# **MARCELO FERRAZ DE CAMPOS**

# POTENCIAL UTILIZAÇÃO DE CULTURA 3D DE DISCO INTERVERTEBRAL DEGENERADO EM TERAPIA CELULAR INTRADISCAL

Tese apresentada ao Centro Universitário Lusíada, para obtenção do título de Livre Docente, junto ao Departamento de Cirurgia.

Santos 2019 FUNDAÇÃO LUSÍADA CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADA

MARCELO FERRAZ DE CAMPOS

# POTENCIAL UTILIZAÇÃO DE CULTURA 3D DE DISCO INTERVERTEBRAL DEGENERADO EM TERAPIA CELULAR INTRADISCAL

Santos 2019

Campos, Marcelo Ferraz de **Potencial utilização de cultura 3D de disco intervertebral degenerado em terapia celular intradiscal /** Marcelo Ferraz de Campos. – Santos, 2019.

118f.

Tese (Livre-Docência) – Centro Universitário Lusíada. Departamento de Cirurgia.

Título em inglês: Potential use of 3D culture of degenerated intervertebral disc in intradiscal cell therapy.

1. Coluna vertebral. 2. Regeneração. 3. Células-tronco. 4. Hérnia.

Dedico este trabalho à minha querida esposa, Silvia Cristina, com todo meu amor.

## AGRADECIMENTOS

*"Para conseguir a amizade de uma pessoa digna, é preciso desenvolvermos em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos" (Sócrates).* 

Meus agradecimentos, portanto, aos meus professores e amigos, a quem muito admiro:

Ao Professor Doutor Abrão Rapoport, Diretor Técnico do Hospital Heliópolis, por me receber no início da minha formação e ter permitido a minha progressão científica.

Ao Professor Doutor Jozias de Andrade Sobrinho *(in memoriam)*, que sempre teve uma palavra amiga nas mais diversas ocasiões.

Ao Professor Doutor Rogério Aparecido Dedivitis, pelo empenho e confiança depositados em mim para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Otávio Alberto Curioni, pelo grande incentivo e orientação para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal, pelos ensinamentos, dedicação e paciência, além da inestimável colaboração na realização de minhas pesquisas.

Ao Professor Doutor Luiz Carlos de Abreu, pela amizade, confiança e ensinamentos.

Ao Professor Doutor Douglas Alberto Ferraz de Campos, meu pai e meu exemplo.

Ao Professor Doutor José Carlos Rodrigues Junior, que participou não somente do desenvolvimento desta tese, mas também das minhas realizações.

Ao Professor Doutor João Carlos de Campos Guerra, por estar sempre presente nos momentos importantes da minha vida.

# "Chi dorme non piglia pesci."

(Jozias de Andrade Sobrinho)

#### RESUMO

CAMPOS, Marcelo Ferraz de. **Potencial utilização de cultura 3D de disco intervertebral degenerado em terapia celular intradiscal.** 2019. 116 f. Tese (Livredocência em Cirurgia] - Centro Universitário Lusíada, Departamento de Cirurgia, Santos, 2019.

Introdução: Cerca de 10 milhões de brasileiros são acometidos por dor lombar, cuja intensidade pode variar de um leve desconforto a dores incapacitantes e de longa duração. Em alguns casos, pode conduzir o paciente à invalidez permanente. O tratamento de pacientes acometidos por degeneração do disco intervertebral inclui ressecção cirúrgica, bloqueio de raízes nervosas e fisioterapia. Entretanto, tais tratamentos apenas aliviam os sintomas e não impedem que ocorra degeneração dos discos intervertebrais. Objetivo: O objetivo do estudo foi padronizar uma metodologia adequada para a obtenção de culturas celulares tridimensionais (culturas 3D), a partir de ressecções cirúrgicas do núcleo pulposo de discos intervertebrais degenerados. **Resultados**: A identificação de marcadores específicos nas culturas 3D obtidas mostrou intensa marcação de agrecam, um proteoglicano característico de condrócitos diferenciados. Houve também intensa marcação nas culturas 3D da proteína CRTAC1, que representa um marcador de matriz extracelular característico de diferenciação em condrócitos. A alta expressão de CD44 observada nas culturas 3D evidenciaram a presença de células-tronco da notocorda. A distribuição de biglicam, TGF-β e colágeno reforçam a presença de constituintes da matriz extracelular, característicos de núcleo pulposo de disco intervertebral. **Conclusão**: Os resultados obtidos indicam que a utilização de culturas tridimensionais obtidas de núcleo pulposo de discos intervertebrais degenerados representa uma alternativa terapêutica bastante promissora, visto que tais células se caracterizam por alta capacidade de proliferação e diferenciação em condrócitos, produzindo também intensa matriz extracelular.

Palavras-chave: Coluna vertebral. Regeneração. Células-tronco. Hérnia.

### ABSTRACT

CAMPOS, Marcelo Ferraz de. **Potential use of 3D culture of degenerated intervertebral disc in intradiscal cell therapy.** 2019. 116 f. Thesis. Centro Universitário Lusíada, Departamento de Cirurgia, Santos, 2019.

