O Colágeno na Degeneração Discal**

Pouco sabe-se sobre a variação do colágeno no envelhecimento natural e na degeneração discal. O disco degenerado apresenta mais colágeno em detrimento de proteoglicanos. O Colágeno tipo I é mais frequente no NP de idosos o que sugere tecido cicatricial. Já o colágeno do tipo II diminui na PV com o envelhecimento (45). Usando imunocoloração para ácido ribonucleico mensageiro (ARN-m) de colágeno

tipo II em um modelo de coelhos, Takaishi et al, demonstrou um aumento da expressão do colágeno tipo II na região onde foi induzido a herniação discal a partir da 4 semana da indução da degeneração. O autor sugere que o colágeno do tipo II está ligado com o processo de regeneração discal aparece no AF quando este é rompido (46).

Colunas com doenças deformantes como escoliose e cifose apresentam maiores mudanças no processo de “*turn over*” do colágeno em diferentes localizações dos discos. Ocorre uma mudança no tipo de colágeno produzido. O colágeno do tipo I está mais presente enquanto colágenos do tipo III, VI, IX e X estão menos presentes que o usual. A remodelação grosseira das bandas de colágenos das lamelas anulares também ocorrem. A rede de fibras elásticas, que é organizada entre as lamelas no disco normal é muito esparsa e desorganizada nos discos escolióticos (22).

### **3.2.4 Avaliação do Colágeno na Degeneração Discal**

Na tentativa de entender histologicamente o papel do colágeno no disco sadio e degenerado, dois métodos destacam-se na literatura, a avaliação imunohistoquímica e a coloração por *sirius red*.

Na avaliação por imunohistoquímica as células são marcadas por um ou mais anticorpos que identifique a célula, estrutura ou molécula que deseja-se estudar. Esta avaliação tem como vantagem principal a especificidade, no entanto ainda é um método caro.

O *sirius red* foi introduzido à técnica histológica em 1964, na tentativa de substituir o método de Van Gienson para corar definitivamente o colágeno (47). Quatro anos mais tarde, verificou-se que sua coloração aumentava a birrefringência das fibras de colágeno (48). Ainda que outros métodos como o de Van Gienson, Mallory e Masson fossem capazes de corar o colágeno e diferenciá-lo das fibras musculares, os tipos de colágeno não podem ser distinguidos por estas técnicas (49).

O colágeno quando em contato com o *sirius red* tem sua birrefringência aumentada e, de acordo com a grossura da fibra e sua organização, é possível identificar os tipos de colágeno pela cor e padrão de distribuição. Desta maneira, o colágeno do tipo I forma fibras largas, composto de fibrilas largas justapostas e,

consequentemente, apresentam intensa birrefringência nas cores amarelo brilhante, alaranjado ou vermelho. O colágeno do tipo III forma fina fibras composta de fibrilas finas dispostas frouxamente o que confere-lhe uma fraca birrefringência da cor verde. O colágeno do tipo II não forma fibras e suas fibrilas muito finas são dispostas como uma malha solta que interage com a substância de seu substrato. Este contato físico apresenta uma fraca birrefringência, que varia de acordo com o substrato, do amarelo pálido, ao marrom ou azul (49,50).

### 3.3 MODELOS DE ESTUDO DA DEGENERAÇÃO DISCAL

Com o intuito de investigar a evolução da degeneração discal e o seu tratamento, necessitamos de um modelo de pesquisa adequado. Como opções, destacam-se os modelos celulares e animais, sendo que os primeiros, baseados em micro sistemas, mostram-se válidos apenas para investigações de curto-prazo devido ao decréscimo da qualidade e viabilidade celulares significativas e tempo-dependentes (51).

O primeiro modelo animal de degeneração discal foi introduzido em 1948 (52), usando uma agulha tipo *scapel* para perfurar o disco durante a cirurgia, resultando em degeneração discal.

Desde então, vários métodos têm sido explorados e alguns fatores chave foram propostos para produzir um modelo animal ideal para a degeneração discal. O modelo animal deve ser facilmente obtido e de baixo custo de realização. O disco precisa ser facilmente abordado cirurgicamente e ter o tamanho adequado. A degeneração deve ocorrer de maneira contínua e previsível (53).

Idealmente, um modelo de degeneração discal deve ser clinicamente aplicável, progressivo e reprodutível, usar um animal pequeno e ser detectável pelos métodos convencionais de imagem dentro de um mês (54).

Dentre o que já foi realizado, diversas maneiras de induzir a degeneração têm sido propostas. Vários modelos foram utilizados até o momento como a nucleotomia (55-58), aspiração do NP (59-61), carga axial (62), e a punção por agulha direta (63-66) ou percutânea com auxílio de fluoroscopia (67,68). Outros autores fizeram a associação de mais de um destes métodos (69-73). Outra maneira é a indução química com condroitinase (74).



Como podemos notar, grande parte dos investigadores têm usado modelos animais, induzindo o processo degenerativo a partir da punção do DIV por uma agulha e realizando o seguimento periódico após o teste terapêutico celular nos discos degenerados. Embora se tenha conhecimento de que esse método é incapaz de reproduzir idênticamente o que ocorre no ser humano, consideram-se as pequenas diferenças e procura-se compensá-las, havendo validade científica (51).

### 3.4 TRATAMENTOS ATUAIS DA DEGENERAÇÃO DISCAL

Até a introdução de estratégias de tratamentos que visassem a regeneração discal, as opções no tratamento da degeneração discal restringiam-se a opções que visam tratar os sintomas causados pela patologia. Dentro dessas opções o tratamento pode ser conservador ou cirúrgico.

#### 3.4.1 Tratamento conservador e cirúrgico

Aproximadamente 90% dos indivíduos com dor lombar baixa evoluirá com melhora dos sintomas dentro de 3 meses, com ou sem tratamento. Por isso, todos os pacientes com dor lombar sem sinais de emergência neurológica devem ser tratado inicialmente sem cirurgia (75). Sendo assim, a primeira abordagem da dor lombar baixa é o alívio da dor em curto prazo, usando anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (76). As evidências atuais sugerem que não há diferenças entre as diferentes classes de AINES, e a eficiência dos inibidores da ciclo-oxigenase (COX)-1 e COX-2 seletivos é a mesma (75).

Ainda que comumente prescritos, alguns autores acreditam que os opióides devem ser evitados no tratamento a longo prazo da dor lombar baixa (77). Até a presente data não temos estudos controlados randomizados utilizando opióides com mais de 4 meses de acompanhamento. As chances dos pacientes desenvolverem tolerância ou dependência ao medicamento podem chegar a 50%. Eles podem ter um papel no tratamento da dor aguda por poucos dias, mas não há evidências de que são capazes de devolver os pacientes a sua função laboral (78,79).

A literatura é controversa quanto ao uso de outros medicamentos. Existe uma fraca evidência para o uso de tramadol (melhor que o placebo) (80). Não existem fortes evidências para o uso de antidepressivos tricíclicos (81).

Outras opções de tratamentos conservadores incluem fisioterapia e exercícios terapêuticos funcionais, que objetivam a melhora da postura e movimentação da coluna. O paciente deve ser aconselhado a manter-se ativo e evitar ficar restrito ao leito. O comprometimento do paciente com o tratamento fisioterápico é de suma importância no sucesso do tratamento (82). O fortalecimento dos músculos do “core” parece ter efeito benéfico na sintomatologia da degeneração discal, sendo que os exercícios em extensão têm melhores resultados a curto prazo. O tratamento fisioterápico funcional melhora a função do paciente (83).

Quando o tratamento conservador não surte efeito, outras medidas mais invasivas têm sido usadas como as injeções de corticosteroides e anestésicos diretamente na região da dor, ainda que o sucesso destas terapias permaneça questionável (84). A literatura contemporânea sugere que não existem evidências que suportem o uso de corticosteroides sistêmicos orais ou a sua injeção epidural (75,85). As injeções epidurais são efetivas no alívio da dor a curto prazo, sendo importantes no arsenal do diagnóstico diferencial, mas são incapazes de restaurar a função discal e a cura dos sintomas a longo prazo (86).

Intervenção cirúrgica é considerada quando alternativas menos invasivas falharam em aliviar a dor. A artrodese de coluna é o procedimento mais comum (87-89). Ainda que a dor imediata melhore, este procedimento pode causar diminuição na mobilidade da coluna e degeneração de segmentos adjacentes (90). Além da fusão vertebral, o uso de discos protéticos incluindo Charite (91), ProDisc (92) e Flexicore (93) estão em estudo, e os dados atuais sugerem benefícios com seu emprego. Ainda assim, muitas desvantagens permanecem como a degeneração de discos adjacentes, ainda que sua incidência seja menor que na artrodese (9.2% e 28,6% para prótese e artrodese respectivamente) (94). Aliado a isso, os discos podem tornar-se instáveis sofrer desgaste, aumentando o risco de dano medular e inflamação induzida por partículas (36).

### **3.4.2 Tratamento com terapias regenerativas**

Dado a pobreza de resultados a longo prazo dos tratamentos atuais, existe uma necessidade crescente para novas opções no manejo da degeneração discal sintomática. Terapias biológicas e celulares têm sido desenvolvidas com o objetivo de prover um tratamento alternativo no arsenal terapêutico. Os pré-requisitos para

estes tipos de tratamento são a existência de um grupo de células viáveis no disco e tecidos ao redor (nichos) e condições nutricionais apropriadas para manter sua função (95).

Além das células dentro do disco existem alguns nichos de células progenitoras ao redor dele e pode ser recrutadas para o reparo tecidual. Um desses nichos é a interface ligamento-ânulo e o pericôndrio. Essa migração parece ocorrer pelo marcador pericondrocítico Fator de Crescimento e Diferenciação 5 (FCD-5) (96).

Tecidos com alta capacidade de regeneração tem sua principal fonte de células tronco (CT) através do sistema vascular e medula óssea (97-99). No DIV esse recrutamento é dificultado pela natureza avascular do tecido. Esta característica do disco, torna irreprodutível o procedimento de microfraturas, como o que é realizado atualmente em lesões condrais no joelho (100).

Alguns estudos sugerem que isoladamente a citocina inflamatória 5 (CCI-5) pode ser a molécula sinalizadora primária da degeneração discal, recrutamento celular, inflamação e dor discogênica (101,102).

Neste espectro, o uso de fatores de crescimento tem sido explorado no tratamento da degeneração discal. Estudos in vitro em animais e humanos e in vivo em animais têm demonstrado benefícios com uso de fator transformador de crescimento beta (FTC- $\beta$ ), fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1 (FCI-1), FCD-5, fator de crescimento epitelial tipo 1 (FCE-1) e proteína óssea morfogênica (POM)-2,-7,-12 (96,103–110). No entanto, existem limitações no emprego destes tratamentos, uma vez que necessitam da presença de células residentes saudáveis e com bom funcionamento, as quais têm-se mostrado reduzirem em número e alterarem seu fenótipo durante a progressão da degeneração (28). Outro problema é a baixa meia vida destes fatores que pode gerar a necessidade de múltiplas injeções (111). Além do mais, a adição de fatores de crescimento dentro de um disco degenerado tem o potencial de aumentar a atividade metabólica das células do disco, levando a um aumento do consumo de metabólitos e produção de produtos de degradação, potencialmente exacerbando os problemas associados a degeneração do DIV (112). Alguns estudos mostram aumento de reação inflamatória e aceleração do processo degenerativo com injeções de POM-2, FCD-5 e FCI-1 (96,113).

O Plasma rico em plaquetas (PRP) e o lisato plaquetário (PL) têm sido amplamente estudado na ortopedia. In Vitro, PRP e PL, tem demonstrado aumento na proliferação celular e síntese de matriz extracelular em células do AF e NP (114,115). Além disso, foi demonstrado que o PRP suprimiu citocinas induzidas por mediadores inflamatórios e metaloproteinases, enquanto restaurou os níveis de expressão genica de matriz proteica em células do NP humano (116).

### 3.5 TIPOS DE TERAPIAS CELULARES PARA REGENERAÇÃO DISCAL

Células-tronco são definidas como células não especializadas capazes de criarem linhas “imortais” (auto-renovação) e de se diferenciarem em tecidos especializados; sendo que, nos últimos anos, suas propriedades e funções têm sido largamente estudadas quanto à embriogênese dos organismos vivos, ao câncer, à cicatrização tecidual e à regeneração (117). A descoberta das células-tronco desencadeou um importante impulso de desenvolvimento ao campo da medicina regenerativa e seu potencial terapêutico no tratamento da degeneração discal tem gerado grande interesse clínico, devido, principalmente, ao expressivo número de pacientes atingidos pela dor lombar devido à degeneração discal, somados aos avanços nas técnicas cirúrgicas minimamente invasivas de cirurgia da coluna, constituindo uma associação que pode produzir melhorias significativas às atuais ferramentas limitadas para o tratamento da doença discal (118).

A investigação e manipulação das células-troncos com fins terapêuticos, entretanto, apresentam desafios celulares e moleculares complexos, iniciando com a definição da metodologia que confiavelmente produza células bem caracterizadas e viáveis para o transplante. Deve-se ter em mente que, embora, aparentemente, seja visto como um processo simples, depois de implantadas, as células-tronco precisam sobreviver, replicar e desenvolver suas funções fisiológicas normais em um ambiente hostil e metabolicamente alterado, que corresponde ao interior do DIV (51). Alguns pontos se destacam como obstáculos a serem vencidos na aplicação da terapia celular para a degeneração discal, devendo-se definir exatamente a melhor opção em relação aos futuros resultados.

Quanto à fonte de células, há diversas opções em estudo, destacando-se: cordão umbilical, embriões, o próprio DIV, tecido adiposo e a medula óssea. Essa última vem-se apresentando vantajosa frente às outras, uma vez que oferece

diversos benefícios, principalmente em relação ao fato de que as células retiradas são mais facilmente isoladas do que as provenientes de outras fontes (119).

Em sequência, outro ponto de fundamental importância corresponde ao tipo celular utilizado. De acordo com a literatura atual, as CTM vêm demonstrando um efeito terapêutico na reparação tecidual funcional (120). Quanto à aplicação na degeneração discal, alguns autores consideram-na como o tipo ideal, visto que podem ser obtidas de diferentes fontes autólogas (medula-óssea e tecido adiposo), podem ser cultivadas e posteriormente isoladas, sem desencadeamento de resposta imunológica (121), possibilitam fácil expansão em cultura a fim de obter-se o número adequado de células para o transplante celular, e, além disso, parecem apresentar um potencial melhor para sobreviver nas condições ambientais do DIV e produzir quantidades significativas de matriz (51). Em contrapartida, alguns autores sugerem que as CTM necessitam, anteriormente ao transplante, de um período de cultivo celular que ocorre pela utilização de meios e fatores de crescimento, capazes de alterar as características finais das células a serem transplantadas, uma vez que possuem propriedades independentes e interagem diretamente com o produto em expansão (122). Como resultado final, tem-se o aumento do número de variáveis de estudo bem como do encarecimento das pesquisas, que passam a exigir maior infraestrutura (122). Outros tipos celulares de destaque correspondem às células hematopoiéticas e mononucleares (primitivas, contendo tanto mesenquimais quanto hematopoiéticas). Em relação às primeiras, já se tem bem definida sua pequena capacidade de diferenciação em relação outros tipos de tecidos que não sejam o sanguíneo, já, em relação às últimas, pouco sabe-se quanto à aplicação na terapia para degeneração discal, tendo-se bons resultados clínicos em outras patologias, como em relação à vantajosa aplicação na recuperação cardíaca pós-infarto em modelos animais (123). As células-tronco mononucleares apresentam como principais vantagens a possibilidade de retirada direta da medula-óssea, aplicação direta – sem necessidade de expansão em meios de cultura e utilização de fatores de crescimento, composição exclusiva de células autólogas sem desencadeamento de resposta imunológica e presença de CTM, concomitantes no aspirado, em cerca de 0,01% (124).

As células mononucleares são a população celular não diferenciada clonogênica mais precoce das células estromais da medula óssea. Elas podem ser distinguidas pela sua expressão de marcadores de superfície celular específicos

incluindo antígeno celular estromal (ESTRO)-1, molécula de adesão celular vascular 1 (MACV-1), ESTRO-3 (fosfatase alcalina de tecido inespecífico), ESTRO-4 e CD146 (125-127). Elas podem ser cultivadas e, nesta ocasião, podem gerar bancos celulares de células purificadas de um único doador, que retêm a capacidade de extensa proliferação e potencial de diferenciação (126,128,129). As células mononucleares podem ser usadas alogenicamente (130,131). Desta maneira são consideradas adequadas para o tratamento de larga escala em humanos, sem requerer o dispendioso cultivo celular em cada tratamento. Como as células alogênicas podem ser colhidas de um doador jovem saudável, elas não estão sujeitas a mudanças relacionadas ao envelhecimento do paciente que podem ocorrer com células autólogas (130).

Já foi demonstrado que células mononucleares precursoras mesenquimais têm a capacidade de reconstituir a matriz extracelular discal quando injetadas no NP degenerado de ovelhas aumentando a altura discal, melhorando o sinal em T2 da ressonância magnética (RM) e os escores histológicos em comparação ao grupo controle (74). Atualmente, está sendo conduzido um estudo clínico em humanos com células mononucleares precursoras mesenquimais alogênicas humanas para o tratamento da dor lombar causada por degeneração discal (132).

Alguns pesquisadores sugerem o uso autólogo de células do NP como opção celular. As células do NP autólogas conseguem parar o processo degenerativo em modelos animais de degeneração discal (72) e, com maior importância, um estudo clínico randomizado demonstrou melhoras em termos de alívio da dor e hidratação discal após injeção em discos humanos degenerados (133). No entanto, ainda que este tipo celular seja promissor, o NP possui um número limitado de células e captá-las requer um procedimento invasivo que pode levar a degeneração discal (134). Além do mais, células do NP retiradas de discos degenerados podem ser inadequadas para propostas regenerativas pela aumentada expressão de enzimas degradativas (30), reduzida expressão de matriz proteica (10) e senescência celular (135).

Uma vez que as células notocordais são, embriologicamente, as células “originais” do NP, alguns estudos estão sendo conduzidos nesta área. Estudos recentes indicam que fatores presentes nas células notocordais têm a capacidade de estimular o crescimento e a produção de matriz pelas células do NP e inibem as reações angiogênicas e crescimento vascular (136,137). No entanto, a captação de

células notocordais é restrita uma vez que desaparecem do disco humano após os 10 anos de idade. Também é desconhecido se as células notocordais alogênicas e xenogênicas poderão ser usadas clinicamente (138).

Recentemente, o uso de condrócitos juvenis alógenos, retirados da cartilagem articular de cadáveres, está sendo explorado como uma fonte celular alternativa demonstrando bons resultados em humanos após 1 ano de tratamento, em termos de escores de RM e níveis de dor e incapacidade (139). No entanto devemos tomar cuidado pois a matriz produzida por estas células pode não ser adequada para engenharia/reparo decidual do DIV (140). As células do NP rotineiramente têm sido descritas como Condrócitos-like, com marcadores condrogênicos tradicionais como o colágeno 2 alpha 1, agrecan e região determinante sexual Y-box 9, sendo usados para avaliar a diferenciação das CTM em um fenótipo celular do NP (57,140). No entanto, mesmo que o NP e cartilagem articular tenham uma composição de matriz similar, a taxa de prostaglandinas e colágeno difere entre estes dois tecidos com uma razão de PG/colágeno de 27:1 no NP e 2:1 na cartilagem articular, sugerindo que as células do NP podem ter um fenótipo diferente dos condrócitos (36).

Existem evidências da presença de células progenitoras dentro do disco que vêm da identificação de células altamente proliferativas expressando marcadores de CT (Notch1, Delta4, Jagged1, c-KIT, Ki67, e ESTRO-1) (141,142) somado ao isolamento de uma população precursora de células de disco degenerados que têm a capacidade de diferenciar-se em linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica.

Mais recentemente Sakai et al, demonstrou “Células progenitoras do NP” que são receptor de tirosina quinase 2 positivas (Tiq2+) e disialogangliosidio 2 positivas (DG2+) dentro do NP de ratos e humanos, no entanto a proporção destas células dentro do disco foi marcadamente reduzida com envelhecimento e degeneração. Enquanto essas CT oferecem grande potencial, ainda está por ser esclarecido quando podem ser colhidas como propostas regenerativas, ou até mesmo estimuladas *in situ* com fatores exógenos apropriados (143).

Células tronco do NP de um disco degenerado tendem a dividir-se mais rápido e tem uma maior taxa de unidades formadoras de coloniais do que as presentes em um NP sadio. No entanto estas células têm maior tendência em diferenciar-se na linhagem adiposa ou óssea e parecem perder sua capacidade de diferenciar-se na linhagem condral. Também é mostrado que o número de células

expressando marcadores de células progenitoras é diminuído com a idade e degeneração do disco (143-145).

Uma solução mais imediata para fonte de células progenitoras são as CTM, que podem ser isoladas facilmente de múltiplas fontes, mais notavelmente da medula óssea (CTM-MO) ou tecido adiposo (CTM-TA), dividem-se rapidamente e são capazes de diferenciar-se em células da linhagem mesenquimal. Evidências demonstram que elas são capazes de diferenciar-se em células NP-like (140,146-149). Além do mais a implantação de CTM-MO em modelos de coelhos de degeneração discal podem reverter algumas mudanças degenerativas quando comparadas com nenhum tratamento (147).

Existe uma gama de métodos para a estimulação da diferenciação discogênica das CTM. A maioria deles envolvem o estímulo de um ou mais fatores de crescimento em culturas tridimensionais criadas com o intuito de mimetizar o ambiente de discos nativos. O primeiro fator comprovado a levar as CTM a diferenciar-se em uma linhagem condrogênica foi o FTC- $\beta$  (150) seguido de FCI-1, FGF-2 e os POMs, particularmente o POM-7 (151-153). Mais recentemente e seguindo a elucidação de marcadores específicos do NP, o FCD-5 demonstrou vantagem sobre o FTC- $\beta$ , induzindo a um fenótipo mais parecido com o das células do NP. A estimulação da diferenciação discogênica das CTM também pode ser conseguida por co-cultura com células do DIV (148).

### 3.5.1 Estudos Experimentais

Em termos de estudos experimentais no campo da terapia celular em discos degenerados, a literatura abrange uma gama de pesquisas com diferentes metodologias desde o modelo de degeneração discal, passando pelo desenho dos estudos e até no(s) tipo(s) celular(es) estudado(s). Com o intuito de comparação com o presente estudo revisamos estudos que utilizam as CTM e células tronco mononucleares ou precursoras mesenquimais (TABELA 1). Neste espectro os estudos de maior relevância remontam o início do século XXI.

Tabela 1 – Estudos Experimentais usando terapias baseadas em células no tratamento da degeneração discal.