Introduction: About 10 million Brazilians are affected by low back pain, which can range from mild discomfort to disabling and long-lasting pain. In some cases, it may lead the patient to permanent disability. The treatment of patients affected by intervertebral disc degeneration includes surgical resection, nerve root block, and physiotherapy. However, such treatments only relieve the symptoms and do not prevent degeneration of the intervertebral discs. **Objective:** The objective of this study was to standardize an adequate methodology to obtain three-dimensional cell cultures (3D cultures) from surgical resections of the nucleus pulposus of degenerate intervertebral discs. Results: Identification of specific markers in 3D cultures obtained showed intense labeling of aggrecan, a characteristic proteoglycan of differentiated chondrocytes. There was also intense labeling in the 3D cultures of the CRTAC1 protein, which represents an extracellular matrix marker characteristic of chondrocyte differentiation. The high expression of CD44 observed in the 3D cultures evidenced the presence of notochord stem cells. The distribution of byglicam, TGF- $\beta$ , and collagen reinforce the presence of extracellular matrix constituents characteristic of nucleus pulposus of the intervertebral disc. **Conclusion**: The results obtained indicate that the use of three - dimensional cultures obtained from nucleus pulposus of degenerate intervertebral discs represents a very promising therapeutic alternative, since these cells are characterized by a high capacity of proliferation and differentiation in chondrocytes, also producing an intense extracellular matrix.

Keywords: Spine. Regeneration. Stem cells. Hernia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	1 – Corte longitudinal de um segmento da coluna vertebral1	6
Figura	2 – Esquema da estrutura anatômica do disco intervertebral1	7
Figura	<ul> <li>3 – Esquema da diferenciação dos folhetos embrionários durante a embriologia da formação do disco intervertebral e outros tecidos</li></ul>	8
Figura	<ul> <li>4 – Desenho esquemático, mostrando a derivação do disco intervertebral a partir dos somitos.</li> </ul>	s 9
Figura	5 – Diagrama esquemático mostrando componentes da matriz extracelular do disco intervertebral	5
Figura	6 – Estrutura dos sacarídeos constituintes dos glicosaminoglicanos2	7
Figura	7 – Região de ligação entre cadeias de glicosaminoglicanos e esqueleto proteico dos proteoglicanos	s 8
Figura	8 – Estrutura e localização dos Proteoglicanos29	9
Figura	9 – Mecanismo de ação da heparanase-1 (HPSE)4	2
Figura	10 – Esquema dos eventos de degeneração do disco intervertebral 4	4
Figura	11 – Principais diferenças entre os diferentes métodos de cultivo celular5	1
Figura	12 – Diferentes métodos de cultivo celular 3D	3
Figura	13 – Diferentes tipos de Cultura 3D, utilizando nanopartículas de ferro	4
Figura	14 – Aplicações da cultura 3D5	5
Figura	15 – Esquema que exemplifica o efeito RAMAN6	0
Figura	16 – A: Ressonância Nuclear Magnética T1 pré-operatória; B: imagem intraoperatória; C: Raio X da coluna cervical pós-operatório6	7
Figura	<ol> <li>17 – Representação esquemática do ensaio experimental para obtenção de cultura tridimensional (3D)66</li> </ol>	8

Figura 18 –	Marcação em cultura dimensional e tridimensional de disco intervertebral7	5
Figura 19 –	Marcação de CRTAC1 em cultura tridimensional de disco intervertebral7	6
Figura 20 –	Microscopia confocal de cultura tridimensional de disco intervertebral7	7
Figura 21 –	Células-tronco mesenquimais diferenciadas para condrócito7	8
Figura 22 –	Comparação de cultura dimensional (A) e tridimensional (B) de células obtidas de núcleo pulposo de disco intervertebral8	0
Figura 23 –	Marcação de lipídeo (RAMAN) e colágeno pelo método de segundo harmônico (SHG)8	1
Figura 24 –	Corte histológico das esferas de núcleo pulposo (NP)8	2

# LISTA DE SIGLAS

ADSC	Células-tronco derivadas de tecido adiposo (Adipose-derivated stem cells)
AF	Ânulo fibroso
ASN	Asparagina
BMP	Proteínas morfogênicas ósseas (Bone morphogenetic proteins)
BMSC	Células-tronco derivadas da medula óssea (Bone mesenchymal stem cells)
CARS	Coherent anti-stokes Raman scattering
CAT	Catepsina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
сох	Ciclo-oxigenase
CRTAC	Proteína acídica da cartilagem (Cartilage acidic protein)
CS	Condroitim sulfato
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DS	Dermatam sulfato
EPM	Escola Paulista de Medicina
FACS	Citometria de Fluxo (Fluorescence-activated cell sorting)
GAG	Glicosaminoglicanos
GAL	Galactose
GAL-AS	Galactosamina sulfatada
GALNAC	Galactosamina N-acetilada
GLCNAC	Glucosamina N-acetilada
GLUCUA	Ácido glucurônico
HAP	Hialuronano-poli
HCAM	Molécula de adesão celular (Homing cell adhesion molecule)
HE	Hematoxilina-eosina
HEP	Heparina

HPSE	Enzima heparanase
HS	Heparam sulfato
HYAL	Enzima Hialuronidase ( <i>Hyaluronidase</i> )
IFN-γ	Interferon-gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina (Insulin-like growth fator)
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MAN	Manose
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase da matriz ou Metaloprotease da matriz ( <i>Matrix metalloproteinases</i> )
MSC	Células-tronco mesenquimais (Mesenchymal stem cell)
NC	Notocorda
NGF	Nerve growth fator
NO	Óxido nítrico
NP	Núcleo pulposo
PBST	Tampão fosfato (Phosphate buffered saline)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas ( <i>Platelet-derived growth factor</i> )
PG	Proteoglicano
PGE2	Prostaglandina E2
PRP	Plasma enriquecido de plaquetas
QS	Queratam sulfato
RAMAN	Marcação de lipídeo
RNA	Ácido ribonucleico
RNAM	RNA mensageiro
SER	Serina
SHG	Geração de segundo harmônico
SLRP	Proteoglicanos de baixo peso molecular ricos em leucina (Small leucine rich proteoglycans)