---

**Estudos Experimentais usando terapias baseadas em células no tratamento da degeneração discal**

---



<b>Autor e Ano</b>	<b>Desenho estudo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tipo Celular</b>	<b>Indução DD</b>	<b>Follow up(*)</b>
Sakai et al. 2003	N-RCT	Coelhos	CTM autólogas embebidas em hidrogel	Nucleotomia + Aspiração do NP	8
Crevensten et al. 2004	N-R N-CT	Ratos	CTM-MO autólogas + AH	Punção por Agulha	4
Zhang et al. 2005	RCT	Coelhos	CTM-MO alógenas	Nada	24
Sakai et al. 2005	N-RCT	Coelhos	CTM-MO alógenas embebidas em hidrogel	Nucleotomia + Aspiração do NP	48
Sakai et al. 2006	N-RCT	Coelhos	CTM-MO alógenas embebidas em hidrogel	Nucleotomia + Aspiração do NP	24
Hiyama et al. 2008	N-RCT	Cachorros	CTM-MO autólogas	Aspiração do NP	8
Ho et al. 2008	N-RCT	Coelhos	CTM-MO autólogas	Punção por Agulha percutânea	26
Hohaus et al. 2008	N-RCT	Cachorros	CTM-TA autólogas+ AH	Lesão anular e nucleotomia parcial	26
Sobajima et al. 2008	N-RCT	Coelhos	CTM autólogas	Nada	24
Ganey et al. 2009	RCT	Cachorros	CTM-TA autólogas + AH	Nucleotomia Parcial	48
Jeong et al. 2009	N-RCT	Ratos	CTM-MO xenógenas humanas	Lesão anular por lâmina	8
Yang et al. 2009	N-RCT	Ratos	CTM-MO alógenas	Punção por Agulha	24
Henriksson et al. 2009	N-RCT	Porcos	CTM-MO xenógenas humanas + Hidrogel	Nucleotomia	26
Jeong et al. 2010	N-RCT	Ratos	CTM-TA xenógenas humanas	Punção por Agulha guiada por fluoroscopia	6
Serigano et al. 2010	N-RCT	Cachorros	CTM-MO autólogas	Aspiração do NP	12
Yang et al. 2010	RCT	Coelhos	CTM-MO autólogas	Punção por agulha + Aspiração do NP	12
Hee et al. 2010	RCT	Coelhos	CTM-MO autólogas + AH	Carga Axial	8
Miyamoto et al. 2010	N-RCT	Coelhos	CTM autólogas Sinoviais fêmur	Aspiração do NP	24
Omlor et al. 2010	N-RCT	Porcos	CTM-MO autólogas + cola de fibrina	Nucleotomia Parcial	3 dias

Ghosh et al. 2012	N-RCT	Ovelhas	Alógeno BMPC + AH	Condroitinase	24
Vadalà et al. 2012	N-RCT	Coelhos	CTM-MO alógenas	Punção por Agulha	9
Cai et al. 2014	RCT	Coelhos	CTM-MO autólogas	Punção por Agulha	10

Fonte: o autor, 2016.

Legenda: DD – Degeneração Discal; RCT - estudo experimental controlado randomizado; N-RCT - estudo experimental controlado não randomizado; N-R N-CT estudo experimental não controlado e não randomizado; CTM – Células tronco mesenquimais; CTM-MO - Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea; CTM-TA – Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo; AH – Ácido Hialurônico; NP – Núcleo pulposo; (\*) follow up em semanas.

Em 2003, Sakai et al., fizeram em um estudo experimental controlado não randomizado em coelhos, avaliou o emprego de CTM autólogas embebidas em hidrogel em discos degenerados através de nucleotomia e aspiração do NP. Eles verificaram que o grupo das CTM apresentou uma preservação da estrutura histológica, foram capazes de sobreviver e proliferar no disco após 8 semanas e tiveram uma produção de prostaglandinas acentuada nas colorações histológicas (69).

Em 2004, Crevensten et al., realizaram um estudo experimental não controlado e não randomizados em ratos. Eles induziram a degeneração discal através de punção por agulha e aplicaram CTM-MO associadas ao ácido hialurônico. Eles notaram que as CTM-MO estavam viáveis, podiam replicar-se no disco após 4 semanas e tiveram uma tendência em aumentar a altura discal (63).

Em 2005, Zhang et al., em um estudo experimental controlado randomizado em coelhos, usando CTM-MO alógenas, em um disco que não foi induzido a degeneração, verificaram que estas células podiam sobreviver no disco após 6 meses e ainda tinham uma produção acentuada de prostaglandinas (154).

Ainda em 2005, Sakai et al., em um dos estudos com maior follow-up da literatura, verificaram pela primeira vez que as CTM-MO podem sobreviver no disco por 1 ano. Para tanto, fizeram um estudo experimental controlado não randomizado em coelhos induzindo a degeneração de seus discos com nucleotomia e aspiração no NP. Eles aplicaram as CTM-MO embebidas em hidrogel, e verificaram que após um ano, elas aumentaram o conteúdo de colágeno do tipo II, agregans, prostaglandinas no NP e diminuíram a produção de colágeno do tipo I (70).

Um ano depois, em 2006, Sakai et al., usando o mesmo modelo de degeneração discal em coelhos, notaram que as CTM-MO aumentaram a altura

discal em T2 na RM, restaurando as prostaglandinas e preservando a estrutura histológica do disco, incluindo o AF (71).

Em 2008, Hiyama et al., realizaram um estudo experimental controlado não randomizado em cachorros induzindo a degeneração discal com aspiração do NP e avaliaram a injeção de CTM-MO autólogas. Eles notaram melhora na altura discal e sinal em T2 na RM, aumento na produção de proteoglicanos e melhoras da estrutura histológica do AF (59).

Neste mesmo ano, Ho et al., em um estudo um estudo experimental controlado não randomizado em coelhos, avaliaram a influência de CTM-MO autólogas em discos induzidos a degeneração com punção por agulha percutaneamente. Após 6 meses da indução eles verificaram que os discos do grupo CTM-MO estavam menos degenerados que os restantes mas não retornaram à linha de base do disco normal, e não houve restauração da altura discal (67).

Ainda em 2008, Hohaus et al., induziram a degeneração discal com lesão anular e nucleotomia parcial em cachorros e fizeram um estudo experimental controlado não randomizado injetando CTM-TA autólogas associado com ácido hialurônico. Eles constataram que as células permanecem vivas no disco após 26 semanas, mantém a morfologia discal, altura e intensidade de sinal em T2 na RM. Seus resultados apontam que o ácido hialurônico isoladamente não é suficiente para prevenir a degeneração (72).

Findando os estudos de 2008, Sobajima et al., realizaram uma linha de pesquisa com 2 modelos de pesquisa diferentes. Em um lado da pesquisa fizeram um estudo in vitro com células humanas em discos humanos. No outro realizaram um estudo experimental controlado não randomizado com CTM autólogas em coelhos. As células foram injetadas em discos que não foram submetidos a qualquer método de indução de degeneração discal. Após 24 semanas notaram que as células permaneceram viáveis, o disco não fez resposta inflamatória a injeção. Ao fim do experimento, as células localizavam-se na zona de transição e mais próximas a CIAF. Eles notaram ainda um sinergismo entre as células no NP e as CTM para aumentar a produção de GAG, numa taxa média de 75:35 MPC/CTM (155).

Em 2009, Ganey et al., realizaram um estudo experimental controlado randomizado em cachorros, cujos discos foram induzidos a degeneração discal com nucleotomia parcial. Eles injetaram CTM-TA associado a ácido hialurônico nos

discos degenerados e, após 48 semanas verificaram que o grupo intervenção apresentou melhora de sinal de T2 na RM e expressão de colágeno do tipo II (56).

Neste mesmo ano, Jeong et al., fizeram um estudo experimental controlado não randomizado em ratos. Eles induziram a degeneração discal com lesão anular com lâmina e injetaram CTM-MO humanas (xenógenas) para avaliar a capacidade das células humanas em reverter a degeneração discal. Após 8 semanas as células mantiveram a altura discal em T2 e restauraram a estrutura do AF. Neste estudo as células estavam viáveis após 2 semanas, mas não sobreviveram após 4 semanas (156).

Ainda em 2009, Yang et al., induziram a degeneração discal através de punção por agulha e conduziram um estudo experimental controlado não randomizado injetando CTM-MO alógenas nos discos degenerados. Eles constataram que após 24 semanas, o grupo injetado com as células restauraram a estrutura do NP e AF, preservaram a altura discal e levaram a diferenciação condral. Dado interessante neste grupo foi o acentuado número de células notocordais sugerindo que as CTM-MO promovem a sobrevivência e proliferação das células notocordais (64).

Findando os estudos de 2009, Henriksson et al., em um estudo experimental controlado não randomizado em porcos, avaliaram a influência de CTM-MO xenógenas humanas embebidas em hidrogel em discos induzidos a degeneração nucleotomia. Após 6 meses da indução eles verificaram que as células estavam viáveis, diferenciavam-se em células condrais discais e melhoravam a aparência discal na RM. Seus resultados sugeriram que a associação com hidrogel aumenta a diferenciação, produção de matriz e sobrevivência das células (57).

Em 2010, Jeong et al., utilizaram CTM-TA xenógenas humanas para tratar discos de ratos induzidos a degeneração por punção por agulha guiada por fluoroscopia. Para tanto fizeram um estudo experimental controlado não randomizado. Ao final de 6 semanas eles notaram que o grupo injetado com as células apresentou menor perda da altura discal, restaurou o sinal em T2 na RM, restaurou a estrutura do AF e sobre-regulou o colágeno do tipo II e agregans (68).

Seguindo em 2010, Serigano et al., conduziram um estudo experimental controlado não randomizado em cachorros com o intuito de estimar qual seria o número ideal de células injetadas no tratamento da degeneração discal. Para tanta induziram a degeneração discal através de aspiração do NP e utilizaram CTM-MO

autólogas. Fizeram grupos com  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células. Em seus resultados todos os grupos celulares mostraram aumento da altura do disco e sinal de T2 na RM, doses celulares de  $10^6$  e  $10^7$  mostraram melhora da estrutura histológica do NP e CIAF. O Grupo celular  $10^5$  teve mais alterações degenerativas. Grupo celular  $10^6$  teve menos apoptose que os grupos  $10^5$  e  $10^7$  e o Grupo celular  $10^6$  teve mais células vivas com 12 semanas comparado aos outros grupos (60).

Neste mesmo ano, Yang et al., em um estudo experimental controlado randomizado em coelhos, induziram a degeneração discal com punção por agulha e aspiração do NP e injetaram CTM-MO autólogas. Após 12 semanas as células inibiram a apoptose de células do NP, diminuíram a perda de altura discal e aumentaram sinal de T2 na RM além de aumentar a taxa de colágeno do tipo II (73).

Ainda em 2010, Hee et al., induziram a degeneração discal em coelhos com carga axial e injetaram CTM-MO associadas a ácido hialurônico como tratamento. Fizeram um estudo experimental controlado e randomizado. Após 8 semanas identificaram células viáveis no disco, aumento da altura discal e melhora dos escores histológicos (62).

Continuando em 2010, Miyamoto et al., fizeram um estudo experimental controlado não randomizado em coelhos induzidos a degeneração discal por aspiração do NP. O grupo celular foi injetado com CTM autólogas sinoviais do fêmur distal. As células sobreviveram no NP após 24 semanas, preservaram a altura discal e sinal de T2 na RM após 6 semanas. O grupo celular teve um aumento na expressão de colágeno tipo II e preservaram a estrutura histológica do NP (61).

Findando os estudos de 2010, Omlor et al., realizaram um estudo experimental controlado não randomizado em porcos. Eles induziram a degeneração discal por nucleotomia parcial, e injetaram CTM-MO autólogas associadas a cola de fibrina. Após 3 dias eles notaram que apenas 9% das células permaneciam no disco. Os autores sugerem que provavelmente as células que sobrevivem, reproduzem-se e, por isso, outros estudos encontram mais células mais tarde (157).

Em 2012, Ghosh et al., conduziram um estudo experimental controlado não randomizado em ovelhas. Eles injetaram BMSPC alógenas associadas ao ácido hialurônico em discos induzidos a degeneração por condroitinase. Após 24 semanas verificaram que o grupo celular foi capaz de restaurar a altura discal, melhorou o escore de Pfirrmann na RM e os escores de degeneração histológica (74).

Ainda em 2012, Vadalà et al., induziram a degeneração discal em discos de coelhos através de punção por agulha e fizeram um estudo experimental controlado não randomizado. Eles injetaram CTM-MO alógenas no grupo celular. Após 9 semanas eles não verificaram nenhuma evidência de regeneração discal na RM e as radiografias (RX) demonstraram formação de osteófitos e nenhuma célula foi encontrada no NP (65).

Já em 2014, Cai et al., em um estudo experimental controlado e randomizado induziram a degeneração discal em discos de coelhos através de punção por agulha. Eles injetaram CTM-MO autólogas em no grupo terapia celular. Após 10 semanas eles verificaram que as células mantiveram a capacidade de diferenciação. O grupo celular não evitou a perda da altura discal, mas o fez de maneira mais lenta, demonstraram um aumento de sinal em T2 na RM e aumento na expressão de colágeno do tipo II e agrecans (66).

### 3.5.2 Estudos Clínicos

A pesquisa com estudos clínicos no campo da terapia celular no DIV degenerado começou recentemente, restringindo-se a poucos estudos datados dos últimos 10 anos (TABELA 2).

Tabela 2 – Estudos Clínicos usando terapias baseadas em células no tratamento da degeneração discal.

<b>Estudos Clínicos usando terapias baseadas em células no tratamento da degeneração discal</b>					
<b>Autor e ano</b>	<b>Niv Ev</b>	<b>N</b>	<b>Tipo Celular</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Resultado</b>
Haufe <i>et al.</i> 2006	III	10	Medula óssea autóloga com células tronco da linhagem hematopoiética	Injeção Percutânea	Nenhuma melhora dos sintomas e 80% tiveram que ser submetidos a procedimento cirúrgico em um ano
Meisel <i>et al.</i> 2007	I	28	Cultura de condrócitos autólogos derivados do disco	Injeção Percutânea após 12 semanas da microdissectomia	Redução da dor lombar em 2 anos e aumento de sinal nas imagens de T2 de RM nos discos tratados e adjacentes
Yoshikawa <i>et al.</i> 2010	III	2	CTM –MO autólogas	Injeção Percutânea associada a esponja de colágeno	Aumento de sinal nas imagens de T2 de RM, menor instabilidade e melhora clínica nos pacientes

Orozco <i>et al.</i> 2011	III	10	CTM-MO autólogas	Injeção Percutânea	Melhora clínica da dor, aumento de sinal nas imagens de T2 de RM. Altura dos discos não foi recuperada
Pang <i>et al.</i> 2014	IV	2	Células alógenas de cordão umbilical	Injeção Percutânea	Melhora nos escores funcionais da coluna até o sexto mês. A partir de então, declínio até o segundo ano
Pettine <i>et al.</i> 2015	III	26	CTM-MO	Injeção Percutânea	24 evitaram cirurgia no período de um ano e 21 no período de dois anos. Melhora do escore clínico.

Fonte: o autor, 2016.

Legenda: Niv Ev – Nível de evidência; N – Amostra; RM – Ressonância Magnética; CTM-MO - Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea.

Em 2006, Haufe *et al.*, em um estudo nível III de evidência, injetaram percutaneamente células tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea em 10 pacientes com dor lombar baixa devido a degeneração discal. Nenhum paciente teve melhora dos sintomas e 80% deles tiveram que ser submetidos a procedimento cirúrgico em um ano (158).

Um ano depois, em 2007, Meisel *et al.*, em um estudo nível I de evidência, trataram 28 pacientes submetidos a microdissectomia por dor lombar. Doze semanas depois da microdissectomia eles injetaram percutaneamente condrócitos autólogos cultivados e derivados do DIV. Os pacientes tiveram um redução da dor lombar em dois anos e demonstraram aumento de sinal nas imagens de T2 de Ressonância Magnética nos discos tratados e adjacentes (133).

Em 2010, Yoshikawa *et al.*, em um estudo nível III de evidência, trataram dois pacientes com dor lombar e ciática que tinham evidências radiológicas de estenose do canal e degeneração discal. Eles injetaram percutaneamente CTM autólogas da medula óssea, associadas a uma esponja de colágeno. Eles verificaram aumento de sinal nas imagens de T2 de Ressonância Magnética, uma menor instabilidade e melhora clínica em ambos os pacientes (159).

No ano seguinte, em 2011, Orozco *et al.*, em um estudo nível III de evidência, recrutaram dez pacientes com dor lombar baixa devido a degeneração discal e injetaram percutaneamente CTM autólogas da medula óssea. Eles verificaram melhora clínica da dor lombar e da ciática além de aumento de sinal nas imagens de

T2 de Ressonância Magnética. No entanto, a altura dos discos não foi recuperada (160).

Em 2014, Pang et al., em um estudo nível IV de evidência, utilizaram CTM alógenas do cordão umbilical para tratar dois pacientes com dor lombar e evidências em ressonância magnética de degeneração lombar. Eles relataram melhora imediata nos escores de dor e função da coluna que mantiveram-se até o sexto mês, e a partir de então, declinaram até o segundo ano (161).

Já em 2015, Pettine et al., em um estudo prospectivo de nível III de evidência, trataram 26 indivíduos com degeneração discal e dor lombar que não melhoraram com tratamento conservador depois de três meses e que eram incluídos em critérios cirúrgicos. Para tanto colheram um aspirado de medula óssea e processaram-no para obter um concentrado de células da medula óssea. Este concentrado era injetado percutaneamente com auxílio de fluoroscopia nos discos doentes. Os pacientes foram avaliados clinicamente com 3, 6, 12 e 24 meses e com ressonância magnética com 12 meses. Dos 26 pacientes, 24 evitaram cirurgia no período de um ano e 21 no período de dois anos. A média de dor do escore clínico diminuiu com três meses e sustentou-se até o segundo ano. Oito pacientes melhoraram pelo menos um grau na avaliação com ressonância magnética e nenhum dos 26 piorou (162).

Atualmente, um estudo clínico multicêntrico prospectivo duplo cego randomizado está sendo conduzido comparando duas doses de células tronco mesenquimais precursoras pluripotenciais (MPC) combinadas com ácido hialurônico para o tratamento da dor lombar por degeneração discal. O estudo começou em agosto de 2011, tem a previsão de tratar 100 indivíduos e tem previsão de terminar no segundo semestre de 2015 (132).



## 4 MÉTODOS

Esse estudo caracteriza-se metodologicamente como experimental longitudinal prospectivo do tipo coorte, sendo que os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os métodos de anestesia e cirúrgicos foram baseados no trabalho de Lipson et al. (163), a técnica histológica foi de acordo com a de Masuda et al. (54), tendo a análise histológica como referência Rousseau et al. (164), além dos resultados obtidos por pesquisadores dessa Instituição de Ensino, em estudo prévio (15,119,165).

O projeto de pesquisa deste estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná sob o nº 377.

### 4.1 ANIMAL

Foram utilizados 32 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, brancos, da raça New Zealand, entre 2,5 a 3 kg, com cerca de 08 meses de vida. A escolha do modelo foi baseada na facilidade de obtenção e cuidado com os sujeitos de pesquisa, no tamanho apropriado dos DIVs e na quantidade de DIVs que possibilitam a experimentação, maximizando a quantidade de lesões e minimizando o número de animais utilizados. Além disso, o coelho movimenta-se através de propulsão sobre as patas traseiras o que é mais próximo de reproduzir o caminhar bípede dos humanos (166).

### 4.2 ANESTESIA

Os coelhos foram submetidos a anestesia geral com o cloridrato de ketamina 5% (20-25mg/kg) intramuscular – passando para via endovenosa, através de um acesso em veia auricular (FIGURA 1). Caso houvesse a necessidade de manter a anestesia por mais de 40 minutos, xilazina (0,15mg/kg) intramuscular e, sendo necessária maior indução anestésica, tiopental sódico (doses variáveis), via endovenosa.

Figura 1 – Preparo Cirúrgico



Fonte: o autor, 2016.

Os coelhos anestesiados eram posicionados em decúbito lateral direito e abordados em acesso posterolateral retroperitoneal.

#### 4.3 ABORDAGEM CIRÚRGICA

Os coelhos foram posicionados em decúbito lateral direito e uma abordagem posterolateral retroperitoneal (FIGURA 1), através de uma lombotomia localizada no ponto médio entre a última costela e a crista íliaca (aproximadamente 10 cm), era exposta a superfície anterior de 5 DIVs lombares consecutivos (L2-L3 a L6-L7). Após palpação para determinar os níveis dos discos, as áreas a serem puncionadas (1-2 mm de diâmetro) foram cuidadosamente expostas, através do seguinte procedimento: acesso paramediano esquerdo; identificação do músculo reto abdominal; abertura da bainha do reto paralela ao músculo; identificação do retroperitônio e dissecação manual desde o músculo psoas até a coluna vertebral. Finalmente, foram posicionados afastadores protegendo a artéria aorta e veia cava antes da punção do disco. Os 3 discos experimentais foram puncionados com agulha 40X12 mm (18 G 1 ½), em uma profundidade de 5 mm, sendo que essa permaneceu no interior do DIV por 5 segundos (FIGURAS 2 e 3). Finalizada toda a intervenção, foi realizado a sutura do animal por planos (musculatura profunda; tecido celular subcutâneo e pele).

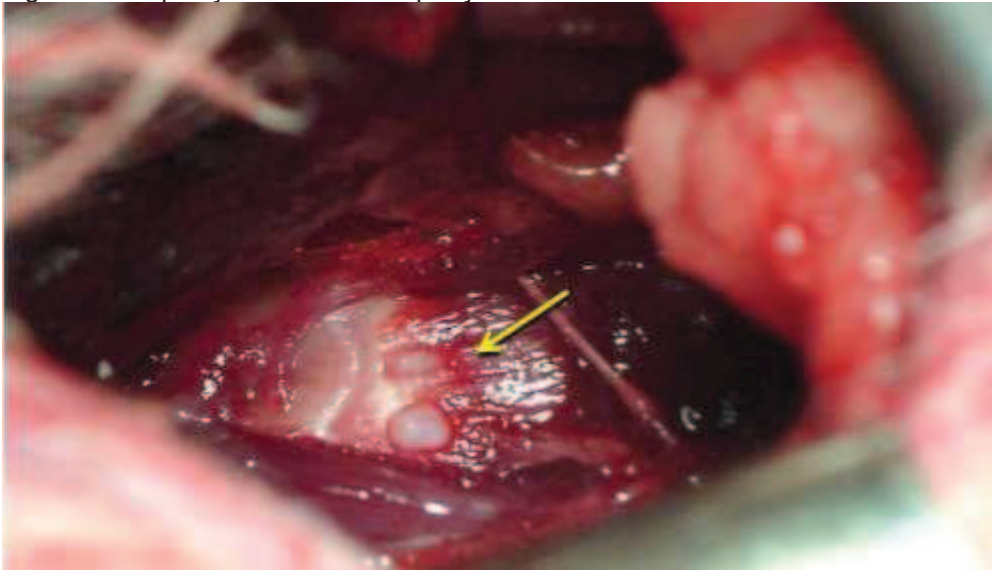
Figura 2 – Preparo da agulha para executar a punção



Fonte: o autor, 2016.

Delimitamos os 5mm finais de uma de 40X12 mm (18 G1 ½) a partir de seu bisel e a dobramos no formato de “S” com o intuito de padronizar a profundidade das punções.

Figura 3 – Exposição dos discos e punção.



Fonte: o autor, 2016.

Após a exposição os três discos experimentais eram puncionados objetivando a indução da degeneração discal.

#### 4.4 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO

Foi realizada através da punção-aspiração da medula óssea da crista ílfaca. Os coelhos, logo após o procedimento cirúrgico de punção para degeneração discal continuaram sob anestesia. Quando a coleta era feita em outro momento (conforme

o delineamento dos grupos), os coelhos eram novamente anestesiados com administração intramuscular de ketamina (20-25 mg/kg) e xilazina (0,15mg/kg), colocados na posição em decúbito lateral direito, com o membro inferior em flexão. Em todos os casos, foram realizadas as punções-aspiração da medula óssea, utilizando uma seringa de 5 mL contendo heparina (liquemine 5.000 UI/ml) com uma agulha 40X12 mm (18 G 1 ½). Uma pequena quantidade de medula óssea (2,5-4 mL) foi aspirada e processada imediatamente. Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas. Em seguida, as células-tronco mononucleares foram isoladas a partir do material proveniente de punção-aspiração da medula óssea, utilizando-se o método de separação por gradiente de densidade em centrifuga (Ficoll-Hypaque,  $d= 1,077\text{g/m}^3$ , Sigma, St. Louis, MO) pelo método de Böyum (167). O material foi centrifugado a 1400 rpm por 40 minutos. O anel de células mononucleares, localizado na interfase, foi retirado e passado para um tubo cônico, contendo 20 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD). As células foram lavadas duas vezes a 1500 rpm por 10 minutos e suspensas novamente com meio MEMD. Foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer e verificada a viabilidade celular, utilizando o corante vital Azul de Tripán. A seguir, o material ficou suspenso em meio MEMD, contendo 20% de soro bovino fetal (SBF, Gibco BRL, Grand Island, NY), 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), resultando no isolamento das células que serão implantadas. Todos os procedimentos citados fazem parte do protocolo relativo à técnica de coleta e isolamento de células-tronco mononucleares, já desenvolvida e consolidada nessa Instituição de Ensino (123).

#### 4.5 INJEÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO / PLACEBO (SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA)

Após coleta e isolamento das células, elas foram introduzidas no DIV do animal utilizando-se da mesma técnica cirúrgica anteriormente descrita. O material foi colocado no limite superior do DIV previamente perfurado, utilizando, no entanto, agulha de menor calibre 13X4,5 (26 G ½) (168). Foram feitos exatamente os mesmos procedimentos nos animais que receberam apenas solução salina isotônica, injetando-se a quantidade idêntica ao do volume celular, obedecendo às mesmas condições citadas.

#### 4.6 DELINEAMENTO DOS GRUPOS

Ao todo, Foram utilizados 32 animais, divididos em diferentes grupos. Inicialmente, para permitir conclusões científicas válidas, dividimos em 2 grandes grupos: experimental e placebo. Os animais que compunham o grupo placebo possuíam as mesmas características que os experimentais e passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, em condições idênticas, mas, ao invés de receberem as CTs, injetamos solução salina isotônica – na mesma quantidade que o aspirado de medula óssea dos animais experimentais e exatamente pelo mesmo procedimento de infusão. As análises macroscópica e histológica do grupo placebo foram realizadas de forma idêntica ao experimental e a eutanásia seguiu o cronograma referente ao respectivo grupo experimental.

Além disso criamos um grupo controle que não passou por nenhuma intervenção, nem células tronco, nem solução salina. Estes discos controles são essenciais para o desenvolvimento do projeto, uma vez que significam a base comparativa para as alterações provocadas pelas CT.

O grupo experimental, por sua vez, foi subdividido em 4 outros grupos, de acordo com o período em que ocorreu a injeção de CT:

- a) CT2M (4 animais): transplante de células-tronco mononucleares autólogas após 2 meses da cirurgia de indução de degeneração discal;
- b) CT2S (4 animais): transplante de células-tronco mononucleares autólogas após 2 semanas da cirurgia de indução de degeneração discal;
- c) CTCP (4 animais): transplante de células-tronco mononucleares autólogas imediatamente após a cirurgia de indução de degeneração discal. Essa diferenciação periódica permitirá a análise crítica comparativa quanto ao período mais indicado da implantação da terapia celular frente ao processo degenerativo;
- d) CTSP (4 animais), grupo que recebeu as células-tronco mononucleares, entretanto, não passou pelo procedimento cirúrgico de indução de degeneração discal, permitindo a análise dos efeitos diretos das células-tronco – sem que houvesse qualquer indício de degeneração – na investigação de um possível efeito protetor das células-tronco mononucleares sobre os DIVs frente à degeneração discal. Da mesma forma, buscando a validade científica, os animais que fizeram parte do

grupo de controle, foram subdivididos de acordo com o pareamento em relação ao grupo experimental e receberam injeção de solução salina isotônica, da seguinte forma: SS2M (4 animais), correspondendo ao CT2M; SS2S (4 animais), correspondente à CT2S; SSCP (4 animais), correspondente a CTCP e SSSP (4 animais), correspondente a CTSP.

Todos os grupos tiveram o seguimento de 2 meses após o procedimento de introdução das células-tronco ou solução salina isotônica, realizando-se a eutanásia e análise histológica. O tempo de acompanhamento mostrou-se ideal para avaliação de estratégias terapêuticas, uma vez que as alterações degenerativas, mesmo presentes, permanecem passíveis de reversão, conforme experiência prévia desse grupo de pesquisa(15).

Dos 32 coelhos, seis morreram durante procedimento cirúrgico (seja na indução da degeneração ou na injeção das CT / placebo) ou no período pós operatório de 2 meses que precedia a eutanásia. Sendo assim, 26 coelhos foram analisados histologicamente divididos conforme seguem as TABELAS 3 e 4:

Tabela 3 – Distribuição dos coelhos nos Grupos injetados com células Tronco.

<b>Células Tronco</b>				
<b>Grupo</b>	<b>CT2M</b>	<b>CT2S</b>	<b>CTCP</b>	<b>CTSP</b>
<b>Coelhos (n = 14)</b>	4	3	4	3
<b>Discos intervenção (n = 37)</b>	12	9	7	9
<b>Discos controle (n = 60)</b>	16	14	16	14

Fonte: o autor, 2016.

Legenda: CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção.

Tabela 4 – Distribuição dos coelhos nos Grupos injetados com Solução Salina.

<b>Solução Salina</b>				
<b>Grupo</b>	<b>SS2M</b>	<b>SS2S</b>	<b>SSCP</b>	<b>SSSP</b>
<b>Coelhos (n = 12)</b>	3	2	4	3
<b>Discos intervenção (n = 35)</b>	9	6	12	8
<b>Discos controle (n = 55)</b>	15	10	17	13

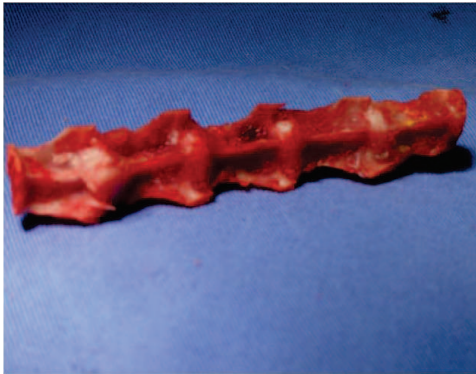
Fonte: o autor, 2016.

Legenda: SS2M – Injeção de solução salina após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de solução salina após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de solução salina no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de solução salina sem punção.

#### 4.7 EUTANÁSIA

Após 8 semanas da injeção de material (CTs/solução salina isotônica) no DIV, os coelhos foram sacrificados com injeção em dose excessiva de pentobarbital (90 mg/kg), após preparo anestésico antálgico; em seguida, a coluna vertebral foi coletada para realização de análise histológica (FIGURA 4).

Figura 4 – Coleta da coluna vertebral.



Fonte: o autor, 2016.

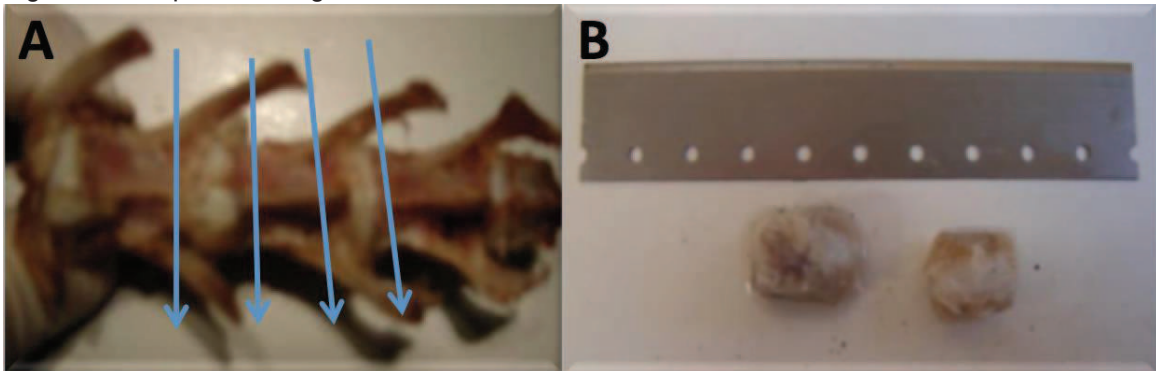
Após a eutanásia, o seguimento da coluna que continha os discos experimentais e controle eram coletados e dissecados descartando a medula espinhal e a musculatura.

#### 4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA E CITOLÓGICA

Os discos e as vértebras adjacentes foram coletados após a eutanásia do coelho, permanecendo em fixação em formalina por volta de 48 horas. Em sequência, o material ficou em processo de descalcificação em Ácido EtilenoDiamino Tetra-Acético (AEDTA), por tempo variável, levando, em média, 25 dias para atingir o ponto ideal que permita manipulação sem danos. A amostragem ocorreu por meio de cortes transversais em cada disco, expondo a região central do mesmo, bem como suas PVs – superior e inferior. Após isso, foi realizado o processamento das amostras obtidas, desidratando-as e encaixando-as em blocos de parafina. Secções

de seis micra de espessura foram realizadas no material previamente preparada (FIGURA 5). As seções foram coradas com *sirius red* para a análise do colágeno e hematoxilina-eosina avaliar os padrões consagrados da degeneração discal. A arquitetura discal e das PVs foram examinadas em aumento de duas vezes ao microscópio óptico. Aspectos celulares e extracelulares foram analisados utilizando um aumento de 20 vezes ao microscópio óptico para avaliar as laminae em HE definindo a condição de degeneração discal (54). Através do microscópio com luz polarizada, foram observados os aspectos referentes à disposição de colágeno nos DIVs utilizando também o aumento de 20 vezes. Os discos controle passaram pelos mesmos processos de preparação de material histológico, sendo utilizados como padrão de comparação para com os discos em estudo.

Figura 5 – Preparo histológico.



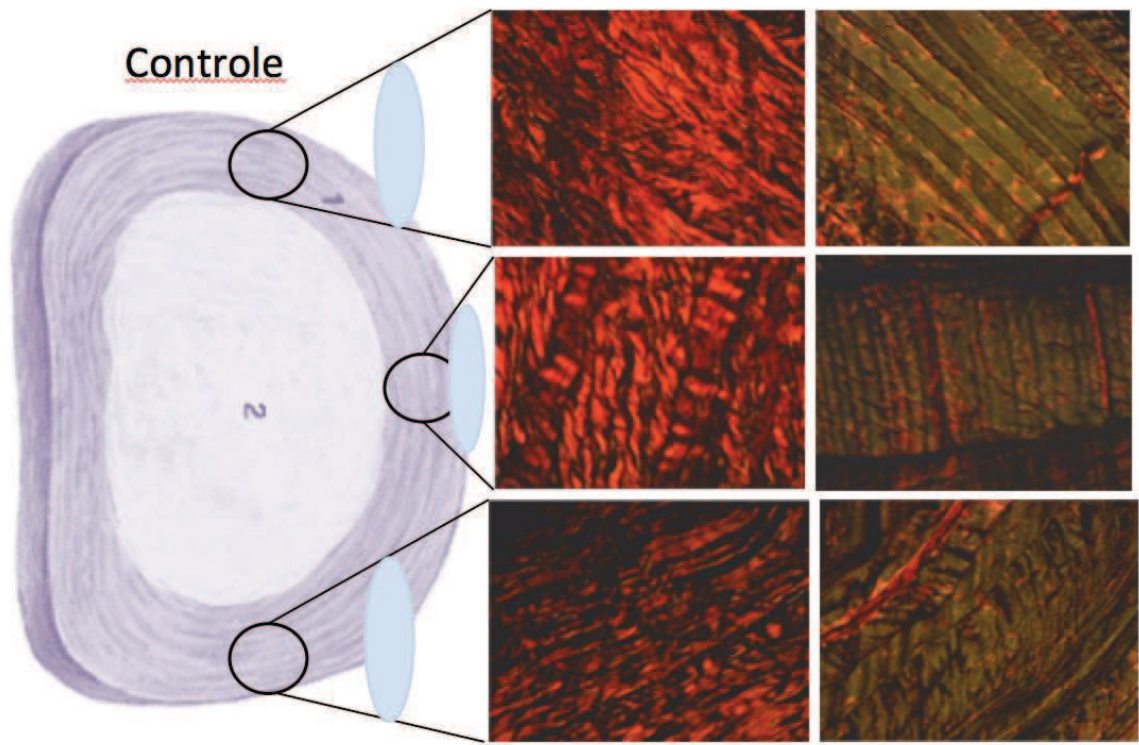
Fonte: o autor, 2016.

5A – Aspecto da amostra após os 25 dias do processo de descalcificação e planejamento dos cortes para individualização dos discos. 5B – Discos individualizados com suas respectivas placas vertebrais prontos para realizar as seções com intervalos de seis micras.

De cada lâmina preparada com um DIV, foram fotografados seis campos de visão pelo Software DinoCapture® 2.0 V1.2.7(AnMo Electronics Corporation). Os seis campos foram pré-definidos para todos os discos e iniciam na camada mais periférica das lamelas do AF. Foram eles: Dois campos Ângulo Lateral Direito do disco, sendo um da porção externa e um da porção interna do ânulo; Dois campos Ângulo Lateral Esquerdo do disco, sendo um da porção externa e um da porção interna do ânulo; Dois campos Centro da porção Convexa do disco do disco, sendo um da porção externa e um da porção interna do ânulo (FIGURA 6). Esta convenção permite uma amostra panorâmica e abrangente da estrutura do AF.



Figura 6 – Ferramenta DinoCapture

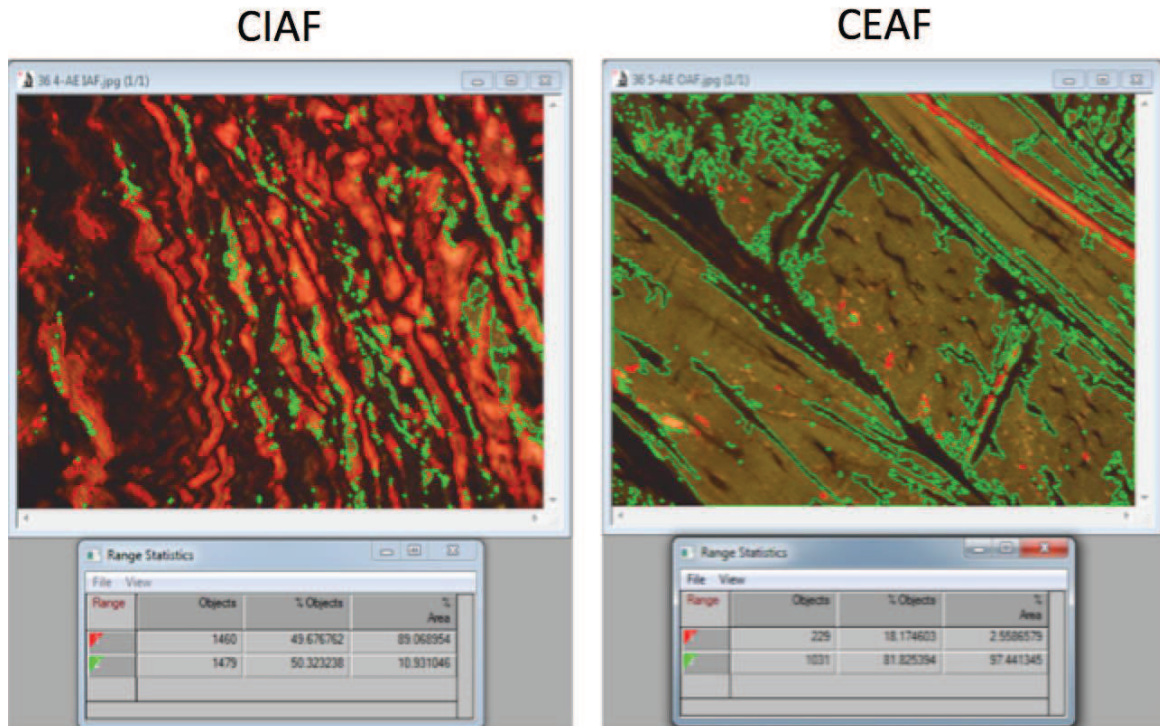


Fonte: o autor, 2016.

Ilustração esquemática dos 6 campos fotografados em um disco controle (SRx20). Nota-se a preponderância do verde na camada externa do ânulo fibroso (CEAF) denotando o colágeno do tipo III e do vermelho na camada interna do ânulo fibroso (CIAF) indicando o colágeno do tipo 1.

As imagens foram processadas pelo Software Image Pro Plus®V.4.50 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) que permite quantificar os pontos verdes (colágeno tipo III) e vermelhos da lamina (colágeno do tipo I) e estratificá-los com suas respectivas percentagens (FIGURA 7).

Figura 7 – Ferramenta Image Pro Plus.



Fonte: o autor, 2016.

Exemplo do software fazendo a contagem de pixels em uma fotografia da camada interna do ânulo fibroso (CIAF) e da camada externa do ânulo fibroso (CEAF). São 3 informações para cada imagem: 1 – O número de objetos; 2 – A porcentagem de objetos ocupada na imagem e 3 – A porcentagem da área total da imagem.

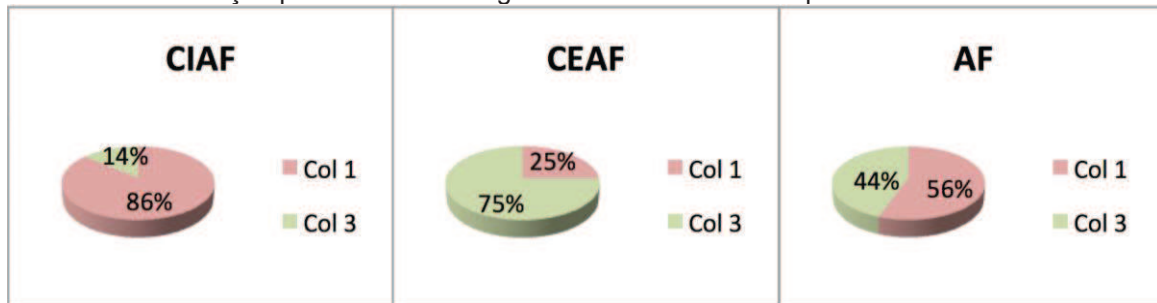
Comparam-se a quantidade e distribuição dos tipos de colágeno e avaliam-se as possíveis diferenças.

Dos 26 coelhos que foram levados a eutanásia, foram extraídos 72 discos intervenção e 115 discos controles, totalizando 187 discos estudados. Levando em consideração que de cada disco foram feitas 6 fotos de campos microscópicos diferentes usando o Software DinoCapture® 2.0 V1.2.7 (AnMo Electronics Corporation), analisamos 1122 fotos no software Image Pro Plus® V.4.50 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

## 5 RESULTADOS

Utilizamos os discos controle para definir o padrão normal de distribuição percentual de colágeno no AF de discos intervertebrais de coelhos. O AF como um todo apresentou uma preponderância do colágeno do tipo I, sendo 56% de colágeno do tipo I e 44% de colágeno do tipo III. Houve predomínio de colágeno do tipo III na camada externa (75%) e de colágeno do tipo I na camada interna (86%) (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 – Distribuição percentual do colágeno no ânulo fibroso Grupo Controle.



Fonte: o autor, 2016.

Legenda: CIAF – Camada Interna do Ânulo Fibroso; CEAF – Camada Externa do Ânulo Fibroso; AF - Ânulo Fibroso; Col 1 – Colágeno do tipo 1; Col 3 – Colágeno do tipo 3.

### 5.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DEFINIDOS PELO USO DAS CÉLULAS TRONCO E O GRUPO CONTROLE

No intuito de comparar os grupos e descobrir possíveis diferenças estatisticamente significantes entre eles, avaliamos individualmente cada variável (CIAF, CEAF e ânulo fibroso como um todo). Para cada tipo de colágeno testou-se a hipótese nula de resultados iguais em todos os grupos definidos pelo uso de célula tronco e controle versus a hipótese alternativa de pelo menos um dos grupos com resultados diferentes dos demais. Na Tabela 5 são apresentadas as estatísticas descritivas de colágeno I e colágeno III para cada variável e para cada grupo, bem como o valor de p do teste estatístico.

Tabela 5 – Comparação entre os grupos injetados com células tronco e o grupo controle.

Variável	Col	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p*
CIAF (Camada Interna do Anulo Fibroso)	I	CT2M	12	73,37	2,39	98,65	29,18	0,044
		CT2S	9	93,36	88,93	98,33	3,28	
		CTCP	7	96,61	92,56	99,56	2,40	
		CTSP	9	91,16	78,09	98,52	6,07	
		Controle	115	86,17	6,23	99,74	19,98	
	III	CT2M	12	26,63	1,35	97,61	29,18	0,044
		CT2S	9	6,64	1,67	11,07	3,28	
		CTCP	7	3,39	0,44	7,44	2,40	
		CTSP	9	8,84	1,48	21,91	6,07	
		Controle	115	13,83	0,26	93,77	19,98	
CEAF (Camada Externa do Anulo Fibroso)	I	CT2M	12	25,85	1,24	68,87	19,58	0,118
		CT2S	9	13,28	2,72	20,99	6,55	
		CTCP	7	14,91	6,38	29,11	8,16	
		CTSP	9	12,05	2,29	36,52	10,54	
		Controle	115	24,99	0,14	93,15	20,24	
	III	CT2M	12	74,15	31,13	98,76	19,58	0,118
		CT2S	9	86,72	79,01	97,28	6,55	
		CTCP	7	85,09	70,89	93,62	8,16	
		CTSP	9	87,95	63,48	97,71	10,54	
		Controle	115	75,01	6,85	99,86	20,24	
AF (Anulo Fibroso como um todo)	I	CT2M	12	49,61	2,16	78,59	22,21	0,306
		CT2S	9	53,32	47,90	59,15	3,62	
		CTCP	7	55,76	51,10	64,33	4,57	
		CTSP	9	51,61	43,83	64,43	6,59	
		Controle	115	55,58	3,44	95,30	16,39	
	III	CT2M	12	50,39	21,41	97,84	22,21	0,306
		CT2S	9	46,68	40,85	52,10	3,62	
		CTCP	7	44,24	35,67	48,90	4,57	
		CTSP	9	48,39	35,57	56,17	6,59	
		Controle	115	44,42	4,70	96,56	16,39	

Fonte: o autor, 2016.

Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na CIAF.

Legenda: Col – Colágeno; n – Número de discos; CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção. (\*) teste não paramétrico de Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ .

Como notamos que houve diferença estatisticamente significativa na CIAF, rejeitamos a hipótese nula para o tipo de colágeno I e III na variável CIAF. Para descobrir quais grupos tiveram diferença estatisticamente significativa entre si, eles foram comparados aos pares. Na Tabela 6 são apresentados os valores de p destas comparações.

Tabela 6 – Diferença estatisticamente significativa entre os grupos na CIAF.