SMSC	Células-tronco derivadas da sinóvia (Synovial mesenchymal stem cells)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Escalarecido
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta ( <i>Transforming growth factor beta</i> )
THG	Geração de terceiro harmônico (Third harmonic generation)
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases ( <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> )
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (Tumor necrosis factor alpha)
UCMSC	Células-tronco derivadas do cordão umbilical ( <i>Umbilical cord mesenchymal stem cells</i> )
Unifesp	Universidade Federal de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)
XIL	Xilose

# SUMÁRIO

1	CENÁRIO T	EÓRICO	15
	1.1 DISCO	INTERVERTEBRAL: ESTRUTURA, EMBRIOGÊNESE E FUNÇÃO	16
	1.1.1 M	latriz extracelular do disco intervertebral	25
	1.1.2 C	olágeno	26
	1.1.3 P	roteoglicanos	26
	1.2 DEGEI	NERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL	31
	1.2.1 lr	nflamação no processo de degeneração do disco intervertebral	34
	1.2.2 B	iomarcadores na degeneração do disco intervertebral	36
	1.2.3 lr	nterleucinas	37
	1.2.4 C	atepsina B	38
	1.2.5 Á	cido hialurônico (AH)	39
	1.2.6 M	letaloproteases	40
	1.2.7 H	eparanase	41
	1.3 MODE DEGEN	LOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DO DISCO INTERVERTEBR NERADO	AL 44
	1.3.1 C	ultura tridimensional (Cultura 3D)	49
	1.3.2 A	plicações da cultura 3D	54
	1.4 MICRO	OSCOPIA	56
	1.4.1 M	licroscopia RAMAN	59
2		S	63
	2.1 OBJET	TIVO GERAL	64
	2.2 OBJE1	TIVOS ESPECÍFICOS	64
3	MATERIAIS	E MÉTODOS	65
	3.1 OBTEN	NÇÃO DAS AMOSTRAS POR RESSECÇÃO CIRÚRGICA	66
	3.2 PROCI PRIMÁ	ESSAMENTO DE TECIDO E OBTENÇÃO DE CULTURA CELULAR RIA	67
	3.3 FORM	AÇÃO DO ESFEROIDE COM NANO SHUTTLE™	68
	3.4 IMUNC	OFLUORESCÊNCIA	69

3.5 MICROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN "COHERENT ANTI-STOKES RAMAN SCATTERING"	70
3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5 CONCLUSÃO	83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS	85
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	. 114
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital São Paulo Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo	da 117

1 CENÁRIO TEÓRICO

# 1.1 DISCO INTERVERTEBRAL: ESTRUTURA, EMBRIOGÊNESE E FUNÇÃO

A coluna vertebral humana possui 24 discos intervertebrais intercalados entre os corpos vertebrais, conectando-os (SMITH *et al.*, 2011). Os discos intervertebrais formam o componente anterior da coluna, enquanto que o componente posterior é formado pelas facetas articulares e processos transverso e espinhoso, como mostra a Figura 1.



Figura 1 - Corte longitudinal de um segmento da coluna vertebral. Fonte: Adaptado de (NETTER, 2006).

A estrutura dos discos intervertebrais é formada por tecido cartilaginoso avascular e pode ser dividida anatomicamente em três regiões, como mostra a Figura 2. O disco intervertebral é constituído por uma região central gelatinosa, denominada núcleo pulposo (NP); um anel externo, formado por tecido fibroso, chamado ânulo fibroso (AF), que envolve o NP; e duas placas terminais de cartilagem hialina, que recobrem as superfícies superior e inferior do AF e do NP, servindo como interface entre o disco intervertebral e a vértebra (SMITH *et al.*, 2011).



Figura 2 - Esquema da estrutura anatômica do disco intervertebral. Nota: NP: núcleo pulposo, AF: ânulo fibroso. Fonte: Adaptado de (SMITH *et al.*, 2011).

Após a fecundação e formação do blastocisto, que ocorre na primeira semana gestacional, o embrião é implantado no endométrio. Na segunda semana, ocorre o processo de diferenciação celular, formação da cavidade amniótica e formação do saco coriônico. Na terceira semana, o embrioblasto se diferencia em um disco bilaminar, formado pelo epiblasto, voltado para a cavidade amniótica, e hipoblasto, adjacente à cavidade blastocística (Figura 3A). A formação da coluna vertebral tem início na terceira semana de gestação, com a migração de células a partir do epiblasto para a região mediana do disco bilaminar, formando a linha primitiva que começa a invaginar (processo de gastrulação). Ao final da gastrulação, o disco bilaminar se diferencia em trilaminar, composto por ectoderme, mesoderme e endoderme (Figura 3B) (ZARDO *et al.*, 2013).





**Nota: A**. Disco embrionário de aproximadamente 3 semanas após fecundação; **B**. Disco trilaminar, composto por ectoderme, mesoderme e endoderme, 8 semanas após fecundação.

**Fonte:** Figura adaptada de: Embriologia e Tecnologias de Ensino. *In*: Embriologia (2015). (http://ensinoembriologia.blogspot.com/2015/)

Na Figura 4, podemos observar os somitos, que são estruturas segmentares derivadas do mesoderma paraxial. As células da parte ventromedial do somito passam por uma transformação epitélio-mesenquimal e formam o esclerótomo, que originará vértebras e costelas. O restante do somito permanece epitelial e forma o dermomiótomo, que contém as futuras células miogênicas e dérmicas. O somito também controla células da crista neural e a migração dos axônios motores; portanto, é responsável pela segmentação do sistema nervoso periférico (SADLER, 2007).



Figura 4 - Desenho esquemático, mostrando a derivação do disco intervertebral a partir dos somitos. Fonte: Adaptado de (SADLER, 2007).