Grupos sob comparação	CIAF (Camada Interna do Ânulo Fibroso)	
	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III
CT2M e CT2S	0,085	0,085
CT2M e CTCP	0,003	0,003
CT2M e CTSP	0,211	0,211
CT2M e Controle	0,015	0,015
CT2S e CTCP	0,183	0,183
CT2S e CTSP	0,657	0,657
CT2S e Controle	0,958	0,958
CTCP e CTSP	0,081	0,081
CTCP e Controle	0,077	0,077
CTSP e Controle	0,580	0,580

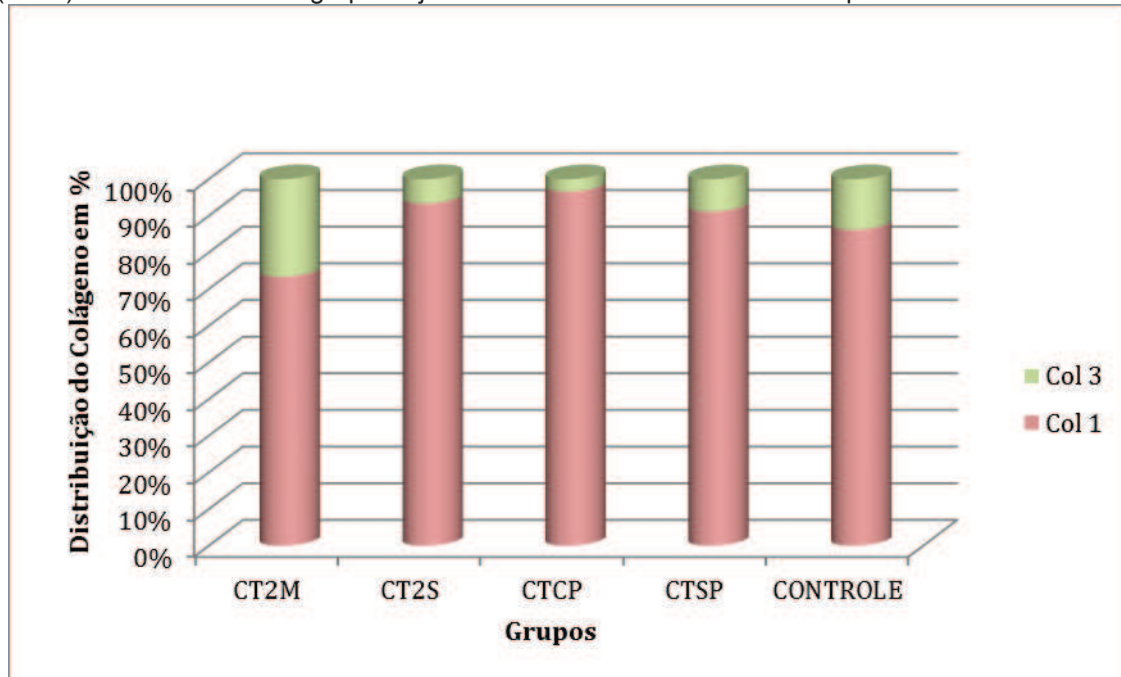
Fonte: o autor, 2016.

A diferença estatisticamente significativa na CIAF ocorreu em 2 ocasiões: 1 – entre os grupos CT2M e CTCP ( $p=0,003$ ); 2 – CT2M e Controle ( $p=0,015$ ).

Legenda: CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção.

Analisando a CIAF, nota-se que a diferença estatisticamente significativa ocorreu em duas ocasiões: 1 – entre os grupos CT2M e CTCP e entre os grupos CT2M e Controle. Os discos controles apresentaram 86,17% de colágeno do tipo I e 13,83% de colágeno do tipo III. Comparado ao grupo controle, o CT2M teve um aumento estatisticamente significativo no colágeno do tipo III ( $p=0,015$ ) demonstrando 73,37% do tipo I e 26,63% de colágeno do tipo III. O CT2M também demonstrou um aumento estatisticamente significativo no colágeno do tipo III ( $p=0,003$ ) quando comparado ao CTCP que demonstrou 96,61% do tipo I e 3,39% do tipo III. Todas as outras possíveis comparações não tiveram diferença estatística. Os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na Tabela 6 e Gráfico 2.

Gráfico 2 – Comparação percentual da distribuição do colágeno na camada interna do ânulo fibroso (CIAF) entre os diferentes grupos injetados com Células Tronco e o Grupo Controle.



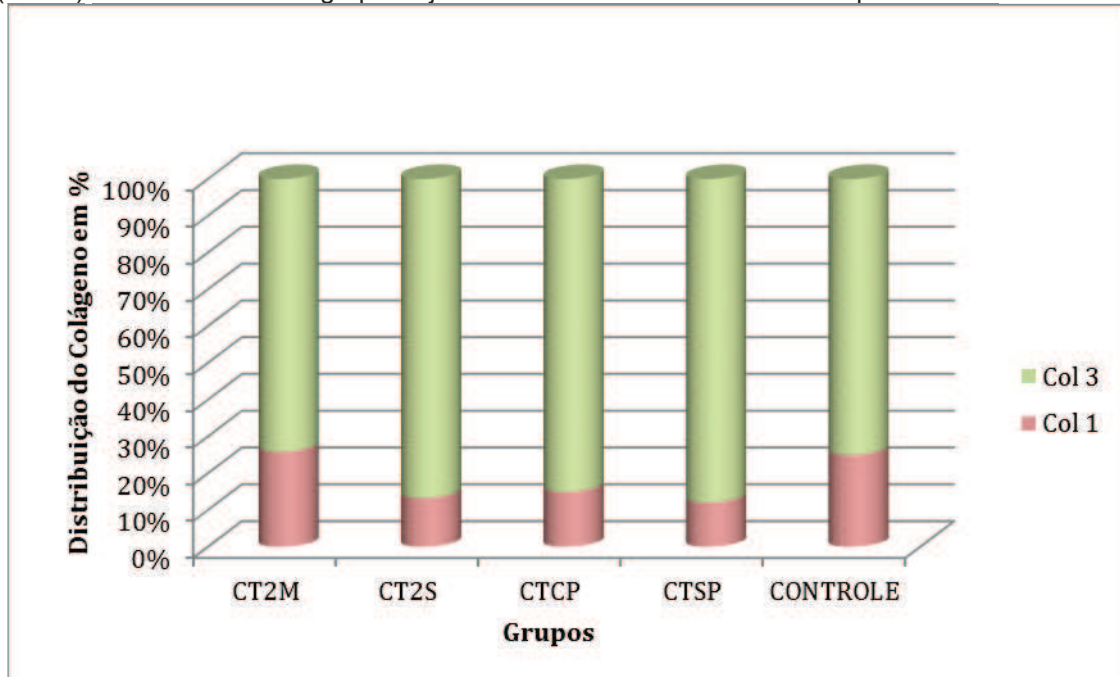
Fonte: o autor, 2016.

Ocorreram diferenças estatisticamente significantes na CIAF em 2 ocasiões: 1 – entre os grupos CT2M e CTCP ( $p=0,003$ ); 2 – CT2M e controle ( $p=0,015$ ).

Legenda: Col 1 – Colágeno do tipo 1; Col 3 – Colágeno do tipo 3; CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção.

Na análise da CEAF não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na Tabela 5 e Gráfico 3.

Gráfico 3 – Comparação percentual da distribuição do colágeno na camada externa do ânulo fibroso (CEAF) entre os diferentes grupos injetados com Células Tronco e o Grupo Controle.



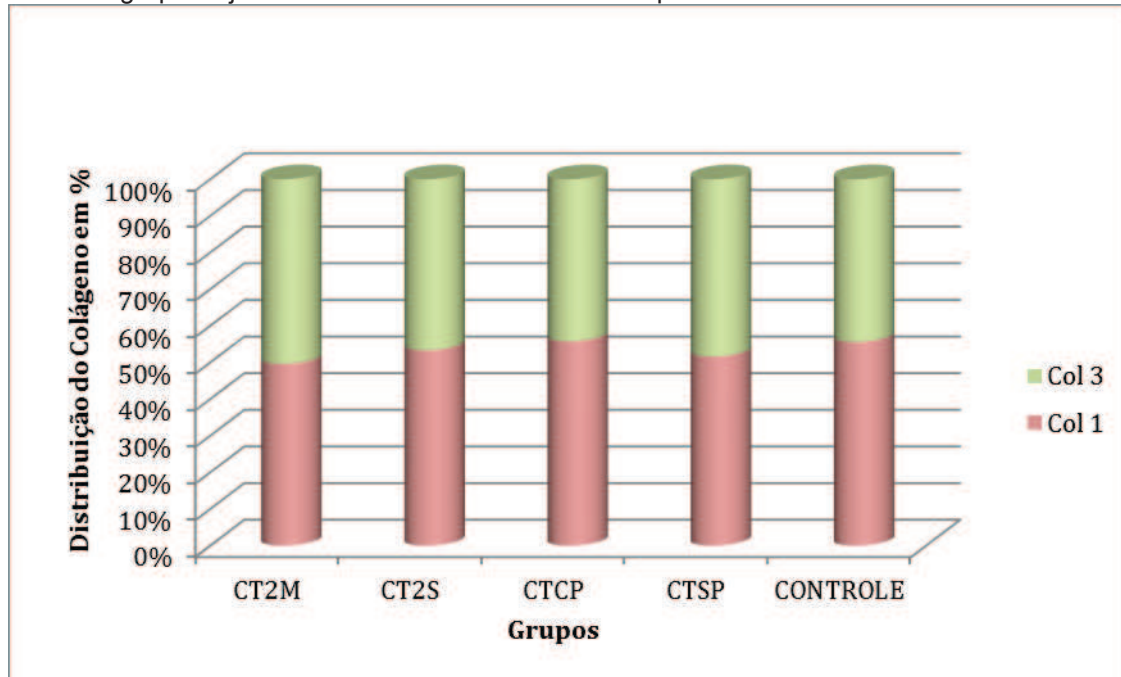
Fonte: o autor, 2016.

Não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Legenda: Col 1 – Colágeno do tipo 1; Col 3 – Colágeno do tipo 3; CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção.

Quando analisamos o AF como um todo também notamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na Tabela 5 e Gráfico 4.

Gráfico 4 – Comparação percentual da distribuição do colágeno no ânulo fibroso (AF) entre os diferentes grupos injetados com Células Tronco e o Grupo Controle.



Fonte: o autor, 2016.

Não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos

Legenda: Col 1 – Colágeno do tipo 1; Col 3 – Colágeno do tipo 3; CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção.

## 5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DEFINIDOS PELO USO DA SOLUÇÃO SALINA E O GRUPO CONTROLE

Para comparar os grupos e descobrir possíveis diferenças estatisticamente significantes entre eles, avaliamos individualmente cada variável (CIAF, CEAF e ânulo fibroso como um todo). Para cada tipo de colágeno testou-se a hipótese nula de resultados iguais em todos os grupos definidos pelo uso de célula tronco e controle versus a hipótese alternativa de pelo menos um dos grupos com resultados diferentes dos demais. Notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na CEAF e no AF. Na Tabela 7 são apresentadas as estatísticas descritivas de colágeno I e colágeno III para cada variável e para cada grupo, bem como o valor de p do teste estatístico.



Tabela 7 – Comparação entre os grupos injetados com células tronco e o grupo controle.

Variável	Col	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p*
CIAF (Camada Interna do Anulo Fibroso)	I	SS2M	9	85,48	42,49	97,52	18,24	0,053
		SS2S	6	95,57	87,71	99,61	4,24	
		SSCP	12	96,86	90,37	99,41	2,77	
		SSSP	8	94,84	85,93	98,70	4,43	
		Controle	115	86,17	6,23	99,74	19,98	
	III	SS2M	9	14,52	2,48	57,51	18,24	0,053
		SS2S	6	4,44	0,39	12,29	4,24	
		SSCP	12	3,14	0,59	9,63	2,77	
		SSSP	8	5,16	1,30	14,07	4,43	
		Controle	115	13,83	0,26	93,77	19,98	
CEAF (Camada Externa do Anulo Fibroso)	I	SS2M	9	39,22	13,14	82,76	20,96	<0,001
		SS2S	6	56,74	8,69	98,69	32,82	
		SSCP	12	9,14	1,55	21,94	6,92	
		SSSP	8	14,96	3,07	60,60	19,75	
		Controle	115	24,99	0,14	93,15	20,24	
	III	SS2M	9	60,78	17,24	86,86	20,96	<0,001
		SS2S	6	43,26	1,31	91,31	32,82	
		SSCP	12	90,87	78,06	98,45	6,92	
		SSSP	8	85,04	39,40	96,93	19,75	
		Controle	115	75,01	6,85	99,86	20,24	
AF (Anulo Fibroso como um todo)	I	SS2M	9	62,35	27,82	88,93	16,10	0,009
		SS2S	6	76,15	48,20	97,37	17,51	
		SSCP	12	53,00	48,64	60,67	3,48	
		SSSP	8	54,90	45,46	79,49	11,11	
		Controle	115	55,58	3,44	95,30	16,39	
	III	SS2M	9	37,65	11,07	72,18	16,10	0,009
		SS2S	6	23,85	2,63	51,80	17,51	
		SSCP	12	47,00	39,33	51,36	3,48	
		SSSP	8	45,10	20,51	54,54	11,11	
		Controle	115	44,42	4,70	96,56	16,39	

Fonte: o autor, 2016.

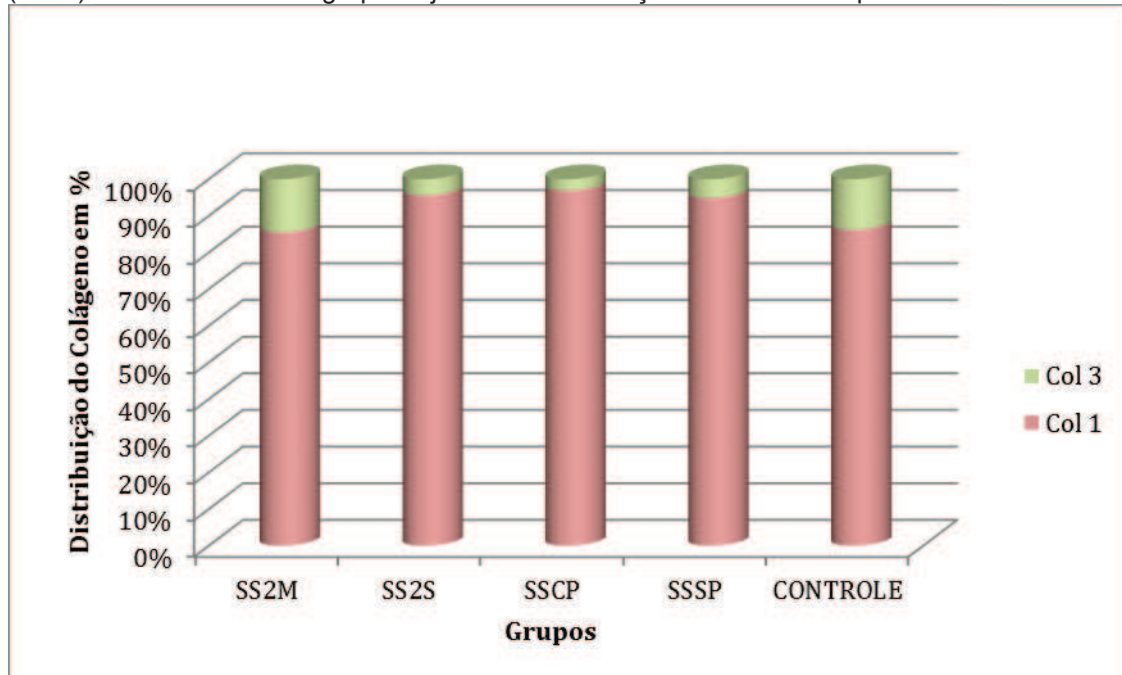
Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na CEAF e no AF

Legenda: Col – Colágeno; n – Número de discos; SS2M – Injeção de SS após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de SS após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de SS no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de SS sem punção.

(\*) teste não paramétrico de Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$

Na análise da CIAF não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na Tabela 7 e Gráfico 5.

Gráfico 5 – Comparação percentual da distribuição do colágeno na camada interna do ânulo fibroso (CIAF) entre os diferentes grupos injetados com Solução Salina e o Grupo Controle.



Fonte: o autor, 2016.

Não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Legenda: Col 1 – Colágeno do tipo 1; Col 3 – Colágeno do tipo 3; SS2M – Injeção de solução salina após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de solução salina após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de solução salina no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de solução salina sem punção.

Na análise da CEAF e do AF notamos que houve diferença estatisticamente significativa. Desta maneira rejeitamos a hipótese nula para o tipo de colágeno I e III nas variáveis CEAF e AF. Para descobrir quais grupos tiveram diferença estatisticamente significativa entre si, eles foram comparados aos pares. Na Tabela 8 são apresentados os valores de p destas comparações.

Tabela 8 – Diferença estatisticamente significativa entre os grupos Solução Salina e Controle na CEAF e no AF.

Grupos sob comparação	CEAF (Camada Externa do Ânulo Fibroso)		AF (Ânulo Fibroso como um todo)	
	Col I	Col III	Col I	Col III
SS2M e SS2S	0,504	0,504	0,389	0,389
SS2M e SSCP	<0,001	<0,001	0,013	0,013
SS2M e SSSP	0,005	0,005	0,038	0,038
SS2M e Controle	0,032	0,032	0,078	0,078
SS2S e SSCP	<0,001	<0,001	0,002	0,002
SS2S e SSSP	0,002	0,002	0,007	0,007
SS2S e Controle	0,009	0,009	0,012	0,012
SSCP e SSSP	0,548	0,548	0,838	0,838
SSCP e Controle	0,003	0,003	0,103	0,103
SSSP e Controle	0,080	0,080	0,271	0,271

Fonte: o autor, 2016.

A diferença estatisticamente significativa na CEAF ocorreu em sete ocasiões: 1 – entre os grupos SS2M e SSCP ( $p < 0,001$ ); 2 – entre os grupos SS2M e SSSP ( $p = 0,005$ ); 3 – entre os grupos SS2M e Controle ( $p = 0,032$ ); 4 – entre os grupos SS2S e SSCP ( $p < 0,001$ ); 5 – entre os grupos SS2S e SSSP ( $p = 0,002$ ); 6 – entre os grupos SS2S e Controle ( $p = 0,009$ ); 7 – entre os grupos SSCP e controle ( $p = 0,003$ );

A diferença estatisticamente significativa no AF ocorreu em cinco ocasiões: 1 – entre os grupos SS2M e SSCP ( $p = 0,013$ ); 2 – entre os grupos SS2M e SSSP ( $p = 0,038$ ); 3 – entre os grupos SS2S e SSCP ( $p = 0,002$ ); 4 – grupos SS2S e SSSP ( $p = 0,007$ ); 5 – entre os grupos SS2S e Controle ( $p = 0,012$ );

Legenda: Col I – Colágeno do tipo I; Col III – Colágeno do tipo III; SS2M – Injeção de SS após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de SS após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de SS no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de SS sem punção.

Ao analisarmos a CEAF (GRÁFICO 6 e TABELA 8), notamos que houve diferença estatisticamente significativa em sete ocasiões.

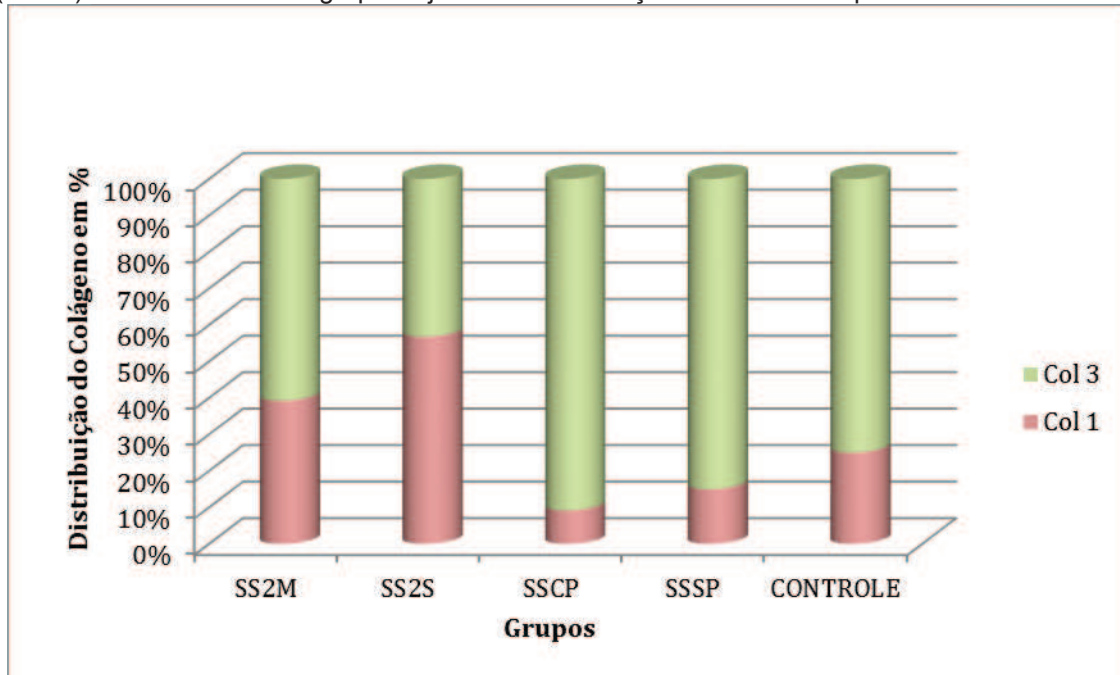
O grupo SS2M apresentou um aumento de colágeno do tipo I (39,22%) quando comparado aos grupos SSCP ( $p < 0,001$ ) com 9,14% de colágeno do tipo I, SSSP ( $p = 0,005$ ) com 14,96% de colágeno do tipo I e controle ( $p = 0,032$ ) com 24,99% de colágeno do tipo I.

O grupo SS2S também apresentou um aumento de colágeno I (56,74%) na CEAF quando comparado aos grupos SSCP ( $p < 0,001$ ), SSSP ( $p = 0,002$ ) e controle ( $p = 0,009$ ).

O grupo SSCP teve uma diminuição de colágeno do tipo I (9,14%) com diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,003$ ) comparado ao grupo controle com 24,99% de colágeno do tipo I.

Todas as outras possíveis comparações não tiveram diferença estatística.

Gráfico 6 – Comparação percentual da distribuição do colágeno na camada externa do ânulo fibroso (CEAF) entre os diferentes grupos injetados com Solução Salina e o Grupo Controle.



Fonte: o autor, 2016.

A diferença estatisticamente significativa na CEAF ocorreu em sete ocasiões: 1 – entre os grupos SS2M e SSCP ( $p < 0,001$ ); 2 – entre os grupos SS2M e SSSP ( $p = 0,005$ ); 3 – entre os grupos SS2M e Controle ( $p = 0,032$ ); 4 – entre os grupos SS2S e SSCP ( $p < 0,001$ ); 5 – entre os grupos SS2S e SSSP ( $p = 0,002$ ); 6 – entre os grupos SS2S e Controle ( $p = 0,009$ ); 7 – entre os grupos SSCP e controle ( $p = 0,003$ );

Legenda: Col 1 – Colágeno do tipo 1; Col 3 – Colágeno do tipo 3; SS2M – Injeção de solução salina após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de solução salina após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de solução salina no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de solução salina sem punção.

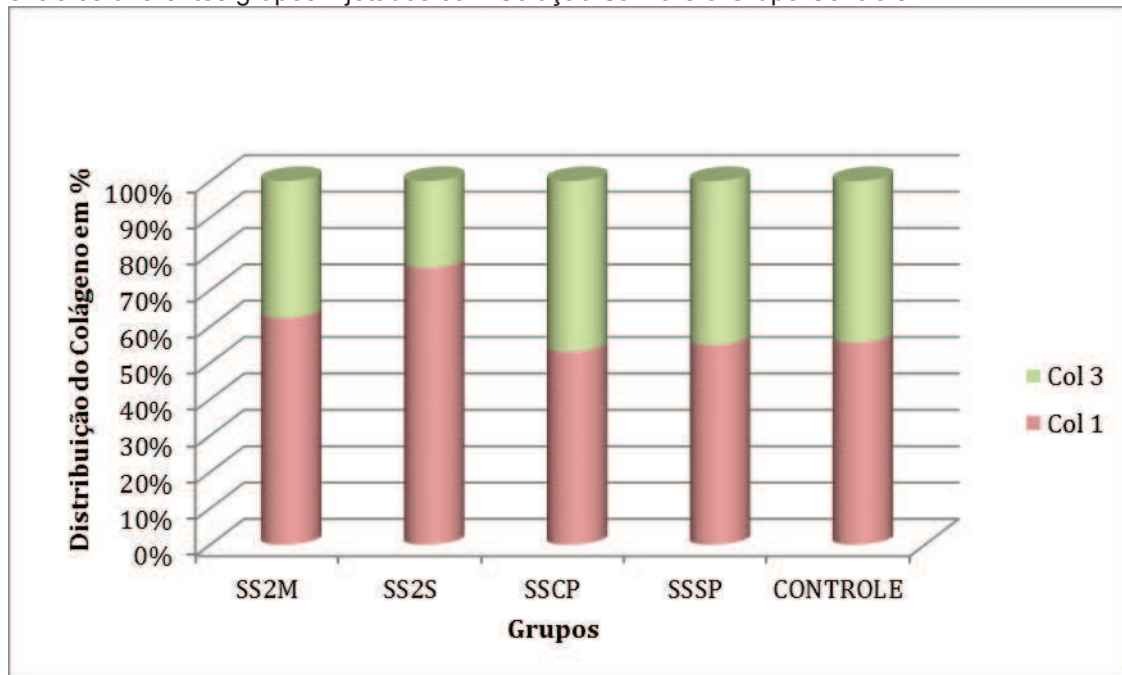
Ao analisarmos o AF como um todo (GRÁFICO 7 e TABELA 8), notamos que houve diferença estatisticamente significativa em cinco ocasiões.

O grupo SS2M apresentou um aumento de colágeno do tipo I (62,35%) quando comparado aos grupos SSCP ( $p = 0,013$ ) com 53,00% de colágeno do tipo I e SSSP ( $p = 0,038$ ) com 54,90% de colágeno do tipo I.

O grupo SS2S também apresentou um aumento de colágeno I (76,15%) no CEAF quando aos grupos SSCP ( $p < 0,002$ ), SSSP ( $p = 0,007$ ) e Controle ( $p = 0,012$ ) com 55,58% de colágeno do tipo I.

Todas as outras possíveis comparações não tiveram diferença estatística.

Gráfico 7 – Comparação percentual da distribuição do colágeno no ânulo fibroso (AF) como um todo entre os diferentes grupos injetados com Solução Salina e o Grupo Controle.



Fonte: o autor, 2016.

A diferença estatisticamente significativa no AF ocorreu em cinco ocasiões: 1 – entre os grupos SS2M e SSCP ( $p=0,013$ ); 2 – entre os grupos SS2M e SSSP ( $p=0,038$ ); 3 – entre os grupos SS2S e SSCP ( $p=0,002$ ); 4 – grupos SS2S e SSSP ( $p=0,007$ ); 5 – entre os grupos SS2S e Controle ( $p=0,012$ );  
 Legenda: Col 1 – Colágeno do tipo 1; Col 3 – Colágeno do tipo 3; SS2M – Injeção de solução salina após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de solução salina após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de solução salina no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de solução salina sem punção.

### 5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DEFINIDOS PELO USO DAS CÉLULAS TRONCO E OS GRUPOS DEFINIDOS PELO USO DA SOLUÇÃO SALINA

Para cada variável e cada tipo de colágeno, em cada um dos momentos de aplicação, testou-se a hipótese nula de resultados de colágeno no grupo com aplicação de célula tronco iguais aos resultados de colágeno no grupo com aplicação de solução salina. Nas Tabelas 9, 10 e 11 são apresentadas as estatísticas descritivas e os valores de  $p$  dos testes estatísticos.

Quando comparamos a CIAF dos grupos injetados com CT com o dos injetados com SS notamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (TABELA 9).

Tabela 9 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco e os grupos definidos pelo uso da solução salina na CIAF.

Variável	Col	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p*
CIAF	I	CT2M	12	73,37	2,39	98,65	29,18	0,286
		SS2M	9	85,5	42,5	97,5	18,2	
	III	CT2M	12	26,63	1,35	97,61	29,18	0,286
		SS2M	9	14,5	2,5	57,5	18,2	
	I	CT2S	9	93,36	88,93	98,33	3,28	0,157
		SS2S	6	95,6	87,7	99,6	4,2	
	III	CT2S	9	6,64	1,67	11,07	3,28	0,157
		SS2S	6	4,4	0,4	12,3	4,2	
	I	CTCP	7	96,61	92,56	99,56	2,40	0,800
		SSCP	12	96,9	90,4	99,4	2,8	
	III	CTCP	7	3,39	0,44	7,44	2,40	0,800
		SSCP	12	3,1	0,6	9,6	2,8	
	I	CTSP	9	91,16	78,09	98,52	6,07	0,149
		SSSP	8	94,8	85,9	98,7	4,4	
	III	CTSP	9	8,84	1,48	21,91	6,07	0,149
		SSSP	8	5,2	1,3	14,1	4,4	

Fonte: o autor, 2016.

Nota-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Legenda: Col – Colágeno; CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção; SS2M – Injeção de SS após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de SS após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de SS no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de SS sem punção; (\*) teste não paramétrico de Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ .

Quando comparamos a CIAF dos grupos injetados com CT com o dos injetados com SS notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,018$ ). Esta diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (56,7%) comparado ao CT2S (13,28%). Os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco e os grupos definidos pelo uso da solução salina na CEAF.

Variável	Col	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p*
CEAF	I	CT2M	12	25,85	1,24	68,87	19,58	0,201
		SS2M	9	39,2	13,1	82,8	21,0	
	III	CT2M	12	74,15	31,13	98,76	19,58	0,201

		<b>SS2M</b>	9	60,8	17,2	86,9	21,0	
	I	<b>CT2S</b>	9	13,28	2,72	20,99	6,55	0,018
		<b>SS2S</b>	6	56,7	8,7	98,7	32,8	
	III	<b>CT2S</b>	9	86,72	79,01	97,28	6,55	0,018
		<b>SS2S</b>	6	43,3	1,3	91,3	32,8	
	I	<b>CTCP</b>	7	14,91	6,38	29,11	8,16	0,063
		<b>SSCP</b>	12	9,1	1,6	21,9	6,9	
	III	<b>CTCP</b>	7	85,09	70,89	93,62	8,16	0,063
		<b>SSCP</b>	12	90,9	78,1	98,5	6,9	
	I	<b>CTSP</b>	9	12,05	2,29	36,52	10,54	0,773
		<b>SSSP</b>	8	15,0	3,1	60,6	19,7	
	III	<b>CTSP</b>	9	87,95	63,48	97,71	10,54	0,773
		<b>SSSP</b>	8	85,0	39,4	96,9	19,7	

Fonte: o autor, 2016.

Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,018$ )

Legenda: Col – Colágeno; CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção; SS2M – Injeção de SS após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de SS após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de SS no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de SS sem punção; (\*) teste não paramétrico de Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ .

Quando comparamos o AF dos grupos injetados com CT com o dos injetados com SS notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,025$ ). Novamente esta diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (76,1%) comparado ao CT2S (53,32%). Os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco e os grupos definidos pelo uso da solução salina no AF.

Variável	Col	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p*
Ânulo Fibroso como um todo	I	<b>CT2M</b>	12	49,61	2,16	78,59	22,21	0,155
		<b>SS2M</b>	9	62,3	27,8	88,9	16,1	
	III	<b>CT2M</b>	12	50,39	21,41	97,84	22,21	0,155
		<b>SS2M</b>	9	37,7	11,1	72,2	16,1	
	I	<b>CT2S</b>	9	53,32	47,90	59,15	3,62	0,025
		<b>SS2S</b>	6	76,1	48,2	97,4	17,5	
	III	<b>CT2S</b>	9	46,68	40,85	52,10	3,62	0,025
		<b>SS2S</b>	6	23,9	2,6	51,8	17,5	

I	CTCP	7	55,76	51,10	64,33	4,57	0,151
	SSCP	12	53,0	48,6	60,7	3,5	
III	CTCP	7	44,24	35,67	48,90	4,57	0,151
	SSCP	12	47,0	39,3	51,4	3,5	
I	CTSP	9	51,61	43,83	64,43	6,59	0,534
	SSSP	8	54,9	45,5	79,5	11,1	
III	CTSP	9	48,39	35,57	56,17	6,59	0,564
	SSSP	8	45,1	20,5	54,5	11,1	

Fonte: o autor, 2016.

Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,025$ ).  
 Legenda: Col – Colágeno; CT2M – Injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S – Injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP – Injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP – Injeção de CT sem punção; SS2M – Injeção de SS após 2 meses da punção; SS2S – Injeção de SS após 2 semanas da punção; SSCP – Injeção de SS no mesmo momento da punção; SSSP – Injeção de SS sem punção; (\*) teste não paramétrico de Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ .



## 6 DISCUSSÃO

O uso de modelos experimentais de degeneração discal em animais permitiu avanços significativos no entendimento das alterações que acontecem na instalação da degeneração discal.

A indução da degeneração discal foi estudada a fundo em outro braço desta linha de pesquisa através de lâminas coradas em hematoxilina-eosina, *fast-green* e *sirius red* (15). No estudo em questão foram usadas lâminas obtidas da mesma espécie e população de coelhos e a indução da degeneração discal foi conduzida igualmente ao presente estudo. A padronização da indução da Degeneração Discal nos coelhos deste experimento através do método de punção com agulha foi eficaz e reproduziu de maneira semelhante aos resultados de outros estudos que utilizaram a mesma técnica (15,53,54,166,169).

O estudo experimental utilizando coelhos apresenta alguns pontos fortes quando comparados a outros animais como cachorros, porcos, ovelhas e ratos. Os coelhos são quadrúpedes com 7 vértebras lombares e são pequenos comparados a maioria dos outros animais. Apesar de quadrúpedes, eles locomovem-se por propulsão sobre as patas traseiras, o que aumenta a carga axial na coluna vertebral (166). Desta forma a degeneração discal pode ocorrer igualmente em todos os níveis lombares. Assim, diferentes níveis no mesmo animal podem ser usados como discos controles e intervenção (170).

A comparação entre estudos experimentais que envolvem degeneração discal experimental é uma tarefa difícil uma vez que diferentes métodos são aplicados para induzir a degeneração. Vários modelos foram utilizados até o momento como a nucleotomia (55-58), aspiração do NP (59-61), carga axial (62), e a punção por agulha direta (63-66) ou percutânea com auxílio de fluoroscopia (67,68). Outros autores fizeram a associação de mais de um destes métodos (69-73). Outra forma utilizada envolve o uso de agentes químicos como a fibronectina e a camptotecina que induzem a apoptose celular (53,171).

Quando usamos a punção por agulha para induzir a degeneração discal, a técnica de punção é importante. Artigos sobre modelos com punção por agulha no AF de coelhos mostram que a taxa de degeneração discal tem correlação positiva com a profundidade da punção e o diâmetro da agulha (53,54,172). Em nossa metodologia usamos a punção com 5 mm de profundidade e a espessura de 40X12

mm, equivalente a 18 G 1 ½. Nosso estudo obteve sucesso em induzir a degeneração discal o que condiz com estudos que demonstram que a degeneração é mais proeminente em punções mais profundas de 5 mm ou mais do que naquelas superficiais com 1 mm (172,173). Quanto a espessura da agulha, estudos demonstram que agulhas de diâmetro mais largo (de 16 a 27 gauge) induzem melhor a degeneração discal (54,173).

Ainda que uma agulha mais larga ou uma punção mais profunda pudesse ter sido utilizada para uma degeneração mais pronunciada, devemos levar em conta o risco de um instrumento deste porte levar a lesão ou irritação das PVs, podendo resultar em instabilidade e formação de osteófitos. Além disso, já foi demonstrado que lesões rotacionais (com o uso de brocas) e lesões por punções maiores de 40% da altura do disco estão propensas a não regenerar independente do método de tratamento utilizado (174-176).

Ao compararmos nossa metodologia histológica com os estudos atuais, podemos observar algumas diferenças com respeito a padronização do método e ao espectro de observação. Isto deve-se principalmente ao fato do presente estudo objetivar o entendimento exclusivo de uma única variável estrutural, o colágeno, localizado em uma localização específica no DIV, o AF. Como podemos observar na Tabela 1, a maioria dos estudos avalia apenas o NP. Poucos estudos buscam entender as modificações do AF na terapia celular em discos degenerados (59,60,64,67,68,71,155,156).

Outra diferença do presente estudo para os demais na literatura esta no plano do corte histológico da análise tecidual. A maioria dos estudos avalia histologicamente o DIV em cortes sagitais que incluem as PVs (57,60-69,72-74,147,156) enquanto nosso estudo avalia cortes axiais o que permite uma visualização ampla e completa do AF. Além disso, em nossa abordagem tentamos diminuir o dano às células, uma vez que os cortes sagitais apresentam uma diferença na consistência entre o osso e o disco no processo de corte, o que é minimizado nos cortes axiais, uma vez que cortam apenas o disco.

Ao comparar a metodologia de preparo e implante celular de nosso estudo com a literatura contemporânea, entendemos que as principais limitações deste estudo foram:

- a) na avaliação do colágeno: O *sirius red* só consegue avaliar o colágeno do tipo I e III. Não utilizamos a imunohistoquímica para avaliar o colágeno do

tipo II, que está relacionado na maioria dos estudos, como fator indicativo de regeneração tecidual;

- b) no preparo celular: Não cultivamos as células, porém usamos as células mononucleares. O número de células injetado pode ser um fator determinante no tratamento;
- c) na injeção celular: Utilizamos o meio de MEMD com SBF como carreador. A maioria dos estudos utiliza hidrogéis ou fibrina associados ou não ao ácido hialurônico.

Grande parte dos estudos contemporâneos utiliza a imunohistoquímica para avaliar os diferentes tipos de colágeno (1,10,38,45,55,60,61,66,68-70,133,141,147,177,178). Como podemos notar, os precursores nesta área datam do final dos anos 90 (1,45). Esta avaliação tem como principal vantagem a sua especificidade, no entanto, em nosso meio, ainda é um método caro. Em nosso estudo, o *sirius red* mostrou-se um método simples e barato para avaliar o colágeno do tipo I e III.

Quanto ao número de células injetados no tratamento, os estudos atuais não apresentam um padrão definido. Alguns sugerem que o cultivo celular é essencial para o sucesso do tratamento, no entanto a maioria dos estudos não discute considerações sobre o número celular ideal. Serigano et al. (60), indicaram que a dose ótima de CTMs autólogas em cachorros é de  $1 \times 10^6$  células. No entanto, Ghosh et al. (74) sugerem que uma dose menor de  $0,1 \times 10^6$  pode ser mais eficaz. Em seu estudo em ovelhas eles verificaram que uma dose menor parece ser mais benéfica dado ao pobre suplemento nutricional do NP. Segundo os autores, um número exacerbado de células neste ambiente com baixa oferta nutricional pode levar as células a competir pelo suplemento o que pode ser destrutivo para o NP devido ao acúmulo de células mortas e produtos de degradação celular (74).

Ainda no cultivo celular, a estimulação da diferenciação discogênica das CTMs também pode ser conseguida por co-cultura. As CTMs podem ser cultivadas diretamente com o contato com células do DIV. Isto têm sido demonstrado tanto com células do CTM-MO (148) quanto com CTM-TA (179). Além do mais, durante co-cultura de CTM-MO e células do NP, foi visualizado que elas comunicam-se de uma maneira bidirecional que resulta em uma melhora no fenótipo das células do NP e também na diferenciação das células CTM (148). Isto sugere que a implantação das CTMs pode exercer efeitos parácrinos nas células do NP degeneradas que residem

no disco e ajudar a restaurar a função celular discal normal, ajudando no processo de reparo.

Em nosso trabalho utilizamos as células tronco mononucleares levando em consideração o fato de serem obtidas após um processo mais simples do que as mesenquimais, pois necessitam apenas passar por dois processos de centrifugação e pelo gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (método de Böyum (167)), ao passo que as CTM necessitam passar por estes mesmos processos e após, ainda, pela cultura e expansão celular por aproximadamente 14 a 16 dias, apresentando assim custos mais elevados e com riscos maiores de contaminação (123).

A injeção de CTM e células mononucleares precursoras mesenquimais tipicamente é segura, ainda que tenha um potencial para formação de osteófitos periféricos o que sugere a importância de um carreador adequado e seguro quando injetamos células nesta região (65). Neste sentido, o carreador pode permitir a célula receber cargas axiais que é importante para estimular a síntese de matriz extracelular além de poder induzir a diferenciação das CTM sem outro estímulo exógeno (140). Diferentes carreadores têm sido utilizados na literatura como o hidrogel de citosan-glicerofosfato (140), hidrogel de polisulfato incorporado em glicol polietileno (180) e outras variações de hidrogéis (181-183) assim como a cola de fibrina (55). Apesar desses estudos defenderem o uso de um carreador celular na aplicação das células tronco, a literatura é controversa neste quesito. Outros estudos utilizam apenas soro fisiológico (155), solução salina com fosfato (66) ou, até mesmo, nenhum carreador (60,68). Em nosso estudo utilizamos o meio de cultura MEMD contendo 20% de soro bovino fetal, método que também tem sido usado com sucesso na literatura (67).

Uma das grandes utilidades dos estudos experimentais na pesquisa da degeneração celular é provar precedentes confiáveis para que ensaios clínicos em humanos possam ser conduzidos com segurança. Estudos experimentais com CTM humanas em animais demonstraram que elas podem sobreviver por, pelo menos, 26 semanas e diferenciar-se em um fenótipo condrocítico, com regulação de colágeno do tipo II, agregans e podem melhorar a aparência discal em imagens de RM (57,68,156).

Neste contexto alguns estudos clínicos têm sido conduzidos (133,158-162). Como podemos observar na Tabela 2, há apenas um estudo com nível I de evidência. O primeiro estudo da terapia celular em discos degenerados de humanos

apresentou resultados insatisfatórios sendo que 80% dos pacientes necessitaram um procedimento cirúrgico no seguimento de um ano (158). No entanto, desde então, os resultados até o momento são encorajadores. A terapia celular parece ser capaz de reduzir os sintomas clínicos e evitar procedimentos cirúrgicos em um prazo de até 2 anos (133,159-162). Ainda assim, apesar da melhora no sinal de T2 na RM (133,159,160), a terapia celular ainda não foi capaz de reestabelecer a altura discal do disco degenerado (160).

## 6.1 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO COLÁGENO NO ÂNULO FIBROSO APÓS LESÃO EXPERIMENTAL

No que diz respeito à distribuição do colágeno no DIV, a maioria dos estudos da literatura refere-se ao DIV como uma estrutura circundada por um AF composto basicamente de colágeno do tipo I enquanto o colágeno do tipo II é mais frequente no NP e nas camadas internas do AF (23,24,46,72,133,178).

Nosso estudo tem a limitação de avaliar apenas o colágeno do tipo I e do tipo III, uma vez que utilizamos o *sirius red* como corante. No entanto, este corante mostrou-se uma ferramenta valiosa da avaliação do colágeno do tipo III. Nossos resultados demonstram que o colágeno do tipo III é comum no AF e é mais abundante na CEAF do que o colágeno do tipo I, fato que não foi atentado pela literatura até a presente data. Alguns estudos sugerem que o colágeno do tipo III é encontrado predominantemente pericelular (23,24). Em nosso estudo verificamos sua presença difundida na CEAF.

Em nossa casuística tomamos o grupo controle como padrão normal de distribuição percentual de colágeno no AF de discos intervertebrais de coelhos. O AF apresentou 56% de colágeno do tipo I e 44% de colágeno do tipo III divididos em 86% do colágeno Tipo I para 14% de colágeno do Tipo III na CIAF e 75% do colágeno Tipo III para 25% de colágeno do Tipo III na CEAF (GRÁFICO 1). Desta maneira notamos que um disco normal apresenta muito mais colágeno do tipo III na CEAF e mais colágeno do tipo I na CIAF.

Os dados do presente estudo demonstram que um dado importante na avaliação da degeneração discal é a diminuição do colágeno do tipo III associada ao aumento de colágeno do tipo I na CEAF.

## 6.2 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA INJEÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS SOBRE ESTAS ALTERAÇÕES

Como podemos observar nos Gráficos 2-7, os grupos apresentaram diferenças entre si e com o grupo controle. Nas Tabelas 5-11 podemos notar que em alguns casos essa diferença foi estatisticamente significativa. Organizando os grupos para as comparações, evidenciamos o seguinte:

### 6.2.1 Comparação entre os grupos definidos pelo uso da solução salina entre si e com o grupo controle

Quando comparamos os grupos injetados com SS entre si e com o grupo Controle, foi demonstrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos na CEAF e no AF.

Na CEAF a diferença estatisticamente significativa ocorreu em sete ocasiões: 1 – entre os grupos SS2M e SSCP ( $p < 0,001$ ); 2 – entre os grupos SS2M e SSSP ( $p = 0,005$ ); 3 – entre os grupos SS2M e Controle ( $p = 0,032$ ); 4 – entre os grupos SS2S e SSCP ( $p < 0,001$ ); 5 – entre os grupos SS2S e SSSP ( $p = 0,002$ ); 6 – entre os grupos SS2S e Controle ( $p = 0,009$ ); 7 – entre os grupos SSCP e controle ( $p = 0,003$ ).

Ao comparar os grupos injetados com solução salina aos pares no AF nota-se que ocorreu diferença estatisticamente significativa em cinco ocasiões: 1 – entre os grupos SS2M e SSCP ( $p = 0,013$ ); 2 – entre os grupos SS2M e SSSP ( $p = 0,038$ ); 3 – entre os grupos SS2S e SSCP ( $p = 0,002$ ); 4 – grupos SS2S e SSSP ( $p = 0,007$ ); 5 – entre os grupos SS2S e Controle ( $p = 0,012$ ).

Analisando estes dados notamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre o SSSP e controle o que era esperado uma vez que o SSSP não foi induzido à degeneração discal. Este dado sugere que a SS não é uma substância que, isoladamente, altere a proporção entre colágeno do tipo I e tipo III e funcionou como o efeito placebo desejado.

Notamos um aumento do colágeno do tipo I na CEAF nos Grupos SS2M e SS2S. Isto ocorreu tanto na comparação com o SSSP como com o grupo controle. Estes dados apontam que a lesão discal causada pela punção por agulha não cicatrizou e não foi influenciada pelo uso da solução salina após duas semanas nem

após 2 meses. Os discos dos grupos SS2M e SS2S evoluíram com degeneração discal.

A grande exceção de nossos resultados na comparação dos grupos injetados com solução salina e o grupo controle encontra-se ao compararmos o SSCP com os outros grupos e o grupo controle. Os grupos apresentam diferença estatisticamente significativa como era esperado, uma vez que o grupo SSCP foi induzido a degeneração com a punção por agulha. No entanto, esta diferença ocorreu com um aumento do colágeno do tipo III na CEAF. Estes dados sugerem que ocorreu uma provável cicatrização da lesão causada pela punção, fato que ganha força ao compararmos o SSCP com o SS2M e SS2S, notamos que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

### **6.2.2 Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco entre si e com o grupo controle**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CTSP e controle. Dessa maneira, presumimos que o uso das células tronco mononucleares sem a indução da degeneração discal não altera a distribuição da proporção de colágeno do tipo I e do tipo III.

Como não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CTCP e controle acredita-se que o uso das células tronco mononucleares concomitante à indução da degeneração discal não altera a distribuição da proporção de colágeno do tipo I e do tipo III. Presume-se que a terapia com células tronco mononucleares foi capaz de cicatrizar a lesão causada pela punção por agulha.

Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e controle. Assim, o uso das células tronco mononucleares concomitante à indução da degeneração discal não altera a distribuição da proporção de colágeno do tipo I e do tipo III. Presume-se que a terapia com células tronco foi capaz de remodelar a lesão causada pela punção por agulha após 2 semanas.