O Núcleo Pulposo (NP) deriva embriologicamente da notocorda. Possui propriedades elásticas e deformáveis, baixa celularidade (cerca de 4000 células/mm<sup>3</sup>), além de ser composto por cerca de 65% a 80% de água, fibras de colágeno do tipo II e grande concentração de proteoglicanos e ácido hialurônico (EISENSTEIN; ROBERTS, 2003; ROUGHLEY, 2004; SMITH *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2019).

Como mencionado, o núcleo pulposo tem origem na notocorda embrionária, mas acredita-se que a perda de células notocordais que pode ocorrer com maturidade esquelética em humanos possa contribuir para o início do processo de degeneração do disco intervertebral.

Assim, a definição do fenótipo de células notocordais embrionárias humanas é essencial para a compreensão do seu papel no desenvolvimento de novas terapias.

Em estudo recente, o perfil transcriptômico detalhado de células notocordais humanas foi investigado. Utilizando um marcador específico de notocorda, CD24, células notocordais embrionárias foram isoladas por citometria de Fluxo (FACS), entre 7-14 semanas pós-concepção. A análise de *microarray* ou perfilamento genético e a validação de PCR quantitativo identificaram CD24, STMN2, RTN1, PRPH, CXCL12, IGF1, MAP1B, ISL1, CLDN1 e THBS2, como marcadores específicos de notocorda. A expressão destes marcadores foi confirmada em células presentes no núcleo pulposo de discos envelhecidos e degenerados. Tal perfilhamento genético revelou moléculas envolvidas na inibição da vascularização (WISP2, Noggin e EDN2) e inflamação (IL1-RN), como reguladores essenciais de genes notocordais.

É importante ressaltar que, neste estudo, foi definido o transcriptoma de células notocordais humanas e foi sugerido que a inibição da inflamação e vascularização representam papéis fundamentais das células notocordais durante o desenvolvimento do disco intervertebral. Assim, tal estudo permitiu o avanço do conhecimento de moléculas e vias de sinalização com potencial para uso no desenvolvimento de estratégias, para retardar ou prevenir a degeneração do disco intervertebral ou regenerar o tecido (RODRIGUES-PINTO *et al.*, 2018).

O Ânulo Fibroso (AF) possui composição e arquitetura heterogêneas. A região externa é altamente organizada e consiste de lamelas distintas, compostas por fibras de colágeno do tipo I, orientadas em ângulos oblíquos (MARCHAND e AHMED, 1990; SMITH *et al.*, 2011). Na região interna, há uma transição para o colágeno do tipo II e aumento da concentração de proteoglicanos, formando uma estrutura menos fibrosa (HUMZAH; SOAMES, 1988; URBAN *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2011).

As placas terminais separam o NP e o AF do centro do corpo vertebral e permitem a fixação das fibras do AF às estruturas ósseas. Além disso, são responsáveis pela nutrição do disco intervertebral, que é realizada via difusão de oxigênio e nutrientes dos espaços da medula óssea do corpo vertebral (URBAN *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2011).

A presença e a localização de células que expressam marcadores de células notocordais em discos intervertebrais lombares humanos, de todas as idades e graus variáveis de degeneração discal, foram investigadas e os resultados indicam que as células que apresentam fenótipo semelhante à notocorda, analisadas por técnica de imunohistoquímica, estão presentes em uma fração considerável dos discos intervertebrais lombares de adultos. A presença dessas células está associada a características distintas da degeneração discal precoce, particularmente com alterações na matriz granular (WEILER *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que a mudança no fenótipo das células do disco intervertebral se correlaciona com o grau de degeneração do disco. Além disso, as células notocordais sintetizam proteoglicanos, que exibem menor agregação, em comparação com proteoglicanos sintetizados por células do núcleo pulposo. Tais observações demonstraram que a composição do tipo de células do núcleo pulposo produz uma matriz extracelular distinta, o que pode afetar a integridade do tecido (CAPPELLO *et al.*, 2006).

Sabe-se que as células-tronco são caracterizadas por notável plasticidade e capacidade de se diferenciar em outros tipos de células. As células-tronco podem ser originadas da medula óssea (BMSC, células-tronco derivadas da medula óssea), de tecido adiposo (ADSC), do tecido articular (SMSC, células-tronco derivadas da sinóvia), do cordão umbilical (UCMSC), bem como outros tecidos e órgãos.

Células-tronco secretam fatores biologicamente ativos com propriedades imunomoduladoras e angiogênicas, e inibem a atividade leucocitária, que participa ativamente de processos inflamatórios. Isto justifica o uso de células-tronco no tratamento e reparo do miocárdio danificado, no primeiro estágio do choque e transplante de células-tronco para o núcleo pulposo do disco intervertebral, joelho e articulação do quadril em lesões inflamatórias progressivas, criando novas oportunidades para pacientes que estão permanentemente incapacitados (PLUSA *et al.*, 2019).

Em casos de osteoartrite e reparo de cartilagens articulares, as terapias com células-tronco têm sido amplamente utilizadas (FREITAG *et al.*, 2016; MCGONAGLE *et al.*, 2017; PATTAPPA *et al.*, 2019).

É importante lembrar que apenas 1% do volume do disco intervertebral é celular, porém, seu papel é vital, por ser responsável pela composição e *turnover* do tecido. O disco possui pelo menos três populações celulares distintas: células

semelhantes a condrócitos no NP, células fibrocartilaginosas no AF interno e fibroblastos no AF externo (GONZÁLEZ MARTÍNEZ *et al.*, 2017).

A forma da célula parece influenciar o tipo de componente da matriz extracelular que é sintetizado. As células do disco intervertebral podem ser consideradas uma variedade de condrócitos modulados pela organização de seu citoesqueleto, para produzir todas as macromoléculas encontradas na matriz extracelular do disco intervertebral (BRUEHLMANN *et al.*, 2002; HORNER *et al.*, 2002).