Quando comparamos o CT2M com os demais grupos injetados com CT e com o grupo controle, nota-se que a diferença estatisticamente significativa na CIAF ocorreu em duas ocasiões: 1 – entre os grupos CT2M e CTCP ( $p=0,003$ ); 2 – CT2M e Controle ( $p=0,015$ ). O CT2M mostrou um aumento de colágeno do tipo III

diminuindo a proporção de colágeno do tipo I. Isto mostra um desarranjo em comparação com o grupo controle. Estes dados sugerem que a terapia com células tronco mononucleares não foi capaz de reverter as alterações causadas pela punção por agulha após 2 semanas. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na CEAF e no AF.

### **6.2.3 Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células tronco entre si e com o grupo controle**

Em nosso estudo, analisando o AF como um todo, podemos notar uma diferença entre os grupos que foram injetados 2 meses após a punção. O CT2M (CT), demonstrou um discreto aumento no colágeno do tipo III e foi dividido em 49,61% do tipo I e 50,39% do tipo III. O SS2M, demonstrou 62,35% do tipo I e 37,65% do tipo III. Podemos observar que o grupo que recebeu as CT apresentou uma divisão mais próxima do grupo controle, enquanto o grupo de solução salina teve um aumento expressivo na proporção do colágeno do tipo I, essa desproporção deu-se na CEAF, indicando um desarranjo na estrutura do AF. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

O mesmo aumento do colágeno do tipo I na CEAF e no AF como um todo pode ser observado também na comparação dos grupos injetados 2 semanas após a punção, o CT2S, demonstrou 53,32% do tipo I e 46,68% do tipo III. O SS2S demonstrou 76,15% do tipo I e 23,85% do tipo III. Mais uma vez podemos observar que o grupo que recebeu as CT apresentou uma divisão mais próxima do grupo controle, enquanto o grupo de solução salina teve um aumento expressivo na proporção do colágeno do tipo 1, novamente as custas da CEAF. Na análise estatística notamos que houve diferença estatisticamente significativa tanto na CEAF ( $p=0,018$ ) como no AF ( $p=0,025$ ).

Desta maneira, nossos dados sugerem que a terapia com CT mononucleares foi capaz de remodelar as alterações causadas pela lesão causada pela punção por agulha quando as CT são injetadas após 2 semanas mas não obteve o mesmo êxito quando injetadas após 2 meses. Mesmo que os dados do CT2M tenham sido mais próximos do grupo controle do que os dados do CT2S, esta diferença não teve significância estatística.



No entanto quando comparamos os grupos que foram injetados simultaneamente com a punção, o CTCP demonstrou 55,76% do tipo I e 44,24% do tipo III. Já o SSCP demonstrou 53% do tipo I e 47% do tipo III. Na análise estatística não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Confrontando os grupos com o grupo controle notamos que não há grande diferença, o que sugere que o disco foi capaz de cicatrizar a punção sem desenvolver degeneração discal em ambos os grupos. Aqui encontra-se a maior incompatibilidade com o resultado esperado, uma vez que era esperado que o SSCP demonstra-se degeneração com uma mudança na proporção entre o colágeno no tipo I e o do tipo III após a punção. Isto sugere que a lesão causada nos discos do SSCP cicatrizou.

Ao comparar os grupos injetados sem a punção, O CTSP, demonstrou 51,61% do tipo I e 48,39% do tipo III. Enquanto o SSSP demonstrou 54,9% do tipo I e 45,10% do tipo III. Entre estes grupos notamos que não grande diferença entre os grupos experimentos e o grupo controle, como era esperado, uma vez que eles não foram induzidos à degeneração pela punção. Na análise estatística não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Zhang *et al*, injetaram CTM em coelhos sem induzir a degeneração previamente e os avaliaram posteriormente com Histoquímica com o objetivo de saber se as células do transplante alogênico de CTM poderiam sobreviver e aumentar a quantidade de proteoglicanos nos discos intervertebrais. Eles verificaram que a quantidade de ARN-m de proteoglicanos e colágeno do tipo II aumentou no grupo com CTM e o colágeno do tipo I manteve-se inalterado (154). Estes dados corroboram com os Grupos CTSP e SSSP de nosso estudo que são os grupos que não foram induzidos a degeneração discal em nossa pesquisa, indicando que as CTM não alteram a estrutura do colágeno em discos injetados sem degeneração discal.

## 7 CONCLUSÃO

Quanto a análise das alterações do colágeno no AF após lesão experimental podemos concluir:

- a) o colágeno do tipo III é comum no AF e é mais abundante na CEAF do que o colágeno do tipo I;
- b) a diminuição do colágeno do tipo III associada ao aumento de colágeno do tipo I na CEAF são fatores determinantes de degeneração discal.

Quanto a análise da influência da injeção de células mononucleares autólogas sobre estas alterações podemos concluir:

- a) o tratamento com células mononucleares precursoras mesenquimais é capaz de reduzir as alterações na distribuição do colágeno do tipo I e III no AF de discos degenerados quando aplicados até 2 semanas após a indução da degeneração.

## REFERÊNCIAS

1. Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. Transplantation Proceedings; 1997;22(24):2781-95.
2. Brisby H. Pathology and possible mechanisms of nervous system response to disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88 Suppl 2:68-71.
3. Hughes SPF, Freemont AJ, Hukins DWL, McGregor AH, Roberts S. The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*. 2012. p. 1298-304.
4. Cavalli-Sforza L, Feldman M, Dornbusch S, Chen K-H. Cultural evolution: Anthropology and cultural transmission. *Nature*. Nature Publishing Group; 1983 Jul 14;304(5922):124.
5. Colloca CJ, Keller TS, Moore RJ, Harrison DE, Gunzburg R. Validation of a noninvasive dynamic spinal stiffness assessment methodology in an animal model of intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009 Aug 15;34(18):1900-5.
6. Teraguchi M, Yoshimura N, Hashizume H, Muraki S, Yamada H, Minamide A, et al. Prevalence and distribution of intervertebral disc degeneration over the entire spine in a population-based cohort: The Wakayama Spine Study. *Osteoarthr Cartil*. 2014;22(1):104-10.
7. An HS, Masuda K. Relevance of in vitro and in vivo models for intervertebral disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88 Suppl 2:88-94.
8. Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88 Suppl 2:21-4.
9. US Burden of Disease Collaborators. The state of US health, 1990-2010: burden of diseases, injuries, and risk factors. *JAMA*. 2013;310(6):591-608.
10. Sive JI, Baird P, Jeziorsk M, Watkins A, Hoyland J a, Freemont AJ. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol Pathol*. 2002;55(2):91-7.
11. Videman T, Nurminen M. The occurrence of anular tears and their relation to lifetime back pain history: a cadaveric study using barium sulfate discography. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(23):2668-76.
12. Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, Hoyland JA, O'Brien J, Jayson MI V. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet*. 1997;350(9072):178-81.
13. Rodrigues-Pinto R, Richardson SM, Hoyland J a. An understanding of intervertebral disc development, maturation and cell phenotype provides clues to direct cell-based tissue regeneration therapies for disc degeneration. *European Spine Journal*. 2014;1803-14.
14. Evans C. Potential biologic therapies for the intervertebral disc. *J Bone Joint*

- Surg Am. 2006 Apr;88 Suppl 2:95-8.
15. Vialle EN, Vialle LRG, Arruda ADO. Histomorphometric analysis of experimental disc degeneration. *Glob spine J.* 2012 Sep;2(3):129-36.
  16. Rebelatto C, Carvalho K, Senegaglia A, Hansen P, Guarita-Souza L, Francisco J. Optimization of mononuclear cells harvesting from bone marrow for the experimental model in myocardial transplant. *J Bras Transp.* 2004 Apr;7:1-4.
  17. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002 Dec 1;27(23):2631-44.
  18. Ishihara H, Urban JP. Effects of low oxygen concentrations and metabolic inhibitors on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. *J Orthop Res.* 1999 Nov;17(6):829-35.
  19. Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, Oegema TR. Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. *J Anat.* 1995 Feb;186(Pt 1):43-53.
  20. Errington RJ, Puustjarvi K, White IR, Roberts S, Urban JP. Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc. *J Anat.* 1998 Apr;192(Pt 3):369-78.
  21. Marchand F, Ahmed AM. Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976).* 1990 May;15(5):402-10.
  22. Yu J, Fairbank JCT, Roberts S, Urban JPG. The elastic fiber network of the annulus fibrosus of the normal and scoliotic human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005 Aug 15;30(16):1815-20.
  23. Roberts S, Menage J, Duance V, Wotton S, Ayad S. 1991 Volvo Award in basic sciences. Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage end plate: an immunolocalization study. *Spine (Phila Pa 1976).* 1991 Sep;16(9):1030-8.
  24. Eyre DR, Matsui Y, Wu J-J. Collagen polymorphisms of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):844-8.
  25. Roberts S, Eisenstein SM, Menage J, Evans EH, Ashton IK. Mechanoreceptors in intervertebral discs. Morphology, distribution, and neuropeptides. *Spine (Phila Pa 1976).* 1995 Dec 15;20(24):2645-51.
  26. Edelson JG, Nathan H. Stages in the natural history of the vertebral end-plates. *Spine (Phila Pa 1976).* 1988 Jan;13(1):21-6.
  27. Johnson WE, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connect Tissue Res.* 2001 Jan;42(3):197-207.
  28. Gruber HE, Hanley EN. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine (Phila Pa 1976).* 1998;23(7):751-7.
  29. Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus. *Anat Rec.* 1982;204(4):307-14.

30. Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 4):652-5.
31. Podichetty VK. The aging spine: the role of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2007;53(5):4-18.
32. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(4):R732-45.
33. Richardson SM, Doyle P, Minogue BM, Gnanalingham K, Hoyland J a. Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):R126.
34. Urban JP, McMullin JF. Swelling pressure of the intervertebral disc: influence of proteoglycan and collagen contents. *Biorheology.* 1985;22(2):145-57.
35. Adams MA, McNally DS, Dolan P. "Stress" distributions inside intervertebral discs. The effects of age and degeneration. *J Bone Joint Surg Br.* 1996;78(6):965-72.
36. Gilbert HTJ, Hoyland JA, Richardson SM. Stem cell regeneration of degenerated intervertebral discs: Current status (Update). *Curr Pain Headache Rep.* 2013;17(12).
37. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2000 Dec 1;25(23):3005-13.
38. Roberts S, Bains MA, Kwan A, Menage J, Eisenstein SM. Type X collagen in the human intervertebral disc: an indication of repair or remodelling? *Histochem J.* 1998 Feb;30(2):89-95.
39. Oegema TR, Johnson SL, Aguiar DJ, Ogilvie JW. Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2000 Nov 1;25(21):2742-7.
40. Mwale F, Roughley P, Antoniou J. Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc. *Eur Cell Mater.* 2004 Jan;8:58-63; discussion 63-4.
41. Kauppila LI. Ingrowth of blood vessels in disc degeneration. Angiographic and histological studies of cadaveric spines. *J Bone Joint Surg Am.* 1995 Jan;77(1):26-31.
42. Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, Baird P, Jeziorska M, Knight MTN, et al. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J Pathol.* 2002 Jul;197(3):286-92.
43. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am.* 2006 Apr;88(Suppl 2):10-4.
44. Twomey L, Taylor J. Age changes in lumbar intervertebral discs. *Acta Orthop Scand.* 1985 Dec;56(6):496-9.

45. Nerlich AG, Boos N, Wiest I, Aebi M. Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages. *Virchows Arch.* 1998 Jan;432(1):67-76.
46. Takaishi H, Nemoto O, Shiota M, Kikuchi T, Yamada H, Yamagishi M, et al. Type-II collagen gene expression is transiently upregulated in experimentally induced degeneration of rabbit intervertebral disc. *J Orthop Res.* 1997 Jul;15(4):528-38.
47. Sweat F, Puchtler H, Rpsenthal SI. Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol.* 1964 Jul;78(Jul):69-72.
48. Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol.* 1968 May;50(5):419-23.
49. Montes G, Junqueira L. The use of the Picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86(Suppl 3):1-11.
50. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1978 Jun;41(3):267-74.
51. Anderson DG, Risbud M V, Shapiro IM, Vaccaro AR, Albert TJ. Cell-based therapy for disc repair. *Spine J.* 2005;5(Suppl 6):297S-303S.
52. Key JA, Ford LT. Experimental intervertebral-disc lesions. *J Bone Joint Surg Am.* 1948;30A(3):621-30.
53. Kim KS, Yoon ST, Li J, Park JS, Hutton WC. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005 Jan 1;30(1):33-7.
54. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005 Jan 1;30(1):5-14.
55. Allon A, Aurouer N, Yoo B, Liebenberg E. Structured Co-culture of Stem Cells and Disc Cells Prevent Degeneration in a Rat Model. *Spine J.* 2010;10(12):1089-97.
56. Ganey T, Hutton WC, Moseley T, Hedrick M, Meisel H-J. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009;34(21):2297-304.
57. Henriksson HB, Svanvik T, Jonsson M, Hagman M, Horn M, Lindahl A, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009;34(2):141-8.
58. Omlor GW, Nerlich AG, Wilke H, Pfeiffer M, Lorenz H, Schaaf-keim M, et al. A New Porcine In Vivo Animal Model of Disc Degeneration Pulposus Cells , and Notochordal Nucleus Pulposus Cells to. 2009;34(25):2730-9.
59. Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, Omi H, Watanabe T, Serigano K, et al.

- Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res.* 2008;26(5):589-600.
60. Serigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res.* 2010;28(10):1267-75.
  61. Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, Matsumoto K, Saito H, Tsuji K, et al. Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. *Arthritis Res Ther. BioMed Central* 2010;12(6):R206.
  62. Hee HT, Ismail HD, Lim CT, Goh JCH, Wong HK. Effects of implantation of bone marrow mesenchymal stem cells, disc distraction and combined therapy on reversing degeneration of the intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Br.* 2010;92(5):726-36.
  63. Crevensten G, Walsh AJL, Ananthakrishnan D, Page P, Wahba GM, Lotz JC, et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: Mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):430-4.
  64. Yang F, Leung VYL, Luk KDK, Chan D, Cheung KMC. Mesenchymal stem cells arrest intervertebral disc degeneration through chondrocytic differentiation and stimulation of endogenous cells. *Mol Ther. Nature Publishing Group* 2009;17(11):1959-66.
  65. Vadalà G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: Cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6(5):348-55.
  66. Cai F, Wu X-T, Xie X-H, Wang F, Hong X, Zhuang S-Y, et al. Evaluation of intervertebral disc regeneration with implantation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) using quantitative T2 mapping: a study in rabbits. *Int Orthop.* 2014;39(1):149-59.
  67. Ho G, Leung VYL, Cheung KMC, Chan D. Effect of severity of intervertebral disc injury on mesenchymal stem cell-based regeneration. *Connect Tissue Res.* 2008;49(1):15-21.
  68. Jeong JH, Lee JH, Jin ES, Min JK, Jeon SR, Choi KH. Regeneration of intervertebral discs in a rat disc degeneration model by implanted adipose-tissue-derived stromal cells. *Acta Neurochir (Wien).* 2010;152(10):1771-7.
  69. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, Nomura T, Okuma M, Nishimura K, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen® gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials.* 2003 Sep;24(20):3531-41.
  70. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Nakai T, Ando K, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005;30(21):2379-87.
  71. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M, et al. Regenerative

- effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials*. 2006;27(3):335-45.
72. Hohaus C, Ganey TM, Minkus Y, Meisel HJ. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. *Eur Spine J*. 2008;17(Suppl. 4):492-503.
  73. Yang H, Wu J, Liu J, Ebraheim M, Castillo S, Liu X, et al. Transplanted mesenchymal stem cells with pure fibrinous gelatin-transforming growth factor-Beta1 decrease rabbit intervertebral disc degeneration. *Spine J*. Elsevier Inc 2010;10(9):802-10.
  74. Ghosh P, Moore R, Vernon-Roberts B, Goldschlager T, Pascoe D, Zannettino A, et al. Mesenchymal Precursor Cells and Restoration of the Extracellular Matrix of Degenerate Intervertebral Discs. *J Neurosurg Spine*. 2012;16(5):479-88.
  75. Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet* (London, England). 1999;354(9178):581-5.
  76. Roelofs PDDM, Deyo RA, Koes BW, Scholten RJPM, van Tulder MW. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for low back pain: an updated Cochrane review. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(16):1766-74.
  77. Deyo RA, Von Korff M, Duhrkoop D. Opioids for low back pain. *BMJ*. 2015;350:g6380.
  78. Chaparro LE, Smith S a, Moore RA, Wiffen PJ, Gilron I. Pharmacotherapy for the prevention of chronic pain after surgery in adults. *Cochrane database Syst Rev*. 2013;7(7):CD008307.
  79. Chaparro LE, Furlan AD, Deshpande A, Mailis-Gagnon A, Atlas S, Turk DC. Opioids compared to placebo or other treatments for chronic low-back pain. *Cochrane database Syst Rev*. 2013;8(8):CD004959.
  80. Vorsanger GJ, Xiang J, Gana TJ, Pascual MLG, Fleming RRB. Extended-release tramadol (tramadol ER) in the treatment of chronic low back pain. *J Opioid Manag*. 2008;4(2):87-97.
  81. Staiger TO, Gaster B, Sullivan MD, Deyo RA. Systematic review of antidepressants in the treatment of chronic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(22):2540-5.
  82. Madigan L, Vaccaro AR, Spector LR, Milam RA. Management of symptomatic lumbar degenerative disk disease. *J Am Acad Orthop Surg*. 2009;17(2):102-11.
  83. May S, Donelson R. Evidence-informed management of chronic low back pain with the McKenzie method. *Spine J*. 2008;8(1):134-41.
  84. Staal JB, de Bie RA, de Vet HCW, Hildebrandt J, Nelemans P. Injection therapy for subacute and chronic low back pain: an updated Cochrane review. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(1):49-59.
  85. Chou R, Atlas SJ, Stanos SP, Rosenquist RW. Nonsurgical interventional therapies for low back pain: a review of the evidence for an American Pain Society clinical practice guideline. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(10):1078-93.
  86. DePalma MJ, Slipman CW. Evidence-informed management of chronic low back pain with epidural steroid injections. *Spine J*. 8(1):45-55.



87. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz H, et al. A 2-year follow-up pilot study evaluating the safety and efficacy of op-1 putty (rhbmp-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions. *Eur Spine J.* 2005;14(7):623-9.
88. Southwick WO, Robinson RA. Surgical approaches to the vertebral bodies in the cervical and lumbar regions. *J Bone Joint Surg Am.* 1957;39-A(3):631-44.
89. Lewis G. Viscoelastic properties of injectable bone cements for orthopaedic applications: state-of-the-art review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;98(1):171-91.
90. Ghiselli G, Wang JC, Bhatia NN, Hsu WK, Dawson EG. Adjacent segment degeneration in the lumbar spine. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A(7):1497-503.
91. Guyer RD, McAfee PC, Banco RJ, Bitan FD, Cappuccino A, Geisler FH, et al. Prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemption study of lumbar total disc replacement with the CHARITE artificial disc versus lumbar fusion: Five-year follow-up. *Spine J.* 2009;9(5):374-86.
92. Zigler J, Delamarter R, Spivak JM, Linovitz RJ, Danielson GO, Haider TT, et al. Results of the prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemption study of the ProDisc-L total disc replacement versus circumferential fusion for the treatment of 1-level degenerative disc disease. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007;32(11):1155-62; discussion 1163.
93. Sasso RC, Foulk DM, Hahn M. Prospective, randomized trial of metal-on-metal artificial lumbar disc replacement: initial results for treatment of discogenic pain. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;33(2):123-31.
94. Zigler JE, Glenn J, Delamarter RB. Five-year adjacent-level degenerative changes in patients with single-level disease treated using lumbar total disc replacement with ProDisc-L versus circumferential fusion. *J Neurosurg Spine.* 2012;17(December):1-8.
95. Li Z, Peroglio M, Alini M, Grad S. Potential and limitations of intervertebral disc endogenous repair. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2015;10(4):329-38.
96. Walsh AJL, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004;29(2):156-63.
97. Seta N, Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med.* 2007;56(2):41-7.
98. Kuznetsov S a., Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1133-9.
99. Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002;9(11):754-8.
100. Bark S, Piontek T, Behrens P, Mkalaluh S, Varoga D, Gille J. Enhanced microfracture techniques in cartilage knee surgery: Fact or fiction? *World J Orthop.* 2014;5(4):444-9.

101. Pattappa G, Peroglio M, Sakai D, Mochida J, Benneker LM, Alini M, et al. CCL5/rantes is a key chemoattractant released by degenerative intervertebral discs in organ culture. *Eur Cells Mater*. 2014;27:124-36.
102. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland J a. Expression of cartilage-derived morphogenetic protein in human intervertebral discs and its effect on matrix synthesis in degenerate human nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R137.
103. Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1991;16(3):253-60.
104. Gruber HE, Fisher EC, Desai B, Stasky AA, Hoelscher G, Hanley EN. Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-beta1. *Exp Cell Res*. 1997;235(1):13-21.
105. Osada R, Ohshima H, Ishihara H, Yudoh K, Sakai K, Matsui H, et al. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. *J Orthop Res*. 1996;14(5):690-9.
106. Fei QM, Jiang XX, Chen TY, Li J, Murakami H, Tsai KJ, et al. Changes with age and the effect of recombinant human BMP-2 on proteoglycan and collagen gene expression in rabbit anulus fibrosus cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2006;38(11):773-9.
107. Zhang Y, Phillips FM, Thonar EJ-MA, Oegema T, An HS, Roman-Blas JA, et al. Cell therapy using articular chondrocytes overexpressing BMP-7 or BMP-10 in a rabbit disc organ culture model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(8):831-8.
108. Zhang Y, Anderson DG, Phillips FM, Thonar EJ-M, He T-C, Pietryla D, et al. Comparative effects of bone morphogenetic proteins and Sox9 overexpression on matrix accumulation by bovine anulus fibrosus cells: implications for anular repair. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(23):2515-20.
109. Moon S-H, Nishida K, Gilbertson LG, Lee H-M, Kim H, Hall RA, et al. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(17):1850-5.
110. Imai Y, Okuma M, An HS, Nakagawa K, Yamada M, Muehleman C, et al. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(11):1197-205.
111. Larson JW, Levicoff EA, Gilbertson LG, Kang JD. Biologic modification of animal models of intervertebral disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88(Suppl 2):83-7.
112. Masuda K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors. *Eur Spine J*. 2008;17(Suppl 4).
113. Huang K-Y, Yan J-J, Hsieh C-C, Chang M-S, Lin R-M. The in vivo biological effects of intradiscal recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the injured intervertebral disc: an animal experiment. *Spine (Phila Pa 1976)*.