As células do disco intervertebral podem, ainda, ser estimuladas por diversos fatores, dentre eles o estresse mecânico, o fornecimento de nutrientes e os ambientes osmótico e iônico. As células dependem dos capilares situados nas margens do AF e do fluxo sanguíneo abaixo da cartilagem hialina da placa terminal, para o suprimento de nutrientes e depuração dos produtos metabólicos (HEE *et al.*, 2011).

A atividade das células do disco intervertebral é regulada por fatores de crescimento, citocinas e pelo ambiente extracelular, que é fortemente influenciado pela natureza avascular do disco e pela carga mecânica aplicada sobre o disco durante atividades normais (URBAN *et al.*, 2004).

A carga mecânica do disco intervertebral inicia eventos de remodelação, mediada por células que contribuem para a degeneração do disco. As células do disco intervertebral, núcleo pulposo (NP) e ânulo fibroso (AF) exibem várias respostas a diferentes estímulos mecânicos, que parecem ser altamente dependentes do tipo de carga, magnitude, duração e zona anatômica de origem celular.

As células do NP, a região mais interna do disco, exibem uma resposta anabólica à compressão estática moderada, pressão osmótica ou pressão hidrostática, enquanto magnitudes mais altas promovem uma resposta catabólica marcada pelo aumento da expressão e atividade das proteases.

As células da parte externa do AF respondem às forças físicas que dependem da frequência e magnitude, assim como as células do NP, embora experimentem diferentes forças, deformações, pressão e pressão osmótica *in vivo*. Ainda há muito a ser entendido das vias de transdução mecânica que regulam as respostas das células do disco intervertebral, incluindo respostas a estímulos específicos aos diferentes tipos de células. Há evidências de que o remodelamento do citoesqueleto e a sinalização mediada por receptor são eventos importantes de transdução mecânica, que pode regular a expressão gênica e biossíntese póstradução, mecanismos moleculares que podem influenciar o fenótipo e a função do disco intervertebral.

As interações célula-célula dependem da composição dos ligantes da matriz extracelular, que modulam as interações celulares, a constituição da própria matriz e fenótipo das células. Portanto, estímulos mecânicos desempenham importante papel sobre a resposta celular e alterações que ocorrem com o envelhecimento e no processo de degeneração do disco intervertebral (FEARING *et al.*, 2018).

O transporte de nutrientes para dentro e através do disco intervertebral devese à difusão. Os coeficientes de difusão aumentam com a concentração de constituintes da matriz extracelular e, portanto, são maiores na porção menos hidratada do NP. A taxa relativa de transporte de íons depende da concentração de proteoglicanos nas diferentes regiões do disco. A alta concentração de proteoglicanos em torno das células cria ambientes osmótico e iônico (URBAN *et al.*, 2004).

Dentre as diversas estruturas envolvidas na estabilização da coluna vertebral, está o ligamento amarelo ou ligamento *flavum*, que se encontra localizado posterior e lateralmente às lâminas vertebrais, conectando vértebras adjacentes. O ligamento amarelo está presente desde o áxis até o primeiro segmento do sacro. Cada ligamento amarelo possui origem na face anterior da lâmina da vértebra superior, e inserção na face posterior da lâmina inferior, recobrindo grande parte posterior e lateral do canal vertebral (KAMITA *et al.*, 2015).

Na perspectiva de Chen e colaboradores, o ligamento amarelo apresenta grande quantidade de fibras elásticas, quando comparado às fibras colágenas, sendo que 70% da matriz extracelular é formada por fibras elásticas ricas em elastina, e 30% de fibras colágenas que possuem orientação em paralelo. A função primordial fisiológica do ligamento amarelo é a manutenção da estabilidade da coluna vertebral em postura ortostática (CHEN *et al.*, 2014).

O aumento da rigidez e a diminuição da elasticidade do ligamento amarelo podem, entre outras causas, estar relacionados com o processo de envelhecimento, onde há redução das fibras elásticas. A hipertrofia do ligamento amarelo gera um estreitamento do canal espinal, comprimindo os tecidos nervosos, causando sintomas radiculares, compressivos e inflamatórios. A hipertrofia do ligamento amarelo é considerada a causa mais comum de estenose do canal lombar (YOSHIIWA *et al.*, 2016).

Diferentes eventos podem desencadear a hipertrofia do ligamento amarelo, como o estresse biomecânico gerado pela mobilidade e amplitude de movimento da coluna, e também as alterações inflamatórias do disco intervertebral e dos tecidos contíguos, causando o espessamento e alteração estrutural do ligamento em pacientes com predisposição genética (CHELLADURAI *et al.*, 2018; SATO *et al.*, 2018).

Um estudo publicado por Kamita e colaboradores mostra uma análise proteômica do ligamento amarelo sem aspectos degenerativos (saudável) e compara com a análise realizada em ligamentos amarelos espessos, onde o grupo identificou 1.288 tipos distintos de proteínas. Em tal estudo, evidenciou-se que tecidos saudáveis apresentaram aproximadamente 1.100 proteínas distintas, enquanto nos tecidos com sinais de degeneração do ligamento amarelo, o número foi reduzido para aproximadamente 900 proteínas, com diminuição significativa de componentes elásticos da matriz extracelular (KAMITA *et al.*, 2015).

A principal função do disco intervertebral é mecânica. O disco transmite carga ao longo da coluna vertebral, além de permitir movimentos de rotação e flexão da coluna. A carga no disco intervertebral provém do peso corporal e da atividade muscular, podendo alterar conforme a postura. A pressão nos discos intervertebrais deve-se principalmente à pressão hidrostática no NP e parte interna do AF. Quando a carga aumenta, a pressão é distribuída uniformemente pelas placas terminais e por todo o disco intervertebral (GONZÁLEZ MARTÍNEZ *et al.*, 2017).

Quando o disco intervertebral é comprimido, as placas terminais e o AF ficam protuberantes, aumentando a tensão nestas estruturas e a pressão no NP. O disco intervertebral pode ser consideravelmente deformado, reduzindo ou aumentando sua altura em 30 a 60% durante a flexão ou extensão. Se a carga é removida dentro de poucos segundos, o disco rapidamente retorna ao seu estado inicial. Porém, se a carga é mantida, o disco continua a perder altura, resultando em deformação das estruturas e perda de água (CHEN *et al.*, 2003; ZEHRA *et al.*, 2017).

### 1.1.1 Matriz extracelular do disco intervertebral

A matriz extracelular do disco intervertebral é produzida e mantida por células e é composta por três tipos principais de macromoléculas: colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas, como mostra o esquema da Figura 5. A matriz extracelular do disco intervertebral apresenta baixa celularidade, cerca de 9.000 células/mm<sup>3</sup> no AF e 4.000 células/mm<sup>3</sup> no NP (BAYLISS; JOHNSTONE, 1992).

Como já mencionado anteriormente, a composição da matriz extracelular pode regular o fenótipo das células constituintes do NP do disco intervertebral (GILCHRIST *et al.*, 2011; HWANG *et al.*, 2014).





### 1.1.2 Colágeno

A rede de colágeno presente no disco intervertebral é semelhante à encontrada na cartilagem articular. As fibras de colágeno formam uma rede tridimensional firme, que suporta as células e confina os proteoglicanos constituintes da matriz extracelular. O conteúdo de colágeno do disco intervertebral aumenta do interior do NP ao exterior do AF.

Os colágenos do tipo I e II constituem a maior parte da rede fibrosa, mas também há outros tipos de colágeno no interior do disco intervertebral. No AF, foram encontrados os colágenos dos tipos I, II, III, V, VI, IX e XI, enquanto que o NP contém colágenos dos tipos II, VI, IX e XI (KOBIELARZ *et al.*, 2016; TAO, Y. *et al.*, 2016).

### 1.1.3 Proteoglicanos

Os proteoglicanos são macromoléculas constituídas por um esqueleto proteico, ligado a cadeias lineares de açúcares, denominadas glicosaminoglicanos (GAG). Os proteoglicanos são os principais componentes estruturais do disco intervertebral e sua concentração e organização na matriz extracelular influenciam consideravelmente as propriedades mecânicas do disco (BINCH *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017).

Os glicosaminoglicanos compreendem heteropolissacarídeos constituídos por unidades repetitivas de dissacarídeos, formados por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) unida a um resíduo de ácido urônico (ácido glicurônico ou ácido idurônico), ou a um açúcar neutro (galactose), como mostra a Figura 6 (SOARES DA COSTA *et al.*, 2017; SILAGI *et al.*, 2018).

Com exceção do ácido hialurônico, os demais glicosaminoglicanos encontramse associados a um esqueleto proteico, e assim formam macromoléculas, denominadas proteoglicanos. A região de ligação entre as cadeias de glicosaminoglicanos e o esqueleto proteico pode ser um tetrassacarídeo constituído por resíduos de xilose, galactose, galactose e ácido glicurônico, unidos a um resíduo de serina do esqueleto proteico, com exceção do queratam sulfato, que apresenta diferentes regiões de ligação, como mostra a Figura 7.



Figura 6 - Estrutura dos sacarídeos constituintes dos glicosaminoglicanos.

A Figura 8 representa os proteoglicanos constituintes da matriz extracelular de alto peso molecular, agrecam e versicam, que se encontram ligados à cadeia de ácido hialurônico pela proteína de ligação, formando complexos macromoleculares, importantes para a organização da matriz extracelular.

Dentre os proteoglicanos de alto peso molecular, que constituem da matriz extracelular do disco intervertebral, o agrecam e o versicam são os componentes mais frequentes (ROUGHLEY *et al.*, 2002; FORTUNIAK *et al.*, 2005).



Figura 7 - Região de ligação entre cadeias de glicosaminoglicanos e esqueleto proteico dos proteoglicanos.



O agrecam é o proteoglicano mais abundante do disco intervertebral, formado por cadeias de condroitim sulfato, dermatam sulfato e queratam sulfato, ligadas ao seu esqueleto proteico. Este proteoglicano tem alta afinidade por água e produz um gel responsável pela resistência do disco intervertebral à compressão. O agrecam encontra-se ligado ao ácido, interagindo com a proteína de ligação e formando complexos macromoleculares, assim como o versicam (KAWAGUCHI *et al.*, 1999; ROUGHLEY, 2004).



#### Figura 8 - Estrutura e localização dos Proteoglicanos.

**Nota**: Os proteoglicanos estão distribuídos em grânulos citoplasmáticos, como Serglicim, proteoglicanos de heparina e condroitim sulfato. Proteoglicanos de heparam sulfato presentes na superfície celular (sindecam e glipicam). Proteoglicanos de heparam sulfato de membrana basal (perlecam). Os proteoglicanos de matriz extracelular são classificados como proteoglicanos de alto peso molecular (agrecam e versicam), e baixo peso molecular (decorim, biglicam e fibromodulina). O agrecam é um proteoglicano formado por cadeias de condroitim sulfato e queratam sulfato, enquanto o versicam é um proteoglicano de condroitim sulfato. Os proteoglicanos de dermatam sulfato e condroitim sulfato de baixo peso molecular são decorim e biglicam e a fibromodulina formada essencialmente por cadeias de queratam sulfato. **HEP**, heparina; **CS**, condroitim sulfato; **HS**, heparam sulfato; **KS**, queratam sulfato; **DS**, dermatam sulfato.