- 2007;32(11):1174-80.
114. Pirvu TN, Schroeder JE, Peroglio M, Verrier S, Kaplan L, Richards RG, et al. Platelet-rich plasma induces annulus fibrosus cell proliferation and matrix production. *Eur Spine J.* 2014;23(4):745-53.
  115. Akeda K, An HS, Pichika R, Attawia M, Thonar EJ-MA, Lenz ME, et al. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(9):959-66.
  116. Kim H-J, Yeom JS, Koh Y-G, Yeo J-E, Kang K-T, Kang Y-M, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- $\alpha$  and IL-1. *J Orthop Res.* 2014;32(4):551-6.
  117. Leung VYL, Chan D, Cheung KMC. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J.* 2006 Aug;15(Suppl 3):S406-13.
  118. Jandial R, Aryan H, Park J, Taylor W, Snyder E. Stem cell-mediated regeneration of the intervertebral disc: cellular and molecular challenges. *Neurosurg Focus.* 2008 Apr;24:1-5.
  119. Carvalho KAT, Cunha RC, Vialle EN, Osiecki R, Moreira GHG, Simeoni RB, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45+)/CD34(-) after cell therapy in acute spinal cord injury: in exercise training and in sedentary rats. *Transplant Proc.* 2008 Apr;40(3):847-9.
  120. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med. Nature Publishing Group;* 2006 Apr;12(4):459-65.
  121. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002 Jan;30(1):42-8.
  122. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* 2007 Jan;25(1):69-77.
  123. Guarita-Souza LC, Atahyde K, Carvalho T De, Rebelatto C, Hansen P, Furuta M, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Rev Bras Cir* 2005;20(3):270-8.
  124. Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (80- )* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
  125. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18(4):696-704.
  126. Gronthos S, McCarty R, Mrozik K, Fitter S, Paton S, Menicanin D, et al. Heat shock protein-90 beta is expressed at the surface of multipotential mesenchymal precursor cells: generation of a novel monoclonal antibody, STRO-4, with specificity for mesenchymal precursor cells from human and ovine tissues. *Stem Cells Dev.* 2009;18(9):1253-62.
  127. Ghosh P, Wu J, Shimmon S, Zannettino AC, Gronthos S, Itescu S. Pentosan

- polysulfate promotes proliferation and chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived mesenchymal precursor cells. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R28.
128. Gronthos S, Fitter S, Diamond P, Simmons PJ, Itescu S, Zannettino ACW. A novel monoclonal antibody (STRO-3) identifies an isoform of tissue nonspecific alkaline phosphatase expressed by multipotent bone marrow stromal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007;16(6):953-63.
  129. Zannettino ACW, Paton S, Kortesisidis A, Khor F, Itescu S, Gronthos S. Human multipotential mesenchymal/stromal stem cells are derived from a discrete subpopulation of STRO-1bright/CD34<sup>+</sup>/CD45(-)/glycophorin-A-bone marrow cells. *Haematologica.* 2007;92(12):1707-8.
  130. Goldschlager T, Oehme D, Ghosh P, Zannettino A, Rosenfeld J V, Jenkin G. Current and future applications for stem cell therapies in spine surgery. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013;8(5):381-93.
  131. Oehme D, Goldschlager T, Rosenfeld J V, Ghosh P, Jenkin G. The role of stem cell therapies in degenerative lumbar spine disease: a review. *Neurosurg Rev.* 2015;38(3):429-45.
  132. NYH (2012), Brown R. Safety and Preliminary Efficacy Study of Mesenchymal Precursor Cells (MPCs) in Subjects With Lumbar Back Pain. Clin Identifier NCT01290367. :Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show>.
  133. Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ. Clinical experience in cell-based therapeutics: Disc chondrocyte transplantation. A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng.* 2007;24(1 SPEC. ISS.):5-21.
  134. Carragee EJ, Don AS, Hurwitz EL, Cuellar JM, Carrino JA, Herzog R. ISSLS Prize Winner: Does discography cause accelerated progression of degeneration changes in the lumbar disc: a ten-year matched cohort study. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009;34(21):2338-45.
  135. 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.* 2007;9(3):R45.
  136. Potier E, de Vries S, van Doeselaar M, Ito K. Potential application of notochordal cells for intervertebral disc regeneration: An in vitro assessment. *Eur Cells Mater.* 2014;28:68-81.
  137. Cornejo MC, Cho SK, Giannarelli C, Iatridis JC, Purmessur D. Soluble factors from the notochordal-rich intervertebral disc inhibit endothelial cell invasion and vessel formation in the presence and absence of pro-inflammatory cytokines. *Osteoarthr Cartil.* Elsevier Ltd; 2015;23(3):487-96.
  138. Pazzaglia UE, Salisbury JR, Byers PD. Development and involution of the notochord in the human spine. *J R Soc Med.* 1989;82(7):413-5.
  139. Coric D, Pettine K, Sumich A, Boltz MO. Prospective study of disc repair with allogeneic chondrocytes presented at the 2012 Joint Spine Section Meeting. *J Neurosurg Spine.* 2013;18(1):85-95.
  140. Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, Freemont AJ, Hoyland JA. Human

- mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials*. 2008;29(1):85-93.
141. Henriksson H, Thornemo M, Karlsson C, Hägg O, Junevik K, Lindahl A, et al. Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and a potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(21):2278-87.
  142. Brisby H, Papadimitriou N, Brantsing C, Bergh P, Lindahl A, Barreto Henriksson H. The presence of local mesenchymal progenitor cells in human degenerated intervertebral discs and possibilities to influence these in vitro: a descriptive study in humans. *Stem Cells Dev*. 2013;22(5):804-14.
  143. Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Mishima T, Kato S, Grad S, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat Commun. Nature Publishing Group*; 2012;3(May):1264.
  144. Mizrahi O, Sheyn D, Tawackoli W, Ben-David S, Su S, Li N, et al. Nucleus pulposus degeneration alters properties of resident progenitor cells. *Spine J*. 2013;13(7):803-14.
  145. Yasen M, Fei Q, Hutton WC, Zhang J, Dong J, Jiang X, et al. Changes of number of cells expressing proliferation and progenitor cell markers with age in rabbit intervertebral discs. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(5):368-76.
  146. Minogue BM, Richardson SM, Zeef LAH, Freemont AJ, Hoyland JA. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum*. 2010;62(12):3695-705.
  147. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials*. 2006 Jan;27(3):335-45.
  148. Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen Med*. 2010;5(5):701-11.
  149. Tao F, Li F, Li G, Pan F. Differentiation of mesenchymal stem cells into nucleus pulposus cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2008;28(2):156-8.
  150. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998;238(1):265-72.
  151. Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(2):644-52.
  152. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PIJM, Klein-Nulend J. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;342(3):902-8.
  153. Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells

- in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res.* 2006;21(4):626-36.
154. Zhang Y-G, Guo X, Xu P, Kang L-L, Li J. Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 Jan;(430):219-26.
  155. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J. Elsevier Inc;* 2008;8(6):888-96.
  156. Jeong JH, Jin ES, Min JK, Jeon SR, Park CS, Kim HS, et al. Human mesenchymal stem cells implantation into the degenerated coccygeal disc of the rat. *Cytotechnology.* 2009;59(1):55-64.
  157. Omlor GW, Bertram H, Kleinschmidt K, Fischer J, Brohm K, Guehring T, et al. Methods to monitor distribution and metabolic activity of mesenchymal stem cells following in vivo injection into nucleotomized porcine intervertebral discs. *Eur Spine J.* 2010;19(4):601-12.
  158. Haufe SMW, Mork AR. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs. *Stem cells and development.* 2006. p. 136-7.
  159. Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, Koizumi M, Takakura Y. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies. *Spine.* 2010. p. E475-80.
  160. Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sánchez A, García-Sancho J. Intervertebral Disc Repair by Autologous Mesenchymal Bone Marrow Cells: A Pilot Study. *Transplantation.* 2011. p. 822-8.
  161. Pang X, Yang H, Peng B. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of chronic discogenic low back pain. *Pain Physician.* 2014;17(4):E525-30.
  162. Pettine K, Suzuki R, Sand T, Murphy M. Treatment of discogenic back pain with autologous bone marrow concentrate injection with minimum two year follow-up. *Int Orthop.* 2016 Jan;40(1):135-40.
  163. Lipson SJ, Muir H. 1980 Volvo award in basic science. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 1981;6(3):194-210.
  164. Rousseau M-A a, Ulrich J a, Bass EC, Rodriguez AG, Liu JJ, Lotz JC. Stab incision for inducing intervertebral disc degeneration in the rat. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007 Jan 1;32(1):17-24.
  165. Vialle EN, Vialle LR, Bleggi-Torres LF, Sakamoto KS. Histological evaluation of the effects of methylprednisolone on experimental medullary lesion in rats. *Rev Bras Ortop.* 2007;42(4):101-13.
  166. Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, Wallach CJ, Robertson DD, Vogt MT, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005 Jan 1;30(1):15-24.

167. Böyum A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.
168. Ganey T, Libera J, Moos V, Alasevic O, Fritsch K-G, Meisel HJ, et al. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2003 Dec 1;28(23):2609-20.
169. Vialle EN, Vialle LR, Arruda ADO, Riet RN, Krieger ABDQ. Análise radiológica da degeneração discal experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop.* 2009;44(4):313-9.
170. Kim DW, Chun H-J, Lee S-K. Percutaneous needle puncture technique to create a rabbit model of traumatic degenerative disc disease. *World Neurosurg.* 2015 Aug;84(2):438-45.
171. Liu HF, Zhang H, Qiao GX, Ning B, Hu YL, Wang DC, et al. A novel rabbit disc degeneration model induced by fibronectin fragment. *Jt Bone Spine.* 2013;80(3):301-6.
172. Aoki Y, Akeda K, An H, Muehleman C, Takahashi K, Moriya H, et al. Nerve fiber ingrowth into scar tissue formed following nucleus pulposus extrusion in the rabbit anular-puncture disc degeneration model: effects of depth of puncture. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(21):E774-80.
173. Han B, Zhu K, Li F-C, Xiao Y-X, Feng J, Shi Z-L, et al. A simple disc degeneration model induced by percutaneous needle puncture in the rat tail. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008 Aug 15;33(18):1925-34.
174. Zhang Y, Drapeau S, An HS, Markova D, Lenart BA, Anderson DG. Histological features of the degenerating intervertebral disc in a goat disc-injury model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011;36(19):1519-27.
175. Boxberger JI, Auerbach JD, Sen S, Elliott DM. An in vivo model of reduced nucleus pulposus glycosaminoglycan content in the rat lumbar intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;33(2):146-54.
176. Korecki CL, Costi JJ, Iatridis JC. Needle puncture injury affects intervertebral disc mechanics and biology in an organ culture model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;33(3):235-41.
177. Jin L, Liu Q, Scott P, Zhang D, Shen F, Balian G, et al. Annulus fibrosus cell characteristics are a potential source of intervertebral disc pathogenesis. *PLoS One.* 2014 Jan;9(5):e96519.
178. Kandel R, Iu J, Santerre P. Inner and Outer Annulus Fibrosus Cells Exhibit Differentiated Phenotypes and Yield Changes in Extracellular Matrix Protein Composition in Vitro on a Polycarbonate Urethane Scaffold. *Tissue Eng Part A.* 2014 May 29;1-29.
179. Sun Z, Liu ZH, Zhao XH, Sun L, Chen YF, Zhang WL, et al. Impact of direct cell co-cultures on human adipose-derived stromal cells and nucleus pulposus cells. *J Orthop Res.* 2013;31(11):1804-13.

180. Frith JE, Cameron AR, Menzies DJ, Ghosh P, Whitehead DL, Gronthos S, et al. An injectable hydrogel incorporating mesenchymal precursor cells and pentosan polysulphate for intervertebral disc regeneration. *Biomaterials*. 2013;34(37):9430-40.
181. Cheng YH, Yang SH, Liu CC, Gefen A, Lin FH. Thermosensitive hydrogel made of ferulic acid-gelatin and chitosan glycerophosphate. *Carbohydr Polym*. 2013;92(2):1512-9.
182. Francisco AT, Mancino RJ, Bowles RD, Brunger JM, Tainter DM, Chen Y Te, et al. Injectable laminin-functionalized hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials*. 2013;34(30):7381-8.
183. Calderon L, Collin E, Velasco-Bayon D, Murphy M, O'Halloran D, Pandit A. Type II Collagen-Hyaluronan Hydrogel - A Step Towards A Scaffold For Intervertebral Disc Tissue Engineering. *Eur Cells Mater*. 2010;20:134-48.



## **ANEXO A – PRÊMIOS E TÍTULOS DESTA LINHA DE PESQUISA**

### **2011**

2º Melhor Tema Livre: Análise Histológica da Influência do Espaçador Interespinhoso na Terapia Celular com Células-Tronco Mononucleares sobre a Doença Degenerativa Discal em Modelo Animal. XVII Congresso Sulbrasileiro de Ortopedia e Traumatologia - (Foz do Iguaçu).

### **2010**

Melhor Pôster: Confiabilidade de um Método de Análise Histológica da Degeneração Discal Experimental em Coelhos. XI Congresso Paranaense de Ortopedia e XIX Encontro Heinz Rücker e Jornada de Fisioterapia Oeste PR.

### **2009**

Melhor Tema Livre - Avaliação Funcional da Terapia Autóloga de Células-Tronco (CD45+ e CD34-) no Trauma Raquimedular Agudo nos Murinos: Sedentários e Treinados Físicos. XII Congresso da Sociedade Brasileira de Coluna.

### **2009**

Melhor Pôster - Validação de Modelo de Degeneração Discal Experimental em Coelhos. XII Congresso da Sociedade Brasileira de Coluna.

## ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

RBC-1082; No. of Pages 9		ARTICLE IN PRESS	
REV BRAS ORTOP. 2016;xx(x):xxx-xxx			
			
			
			
<b>Artigo original</b>			
<b>Influência da terapia celular mononuclear sobre a degeneração discal em coelhos*</b>			
<b>Rodrigo Caldonazzo Fávaro, André de Oliveira Arruda, Luiz Roberto Gomes Vialle e Emiliano Neves Vialle*</b>			
Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Hospital Universitário Cajuru, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil			
<b>INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO</b>		<b>RESUMO</b>	
Histórico do artigo: Recebido em 9 de fevereiro de 2016 Aceito em 18 de março de 2016 On-line em xxx		Objetivo: Avaliar a influência da injeção de células-tronco mononucleares autólogas sobre as alterações histológicas do colágeno no tecido fibroso do disco intervertebral após lesão experimental. Métodos: Foram submetidos 32 coelhos New Zealand a punção do disco intervertebral lombares seguida de injeção intradiscal de células mononucleares provenientes da crista ilíaca versus injeção de solução salina nos seguintes períodos tempo: dois meses após a lesão (CT2M e SS2M), duas semanas (CT2S e SS2S), imediatamente após a lesão (CTCP e SSCP) e sem induzir a degeneração (CTSP e SS2P). Após dois meses da terapia celular, os animais foram submetidos a eutanásia e as alterações de colágeno nos discos intervertebrais foram avaliadas histologicamente. Resultados: Houve diferença estatisticamente significativa na CIAF entre os grupos CT2S e SS2S (p = 0,018). Essa diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (54,7%) comparado com o CT2S (33,28%). Conclusão: O tratamento com células mononucleares precursoras mesenquimais é capaz de reduzir as alterações na distribuição de colágeno do tipo I e III no AF de discos degenerados de coelhos até duas semanas após a indução da degeneração.	
<b>Palavras-chave:</b> Colágeno Disco intervertebral Terapia celular Histologia Coelho		© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND ( <a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/</a> )	
<b>Keywords:</b> Collagen Intervertebral disc		<b>Influence of mononuclear cell therapy on disk degeneration in rabbits</b> <b>ABSTRACT</b> Objective: The objective of this research was to evaluate the influence of autologous mononuclear stem cells injections on histological changes of collagen in the fibrous annulus of the intervertebral disc after experimental injury.	
* Trabalho desenvolvido no Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Hospital Universitário Cajuru, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. * Autor para correspondência. E-mail: <a href="mailto:rvialle@hotmail.com">rvialle@hotmail.com</a> (E.N. Vialle). <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2016.03.007">http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2016.03.007</a> 0162-3616/© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND ( <a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/</a> ).			
Como citar este artigo: Fávaro RC, et al. Influência da terapia celular mononuclear sobre a degeneração discal em coelhos. Rev Bras Ortop. 2016; <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2016.03.007">http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2016.03.007</a>			

Cell and tissue based therapy  
Histology  
Rabbit

**Methods:** 32 New Zealand rabbits were submitted to intervertebral disc puncture, followed by intradiscal injection of mononuclear cells from the disc crest versus saline injection in the following time periods: two months after the injury (CT2M and SS2M), two weeks (CT2S and SS2S) immediately after injury (CT0P and SS0P), and without inducing degeneration (CTSP and SSSP). Two months after cell therapy, the animals were euthanized and collagen changes in the intervertebral discs were histologically evaluated.

**Result:** There were significant differences in GAG between CT2S and SS2S groups ( $p = 0.018$ ). This difference was due to an increase in type I collagen in SS2S group (56.7%) compared to CT2S (33.28%).

**Conclusion:** Treatment with mesenchymal precursor mononuclear cells reduced changes in the type I and III collagen distribution in rabbits after degenerated discs up to two weeks after the induction of degeneration.

© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introdução

A degeneração discal faz parte do processo de envelhecimento e compreende a perda das características estruturais, biológicas e bioquímicas do disco intervertebral (DIV).<sup>1</sup> Caracterizada-se pela apresentação de células disfuncionais e um decréscimo dos seus componentes intracelulares, leva à perda gradual de fluido intradiscal,<sup>2</sup> isso acarreta uma desidratação discal que inclui uma cascata de fatores que podem levar a sintomas e limitação funcional. O principal sintoma da degeneração discal é a dor lombar.<sup>3</sup>

A etiologia da degeneração discal é multifatorial e tanto fatores ambientais quanto constitucionais exercem papéis com variáveis graus de importância.<sup>4</sup> Esforço físico, má postura, obesidade, ocupação, cigarro, álcool e diabetes estão envolvidos na etiologia da degeneração discal sintomática (DDS).<sup>5</sup>

A dor lombar é a segunda causa de consulta médica nos Estados Unidos. Em todo o mundo, cerca de 60 a 80% das pessoas terão dor lombar durante a vida. Segundo dados americanos, 20 bilhões de dólares ao ano são gastos em custos diretos para tratamento da dor lombar crônica; somados às despesas indiretas, esse valor ultrapassa os 100 bilhões de dólares.<sup>6,7</sup>

A fim de amenizar esse quadro alarmante, diversas estratégias terapêuticas têm sido tentadas, incluindo desde modalidades não invasivas – como medicação anti-inflamatória e fisioterapia – até procedimentos cirúrgicos, como artroscopia, terapia intradiscal eletrotérmica e substituição total do disco. Entretanto, os meios terapêuticos atuais direcionam-se ao tratamento dos sintomas, e não à interrupção e/ou recuperação do processo degenerativo.<sup>8</sup> Como opções de aplicação de novas tecnologias, diversos modelos biológicos de tratamento têm sido propostos. Por meio do uso de elementos celulares, propõe-se a situação direta na modulação do processo degenerativo, por meio da introdução de células potencialmente capazes de reconstruir o tecido lesado.<sup>9</sup>

A partir de um modelo animal previamente estudado e validado nessa instituição de ensino,<sup>10</sup> o objetivo desta pesquisa é avaliar a influência da injeção de células mononucleares autólogas sobre as alterações histológicas do colágeno no ânulo fibroso (AF) do disco intervertebral após lesão experimental.

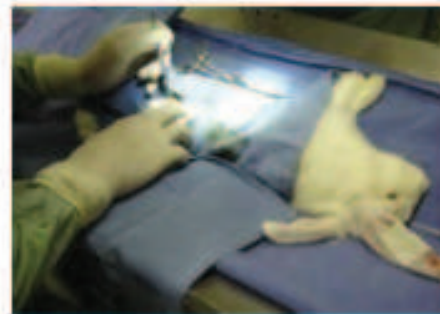
## Material e métodos

Os experimentos deste estudo foram feitos de acordo com as normas e os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea). Os métodos foram baseados em estudos prévios feitos nessa instituição<sup>10-12</sup> e nos trabalhos de Lipson e Muir,<sup>13</sup> Masuda et al.<sup>14</sup> e Rousseau et al.<sup>15</sup>

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná sob o nº 377 e foi executado de acordo com as normas da Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial.

Foram usados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, brancos, da raça New Zealand, entre 2,5 a 3 kg, com cerca de oito meses de vida.

Após o procedimento anestésico padrão (10-12) os coelhos foram posicionados em decúbito lateral direito e submetidos a uma lombotomia com exposição da coluna lombar por via retroperitoneal (Fig. 1), expôs-se a superfície anterior de 5 DIVs lombares consecutivas (L2-L3 a L6-L7). Os três discos experimentais foram puncionados com agulha 40X17 mm (18 G 1 1/2), em uma profundidade de 5 mm, que permaneceu no interior do DIV por 5 segundos (Fig. 2).



**Figura 1 – Preparo cirúrgico.**

Os coelhos anestesiados eram posicionados em decúbito lateral direito e abordados em acesso posterolateral retroperitoneal.

**Tabela 1 – Distribuição dos coelhos nos grupos injetados com células-tronco**

Grupo	Células-tronco			
	CT2M	CT2S	CT2P	CT2E
Coelhos (n = 14)	4	3	4	3
Diátese intervençã (n = 37)	12	9	7	9
Diátese controle (n = 40)	16	14	10	14

CT2M, injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S, injeção de CT após 2 semanas da punção; CT2P, injeção de CT no mesmo momento da punção; CT2E, injeção de CT sem punção.

**Figura 2 – Preparo da agulha para executar a punção.**

Delimitamos os 5 mm finais de uma de 40 x 12 mm (18 G 1/2) a partir de seu bisele e a dobramos no formato de S com o intuito de padronizar a profundidade das punções.

O processo de isolamento e obtenção das células-tronco (CT) mononucleares foi feito por meio da punção aspiração da medula óssea da crista ilíaca e faz parte do protocolo já desenvolvido e consolidado nessa instituição de ensino.<sup>14</sup>

Após coleta e isolamento das células, elas foram introduzidas no DIV do animal com a mesma técnica cirúrgica anteriormente descrita. O material foi colocado no limite superior do DIV previamente perfurado, com, no entanto, agulha de menor calibre 13X4,5 (26 G 1/4). Foram feitos exatamente os mesmos procedimentos nos animais que receberam apenas solução salina (SS) isotônica, injetou-se a quantidade idêntica ao do volume celular, obedeceu-se às mesmas condições citadas.

Foram usados 32 animais divididos em oito grupos: quatro grupos experimentais que receberam células-tronco e quatro grupos controle que receberam solução salina.

Os grupos foram divididos de acordo com o período em que ocorreu a injeção de CT:

- CT2M (quatro animais): transplante de células-tronco mononucleares autólogas após dois meses da cirurgia de indução de degeneração discal;
- CT2S (quatro animais): transplante de células-tronco mononucleares autólogas após duas semanas da cirurgia de indução de degeneração discal;
- CT2P (quatro animais): transplante de células-tronco mononucleares autólogas imediatamente após a cirurgia de indução de degeneração discal.

Essa diferenciação periódica permitirá a análise crítica comparativa quanto ao período mais indicado de implantação da terapia celular frente ao processo degenerativo.

- CT2E (quatro animais), grupo que recebeu as células-tronco mononucleares, mas não passou pelo procedimento cirúrgico de indução de degeneração discal.

Da mesma forma, os animais que fizeram parte do grupo controle foram subdivididos de acordo com o parâmetro em relação ao grupo experimental e receberam injeção de solução salina isotônica, da seguinte forma: SSM (quatro animais), correspondente ao CT2M; SSPS (quatro animais), correspondente a CT2S; SSCP (quatro animais), correspondente a CT2P e SSSP (quatro animais), correspondente a CT2E.

Des 32 coelhos, seis morreram durante o procedimento cirúrgico ou no pós-operatório. Assim, 26 coelhos foram analisados histologicamente, divididos conforme a tabela 1 e 2.

Após oito semanas da injeção de material (CT/solução salina isotônica) no DIV, os coelhos foram sacrificados com injeção em dose excessiva de pentobarbital (90mg/kg) e a coluna vertebral foi coletada para análise histológica.

Após o processamento das amostras obtidas, desidratadas e encastadas em blocos de parafina, seções de seis micra de espessura foram feitas. As seções foram coradas com stain red para a análise do colágeno. Através do microscópio com luz polarizada, foram observados os aspectos referentes à disposição do colágeno nos DIVs com o aumento de 20 vezes.