O versicam, um proteoglicano de condroitim sulfato, também é abundante no disco intervertebral e encontra-se associado ao ácido hialurônico pelo domínio globular terminal, formando complexos e contribuindo para a retenção de água, a resistência à compressão e o deslizamento entre as fibras colágenas (MELROSE *et al.*, 2001; SZTROLOVICS *et al.*, 2002).

O ácido hialurônico é o único glicosaminoglicano que não apresenta sulfatação, nem ligação a um esqueleto proteico, não formando, portanto, proteoglicanos. Porém, é essencial na estabilização destes, com os quais formam agregados, como mostra a Figura 5. Sem esta interação, os proteoglicanos não ficariam retidos na matriz extracelular do disco intervertebral. Além disso, o AH desempenha um importante papel na homeostase do disco, devido à sua característica osmótica e resistência (KIM *et al.*, 2015; TSARYK *et al.*, 2015).

Os proteoglicanos de baixo peso molecular, também classificados como *small leucine rich proteoglycans* (SLRP), presentes no disco são: biglicam, decorim e fibromodulina. Estas moléculas apresentam importantes funções no remodelamento da matriz extracelular, como a modulação da ação de fatores de crescimento, o controle de mecanismos de proliferação celular, angiogênese e distribuição de citocinas inflamatórias; além de interagir com colágeno e AH, organizando o arranjo de moléculas na matriz extracelular (INKINEN *et al.*, 1998; IOZZO, 1999; MELROSE *et al.*, 2001).

O decorim é um proteoglicano de condroitim sulfato ou dermatam sulfato, que se associa a fibrilas de colágeno dos tipos I e II, influenciando a fibrilogênese e controlando o diâmetro destas fibrilas no disco intervertebral. Também interage com fatores de crescimento e outros componentes da matriz extracelular do disco, aumentando sua bioatividade (SZTROLOVICS *et al.*, 2002).

O biglicam é um proteoglicano de condroitim sulfato ou dermatam sulfato que, assim como o decorim, se associa a fibrilas de colágeno dos tipos I e II. Também interage com fatores de crescimento e citocinas, desempenhando um papel regulatório (FURUKAWA *et al.*, 2009).

A fibromodulina é um proteoglicano de queratam sulfato que, como os demais proteoglicanos de baixo peso molecular do disco intervertebral, interage com fibrilas de colágeno – influenciando a taxa de fibrilogênese e a estrutura das fibrilas formadas – e com fatores de crescimento e citocinas, exercendo função regulatória (SZTROLOVICS *et al.*, 2002).

Melrose e colaboradores (2003) relataram, ainda, a presença de perlecam, um proteoglicano de heparam sulfato (HS), na matriz pericelular de células do AF e do NP (SHU *et al.*, 2013).

### 1.2 DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL

A dor lombar é comum na população em geral e um dos principais problemas de saúde pública em sociedades ocidentais industrializadas. Cerca de 10 milhões de brasileiros são acometidos por esta morbidade, cuja intensidade pode variar de um leve desconforto a dores incapacitantes e de longa duração. Em alguns casos, pode conduzir o paciente à invalidez permanente (KELSEY; WHITE, 1980; ANDERSSON, 1999; SILVA *et al.*, 2004; TONG *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019; UDALL *et al.*, 2019).

Devido ao fato da dor lombar raramente representar uma ameaça à vida, a doença é negligenciada por parte das autoridades governamentais, seguradoras e mídia. Porém, os custos associados a esta afecção musculoesquelética são enormes e incluem tanto os custos diretos com clínicas, hospitais e medicamentos, quanto os custos indiretos, como a perda de produtividade no trabalho (MALTER *et al.*, 1996).

Alguns dos fatores de risco para a dor lombar são: sedentarismo, obesidade, tabagismo e posturas viciosas. Além disso, esta afecção pode ser causada por doenças inflamatórias, degenerativas, neoplásicas, defeitos congênitos, debilidade muscular, predisposição reumática e sinais de degeneração da coluna ou dos discos intervertebrais (SILVA *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2008; KLYNE *et al.*, 2019).

Muitos estudos têm apontado a degeneração do disco intervertebral como a principal causa de dor lombar. O processo degenerativo dos discos está fortemente associado à perda de moléculas da matriz extracelular e a mecanismos inflamatórios, que levam a alterações nas propriedades bioquímicas e biomecânicas do tecido (ADAMS; ROUGHLEY, 2006; PARISIEN *et al.*, 2019).

As alterações nos discos intervertebrais e na mecânica da coluna vertebral, causadas pela degeneração discal, podem modificar o comportamento de outras estruturas, como músculos e ligamentos, levando à estenose espinal, dor e incapacidade (URBAN; ROBERTS, 2003).

A população idosa é a que apresenta degeneração dos discos intervertebrais com maior frequência. Diversos estudos relatam que o envelhecimento gera

alterações histológicas, metabólicas e funcionais nos discos, tornando-os mais rígidos e reduzindo sua resistência (PODICHETTY, 2007; KELEMPISIOTI *et al.*, 2011). Porém, qualquer pessoa pode apresentar degeneração discal, até mesmo crianças, adolescentes e adultos jovens (KJAER *et al.*, 2011).

O processo de degeneração discal afeta várias estruturas diferentemente e, aparentemente, em diferentes períodos durante sua progressão (HADJIPAVLOU *et al.*, 2008; INOUE; ESPINOZA ORÍAS, 2011). O processo parece iniciar no NP, que exibe redução em sua concentração de proteoglicanos e alteração gradual do tipo de colágeno, tornando o tecido mais fibroso (ANTONIOU *et al.*, 1996; CS-SZABO *et al.*, 2002; ROUGHLEY, 2004; BYVALTSEV *et al.*, 2018).