De cada lâmina preparada com um DIV, foram fotografados seis campos de visão pelo software DinoCapture® 2.0 V1.2.7 (AnMo Electronics Corporation). Os seis campos foram pré-delineados para todos os discos e iniciam na camada mais periférica das lamelas do AF (Fig. 3). Essa convenção permite uma amostra panorâmica e abrangente da estrutura do AF.

As imagens foram processadas pelo software Image Pro Plus® V4.50 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), que permite quantificar os pontos verdes (colágeno tipo III) e vermelhos da lâmina (colágeno de tipo I) e estratificá-los com suas respectivas porcentagens (Fig. 4).

## Resultados

No intuito de comparar os grupos e descobrir possíveis diferenças estatisticamente significantes entre eles, avaliamos individualmente cada variável: camada interna do ânulo fibroso (CIAF); camada interna do ânulo fibroso (CEAF) e ânulo fibroso (AF) como um todo.

Para cada variável e cada tipo de colágeno, em cada um dos momentos de aplicação, testou-se a hipótese nula de

**Tabela 2 – Distribuição dos coelhos nos grupos injetados com solução salina.**

Grupo	Solução salina			
	SS0M	SS2S	SS2P	SS0P
Coelhos (n = 12)	3	2	4	3
Discos intervenção (n = 39)	9	6	12	12
Discos controle (n = 55)	15	10	17	13

SS0M, injeção de solução salina após 7 meses da punção; SS2S, injeção de solução salina após 2 semanas da punção; SS2P, injeção de solução salina no mesmo momento da punção; SS0P, injeção de solução salina sem punção.

resultados de colágeno no grupo com aplicação de células-tronco iguais aos resultados de colágeno no grupo com aplicação de solução salina. Nas tabelas 3-5 são apresentadas as estatísticas descritivas e os valores de p dos testes estatísticos.

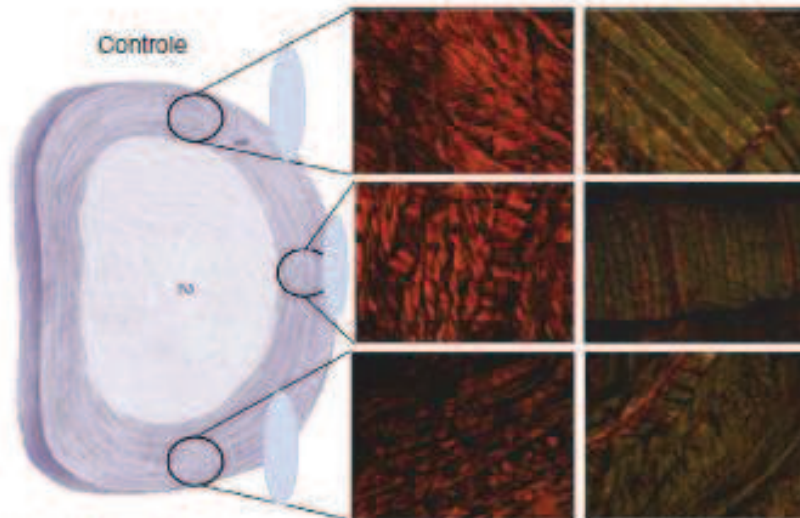
Quando comparamos a CIAF dos grupos injetados com CT com o dos injetados com SS notamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (tabela 3).

Quando comparamos a CEAF dos grupos injetados com CT com o dos injetados com SS notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S (p = 0,018). Essa diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (56,7%) comparado com o CT2S (13,38%). Os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na tabela 4 e figura 5.

Quando comparamos o AF dos grupos injetados com CT com o dos injetados com SS notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S (p = 0,025). Novamente essa diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (76,1%) comparado com o CT2S (53,32%). Os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na tabela 5.

## Discussão

A indução da degeneração discal foi estudada a fundo em outro braço desta linha de pesquisa por meio de lâminas coradas em hematoxilina-eosina, fast-green e sirius red.<sup>10</sup> No estudo em questão foram usadas lâminas obtidas da



**Figura 3 – Ferramenta DinoCapture.**

Ilustração esquemática dos seis campos fotografados em um disco controle. Dois campos ângulo lateral direito do disco, um da porção externa e um da porção interna do ânulo; dois campos ângulo lateral esquerdo do disco, um da porção externa e um da porção interna do ânulo; dois campos centro da porção convexa do disco, um da porção externa e um da porção interna do ânulo. Nota-se a preponderância de verde na camada externa do ânulo fibroso (CEAF) que denota o colágeno do tipo III e de vermelho na camada interna do ânulo fibroso (CIAF) que indica o colágeno do tipo I.

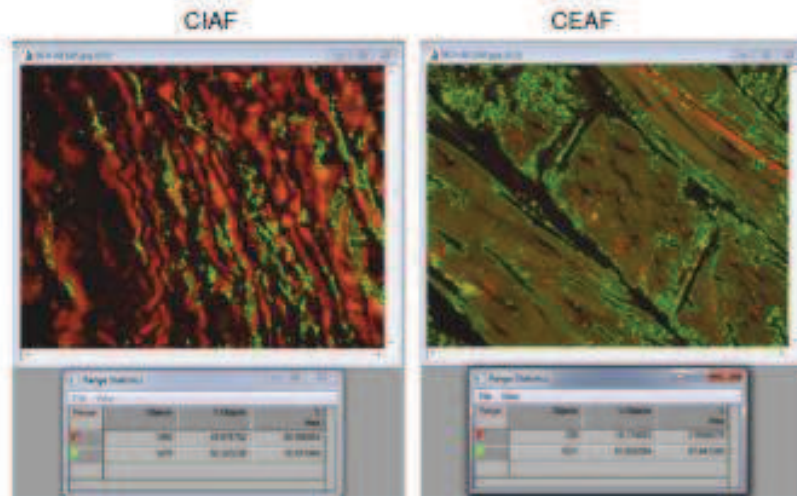


Figura 4 – Ferramenta Image Pro Plus.

Exemplo do software a fazer a contagem de pixels em uma fotografia da camada interna do ânulo fibroso (CIAF) e da camada externa do ânulo fibroso (CEAF). São três informações para cada imagem: 1 – O número de objetos; 2 – A porcentagem de objetos ocupada na imagem e 3 – A porcentagem da área total da imagem.

mesma espécie e população de coelhos e a indução da degeneração discal foi conduzida igualmente ao presente estudo. A padronização da indução da degeneração discal nos coelhos deste experimento por meio do método de punção com agulha foi eficaz e reproduziu de maneira semelhante

os resultados de outros estudos que usaram a mesma técnica.<sup>10,17-20</sup>

Grande parte dos estudos contemporâneos usa a imuno-histoquímica para avaliar os diferentes tipos de colágeno.<sup>1,21-23</sup> Como podemos notar, os procedimentos nessa

**Tabela 3 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células-tronco e os grupos definidos pelo uso da seleção seletiva na CIAF**

Variável	Col	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p*
CIAF	I	CT2M	12	73,37	2,39	98,66	29,18	0,286
		SS2M	9	85,5	42,5	97,5	18,2	
	II	CT2M	12	26,63	1,35	97,63	29,18	0,286
		SS2M	9	14,5	2,5	57,5	18,2	
I	CT2S	CT2S	9	93,36	88,03	98,33	3,28	0,357
		SS2S	6	95,6	87,7	99,6	4,2	
	II	CT2S	9	5,64	1,67	11,07	3,28	0,357
		SS2S	6	4,4	0,4	12,3	4,2	
I	CTCP	CTCP	7	96,61	92,56	99,56	2,40	0,800
		SSCP	12	98,9	90,4	99,4	2,8	
	II	CTCP	7	3,39	0,44	7,44	2,40	0,800
		SSCP	12	3,1	0,5	9,6	2,8	
I	CTSP	CTSP	9	91,16	78,09	98,52	6,07	0,349
		SSSP	8	94,8	85,3	98,7	4,4	
	II	CTSP	9	8,84	1,48	21,95	6,07	0,349
		SSSP	8	5,2	1,3	14,1	4,4	

Nota-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Col, colágeno; CT2M, injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S, injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP, injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP, injeção de CT sem punção; SS2M, injeção de SS após 2 meses da punção; SS2S, injeção de SS após 2 semanas da punção; SSCP, injeção de SS no mesmo momento da punção; SSCP, injeção de SS sem punção.

\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; p<0,05.

Como citar este artigo: Fátima EC, et al. Influência da terapia celular mesenquimal sobre a degeneração discal em coelhos. Rev Bras Ortop. 2016. <http://dx.doi.org/10.1030/j.rbo.2016.03.007>

**Tabela 4 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células-tronco e os grupos definidos pelo uso da solução salina na CEAF**

Variável	Col	Grupo	N	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
CEAF	I	CT2M	12	25,85	1,04	68,07	19,58	0,201
		SS2M	9	39,2	13,3	82,8	23,0	
	II	CT2M	12	78,35	31,33	108,76	19,58	0,201
		SS2M	9	10,8	1,7	80,9	23,0	
	I	CT2S	9	13,28	2,72	20,99	4,55	0,018
		SS2S	8	56,7	8,7	108,7	30,8	
	II	CT2S	9	86,72	79,05	97,38	4,55	0,018
		SS2S	8	45,3	1,3	91,3	30,8	
	I	CT2P	7	14,91	4,38	29,13	8,34	0,063
		SS2P	12	9,1	1,6	21,9	4,9	
	II	CT2P	7	85,06	70,89	95,62	8,34	0,063
		SS2P	12	30,9	28,1	38,5	4,9	
I	CT3P	9	12,06	2,29	36,52	10,94	0,379	
	SS3P	8	15,0	3,1	60,6	19,7		
II	CT3P	9	87,95	65,48	97,71	10,94	0,379	
	SS3P	8	85,0	39,4	95,9	19,7		

Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p < 0,018$ ).

Col, colágeno; CT2M, injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S, injeção de CT após 2 semanas da punção; CT2P, injeção de CT no mesmo momento da punção; CT3P, injeção de CT sem punção; SS2M, injeção de SS após 2 meses da punção; SS2S, injeção de SS após 2 semanas da punção; SS2P, injeção de SS no mesmo momento da punção; SS3P, injeção de SS sem punção.

\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

**Tabela 5 – Comparação entre os grupos definidos pelo uso das células-tronco e os grupos definidos pelo uso da solução salina no AP**

Variável	Col	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Anelo fibroso como um todo	I	CT2M	12	49,61	2,56	78,59	22,21	0,155
		SS2M	9	42,5	27,8	88,9	16,1	
	III	CT2M	12	50,39	21,41	97,84	22,21	0,155
		SS2M	9	37,7	11,1	72,7	16,1	
	I	CT2S	9	53,39	47,99	59,15	3,69	0,005
		SS2S	6	75,1	48,9	97,8	17,5	
	III	CT2S	9	46,68	40,85	52,10	3,69	0,005
		SS2S	6	21,9	0,6	53,8	17,5	
	I	CT2P	7	51,76	51,39	64,53	4,57	0,151
		SS2P	12	53,0	48,6	66,7	3,5	
	III	CT2P	7	44,24	35,67	49,99	4,57	0,151
		SS2P	12	47,0	39,1	55,8	3,5	
I	CT3P	9	51,61	43,83	64,63	6,59	0,534	
	SS3P	8	54,9	45,5	79,3	11,1		
III	CT3P	9	48,39	35,67	56,17	6,59	0,564	
	SS3P	8	45,1	20,5	54,5	11,1		

Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p < 0,005$ ).

Col, colágeno; CT2M, injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S, injeção de CT após 2 semanas da punção; CT2P, injeção de CT no mesmo momento da punção; CT3P, injeção de CT sem punção; SS2M, injeção de SS após 2 meses da punção; SS2S, injeção de SS após 2 semanas da punção; SS2P, injeção de SS no mesmo momento da punção; SS3P, injeção de SS sem punção.

\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

dois datam do fim dos anos 1990.<sup>1,23</sup> Essa avaliação tem como principal vantagem a sua especificidade, no entanto, em nosso meio, ainda é um método caro. Em nosso estudo, o autor nos mostrou-se um método simples e barato para avaliar o colágeno do tipo I e III.

Quanto ao número de células injetadas no tratamento, os estudos atuais não apresentam um padrão definido. Alguns sugerem que o cultivo celular é essencial para o sucesso do tratamento, no entanto a maioria dos estudos não discute considerações sobre o número celular ideal. Serigano et al.<sup>22</sup> indicaram que a dose ótima de células-tronco mesenquimais

(CTM) autólogas em cachorros é de  $1 \times 10^6$  células. No entanto, Ghosh et al.<sup>23</sup> sugerem que uma dose menor de  $0,1 \times 10^6$  pode ser mais eficaz. Segundo os autores, um número exacerbado de células nesse ambiente com baixa oferta nutricional pode levar as células a competir pelo suplemento, o que pode ser destrutivo para o NP devido ao acúmulo de células mortas e produtos de degradação celular.<sup>23</sup>

Ainda no cultivo celular, a estimulação da diferenciação discogênica das CTMs também pode ser conseguida por cocultura. As CTMs podem ser cultivadas diretamente com o contato com células do DVE. Durante a cocultura de CTM

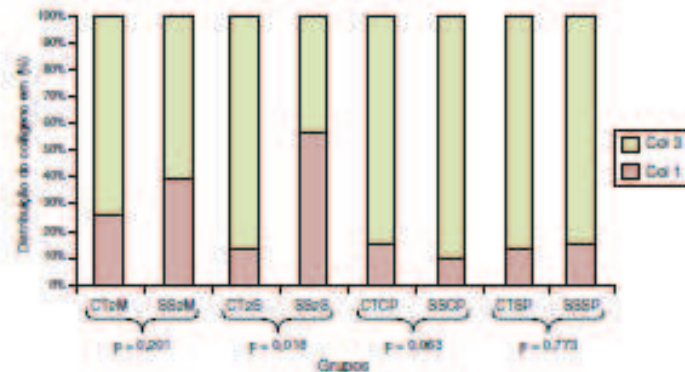


Figura 5 - Comparação percentual da distribuição de colágeno na camada externa do ânulo fibroso (CEAF) entre os diferentes grupos injetados com células-tronco e com solução salina.

Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,018$ ). Col 1, colágeno do tipo I; Col 3, colágeno do tipo III; CT2M, injeção de CT após 2 meses da punção; CT2S, injeção de CT após 2 semanas da punção; CTCP, injeção de CT no mesmo momento da punção; CTSP, injeção de CT sem punção. SS2M, injeção de solução salina após 2 meses da punção; SS2S, injeção de solução salina após 2 semanas da punção; SSCP, injeção de solução salina no mesmo momento da punção; SSSP, injeção de solução salina sem punção.

derivadas de medula óssea e células do NP, foi visualizado que elas se comunicam de uma maneira bidirecional que resulta em uma melhoria no fenótipo das células do NP e também na diferenciação das células CTM.<sup>24</sup> Isso sugere que a implantação das CTMs pode exercer efeitos parácrinos nas células do NP degeneradas que residem no disco e ajudar a restaurar a função celular discal normal e o processo de reparo.

Em nosso trabalho usamos as células tronco mononucleares. Levamos em consideração o fato de serem obtidas após um processo mais simples do que as mesenquimais, pois necessitam apenas passar por dois processos de centrifugação e pelo gradiente de densidade Ficoll-Hypaque, ao passo que as CTM necessitam passar por esses mesmos processos e após, ainda, pela cultura e expansão celular por aproximadamente 14 a 16 dias, apresentando assim custos mais elevados e com riscos maiores de contaminação.<sup>16</sup>

A injeção de CTM e células mononucleares precursoras mesenquimais tipicamente é segura, ainda que tenha um potencial para formação de osteófitos peritêcticos, o que sugere a importância de um carreador adequado e seguro quando injetamos células nessa região.<sup>25</sup> Nesse sentido, o carreador pode permitir a célula receber cargas axiais, importante para estimular a síntese de matriz extracelular e induzir a diferenciação das CTM sem outro estímulo exógeno.<sup>26</sup> Diferentes carreadores têm sido usados na literatura como alguns hidrogéis<sup>26,27</sup> e a cola de fibrina.<sup>28</sup> Apesar de esses estudos defenderem o uso de um carreador celular na aplicação das células tronco, a literatura é controversa nesse quesito. Outros estudos usam apenas soro fisiológico<sup>29</sup> ou, até mesmo, nenhum carreador.<sup>22</sup> Em nosso estudo usamos o meio de cultura MEME com 30% de soro bovino fetal, método que também têm sido usado com sucesso na literatura.<sup>30</sup>

Na análise de nossos resultados, ao examinar o AF como um todo, podemos notar uma diferença entre os grupos que foram injetados dois meses após a punção. O CT2M demonstrou um discreto aumento no colágeno do tipo III e foi dividido em 49,61% do tipo I e 50,39% do tipo III. O SS2M demonstrou 62,35% do tipo I e 37,65% do tipo III. Podemos observar que o grupo que recebeu as CT apresentou uma divisão mais próxima dos grupos que não foram induzidos à degeneração discal, enquanto o grupo de solução salina teve um aumento expressivo na proporção de colágeno do tipo I. Essa desproporção deu-se na CEAF e indicou um desarranjo na estrutura do AF. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

O mesmo aumento do colágeno do tipo I na CEAF e no AF como um todo pode ser observado também na comparação dos grupos injetados duas semanas após a punção. O CT2S demonstrou 53,33% do tipo I e 46,68% do tipo III. O SS2S demonstrou 76,15% do tipo I e 23,85% do tipo III. Mais uma vez podemos observar que o grupo que recebeu as CT apresentou uma divisão mais próxima dos grupos que não foram induzidos à degeneração discal, enquanto o grupo de solução salina teve um aumento expressivo na proporção de colágeno do tipo I, novamente à custa da CEAF. Na análise estatística notamos que houve diferença estatisticamente significativa tanto na CEAF ( $p=0,018$ ) como no AF ( $p=0,025$ ).

Nossos dados sugerem que a terapia com CT mononucleares foi capaz de remodelar as alterações causadas pela lesão causada pela punção por agulha quando as CT são injetadas após duas semanas, mas não obteve o mesmo efeito quando injetadas após dois meses. Mesmo que os dados do CT2M tenham sido mais próximos dos grupos que não foram induzidos à degeneração discal do que os dados do CT2S, essa diferença não teve significância estatística.



No entanto, quando comparamos os grupos que foram injetados simultaneamente com a punção, o CTCP demonstrou 55,76% do tipo I e 44,24% do tipo III. Já o SSCP demonstrou 53% do tipo I e 47% do tipo III. Aqui encontra-se a maior incompatibilidade de resultados, uma vez que era esperado que o SSCP demonstrasse degeneração com uma mudança na proporção entre o colágeno do tipo I e o do tipo III após a punção. Isso sugere que a lesão causada nos discos do SSCP cicatrizou.

Ao comparar os grupos injetados sem a punção, o CTSP demonstrou 51,61 do tipo I e 48,39% do tipo III. Enquanto o SSSP demonstrou 54,0% do tipo I e 45,10% do tipo III. Entre estes grupos notamos que não houve grande diferença, como era esperado, uma vez que eles não foram induzidos à degeneração pela punção. Na análise estatística não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esses dados indicam que as CTM não alteram a estrutura do colágeno em discos injetados sem degeneração discal.

### Conclusão

O tratamento com células mononucleares precursoras mesenquimais é capaz de reduzir as alterações na distribuição do colágeno do tipo I e III no AF de discos degenerados de coelhos até duas semanas após a indução da degeneração.

### Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

### REFERÊNCIAS

- Nerlich AG, Schürch JD, Boos N. 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22(24):2781-95.
- Bretby H. Pathology and possible mechanisms of nervous system response to disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:68-71.
- Hughes SP, Freemont AJ, Hukins DW, McGregor AH, Roberts S. The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(10):1298-304.
- Cavalli-Storz L, Feldman M, Dornbusch S, Chen KH. Cultural evolution. Anthropology and cultural transmission. *Nature*. 1983;304(5927):124.
- Colloca CJ, Keller TS, Moore JU, Harrison DE, Gunzburg R. Validation of a noninvasive dynamic spinal stiffness assessment methodology in an animal model of intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(18):1900-5.
- Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:21-4.
- Murray CJ, Atkinson C, Ikhsal K, Barber C, Bustinza R, Chou D, et al. The state of US health, 1990-2010: burden of diseases, injuries, and risk factors. *JAMA*. 2013;310(5):591-608.
- An HS, Masuda K. Relevance of in vitro and in vivo models for intervertebral disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:88-94.
- Evans C. Potential biologic therapies for the intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:95-8.
- Vialle EN, Vialle LR, Arruda AD. Histomorphometric analysis of experimental disc degeneration. *Global Spine J*. 2012;22(3):129-36.
- Vialle EN, Vialle LR, Bleggi-Torres LF, Sakamoto KS. Histological evaluation of the effects of methylprednisolone on experimental modulatory lesion in rats. *Rev Bras Ortop*. 2007;42(4):101-13.
- Carvalho KA, Cunha RC, Vialle EN, Ostede B, Moreira GH, Simoes RB, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45+/VC2/34/-) after cell therapy in acute spinal cord injury: in exercise training and in sedentary rats. *Transplant Proc*. 2008;40(3):847-9.
- Lipson SJ, Muir H. 1980 Volvo award in basic science. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1981;6(3):194-210.
- Masuda K, Aota Y, Mochizumi C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):5-14.
- Rousseau MA, Ulrich JA, Sues EC, Rodriguez AG, Liu H, Lotz JC. Stab incision for inducing intervertebral disc degeneration in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(1):17-24.
- Guarita-Souza LC, Alatydy K, Carvalho T, Rebelatto C, Hansen P, Paruta M, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Rev Bras Cir*. 2005;20(3):270-8.
- Kim DW, Chun JH, Lee SK. Percutaneous needle puncture technique to create a rabbit model with traumatic degenerative disk disease. *World Neurosurg*. 2015;84(2):438-45.
- Vialle E, Vialle LR, Arruda ADC, Riet RN, Krieger ABD. Análise radiológica da degeneração discal experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop*. 2009;44(4):513-9.
- Sobajima S, Kompei H, Kim JS, Wallach CJ, Robertson DD, Vogt MT, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;30(1):15-24.
- Kim KS, Yoon ST, Lee J, Park JS, Hutton WC. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):33-7.
- Nerlich AG, Boos N, Wiest I, Aebi M. Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages. *Virchows Arch*. 1998;432(1):67-76.
- Serrigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res*. 2010;28(10):1267-75.
- Ghosh P, Moore R, Vernon-Roberts B, Goldschlager T, Pascoe D, Zannettino A, et al. Immunoselected STRO-3+ mesenchymal precursor cells and restoration of the extracellular matrix of degenerate intervertebral discs. *J Neurosurg Spine*. 2012;16(5):479-88.
- Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen Med*. 2010;5(5):701-11.
- Vadala G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Dentaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012;6(5):348-55.

26. Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, Fressmont AJ, Hoyland JA. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials*. 2008;29(1):85-93.
27. Prifti JE, Cameron AB, Menzies DJ, Chesh F, Whitehead DJ, Granthos S, et al. An injectable hydrogel incorporating mesenchymal precursor cells and pentosan polysulphate for intervertebral disc regeneration. *Biomaterials*. 2013;34(37):9430-40.
28. Allen AA, Aumutr N, Yoo BS, Liebenberg EC, Buser Z, Lutz JC. Structured coculture of stem cells and disc cells prevent disc degeneration in a rat model. *Spine J*. 2010;20(12):1089-97.
29. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J*. 2008;18(5):888-95.
30. Ho C, Leung VY, Cheung KM, Chan D. Effect of severity of intervertebral disc injury on mesenchymal stem cell-based regeneration. *Connect Tissue Res*. 2008;49(1):15-21.