A perda de proteoglicanos no NP é a alteração bioquímica mais significante. Estas moléculas são degradadas, resultando em perda de GAG que, por sua vez, é responsável pela queda na pressão osmótica e consequente desidratação. O disco degenerado tem seu comportamento hidrostático alterado e, durante a compressão, pode apresentar picos de tensão inapropriados (WOGNUM *et al.*, 2006; BYVALTSEV *et al.*, 2018).

Reduções no conteúdo de proteoglicanos de baixo peso molecular também são características no processo degenerativo do disco. A perda do decorim está relacionada com a diminuição da síntese de colágenos (SZTROLOVICS *et al.*, 2002). Furukawa e colaboradores demonstraram que a falta de biglicam inibe fatores de crescimento, que promovem a produção de matriz extracelular. A perda do biglicam pode, ainda, aumentar o estresse mecânico no disco intervertebral, pela falta da inibição de enzimas que degradam o colágeno no AF (FURUKAWA *et al.*, 2009).

A progressão da degeneração discal altera o arranjo lamelar normal do AF e compromete a força mecânica do disco intervertebral (BERLEMANN *et al.*, 1998). A quantidade absoluta de colágeno na matriz do disco permanece praticamente inalterada durante o processo degenerativo, porém, o tipo e a distribuição dos colágenos podem mudar. Além disso, os colágenos fibrilares, como o colágeno do tipo II, tornam-se mais desnaturados, aparentemente devido à atividade enzimática. Frequentemente, surgem fendas e fissuras no disco intervertebral degenerado, além de ocorrer a neoformação de vasos e nervos (URBAN; ROBERTS, 2003).

A bioquímica da degeneração discal indica que a atividade enzimática contribui para a doença, com o aumento da fragmentação de colágenos e proteoglicanos. Várias famílias de enzimas são capazes de quebrar as moléculas da matriz extracelular do disco, incluindo as catepsinas, metaloproteinases (MMP) e agrecanases (KONTTINEN *et al.*, 1999; ARIGA *et al.*, 2001; PATEL *et al.*, 2007; GRUBER *et al.*, 2011; TIAN *et al.*, 2013; ZHANG, J. F. *et al.*, 2018) As catepsinas têm o pico de atividade em ambiente acídico, enquanto que as metaloproteases e agrecanases têm atividade máxima em pH relativamente neutro (ARIGA *et al.*, 2001). Foi demonstrado que as agrecanases e metaloproteases são ativadas durante o processo degenerativo, podendo levar ao aparecimento de fissuras no disco (WUERTZ *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2016).

Além das enzimas citadas, foi evidenciado aumento da expressão proteica e do RNA (ácido ribonucleico) mensageiro (RNAm) das isoformas da enzima heparanase (HPSE), no tecido de discos intervertebrais degenerados, quando comparados com discos não degenerados (RODRIGUES *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013). Os resultados sugerem um possível papel para as isoformas da HPSE, na mediação de processos inflamatórios e no remodelamento da matriz extracelular característicos da doença.

A degeneração do disco intervertebral está associada à lombalgia e afeta significativamente a qualidade de vida do paciente. A degeneração do disco intervertebral altera a altura do disco e a mecânica da coluna, levando à instabilidade espinhal segmentar crônica. A fisiopatologia da doença regenerativa do disco intervertebral ainda não é bem compreendida. As terapias atuais incluem abordagens conservadoras e invasivas, mas nenhum desses tratamentos é capaz de restaurar a estrutura e a função do disco. Recentemente, técnicas de engenharia de tecidos surgiram como uma possível abordagem para substituir um disco degenerado por *scaffolds* e células apropriadas. Avanços em técnicas de fabricação, processamento e desenvolvimento de materiais, funcionalização de superfícies, sistemas de administração de medicamentos e incorporação de células promoveram o desenvolvimento de terapias de engenharia de tecidos e envolvem o desenvolvimento de scaffolds de biomateriais e terapias baseadas em células, para regeneração do

processo de degeneração discal (O'HALLORAN; PANDIT, 2007; PEREIRA et al., 2013; STERGAR et al., 2019).

### 1.2.1 Inflamação no processo de degeneração do disco intervertebral

A inflamação é caracterizada não somente pela angiogênese, presença de mediadores e recrutamento de células imunes, mas também pela neoinervação, responsável pela dor. A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório, em que a sensibilização de terminações nervosas é o denominador comum (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017).

Um importante fenômeno observado na degeneração do disco intervertebral é o surgimento de fibras nervosas sensoriais nos discos. Estas fibras sensoriais podem penetrar não somente na periferia do AF, mas atingir também regiões mais internas dos discos, principalmente na presença de fissuras e na redução da pressão no NP (OZAWA *et al.*, 2006; WUERTZ *et al.*, 2012).

A compressão destas fibras nervosas resulta em lesões teciduais, que são responsáveis por descargas espontâneas e aumento da amplitude do sinal elétrico nas terminações nervosas (KRAYCHETE *et al.*, 2010).

Foi sugerido que as lesões do disco intervertebral podem modular cascatas de sinalização, particularmente com o aumento dos níveis de citocinas que, por sua vez, induzem a expressão de mediadores da dor (GOUPILLE *et al.*, 2007; KRAYCHETE *et al.*, 2010; WUERTZ *et al.*, 2012).

As citocinas são proteínas ou peptídeos, responsáveis pela sinalização do processo inflamatório. O aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias na circulação gera respostas locais ou sistêmicas, que causam a amplificação da inflamação aguda e promovem a evolução para um estado de inflamação crônica, culminando com hiperalgesia e efeitos deletérios no organismo. Várias citocinas estão envolvidas na patologia da degeneração discal sintomática (MOON *et al.*, 2012; GORTH *et al.*, 2019; ZHANG, J. *et al.*, 2019).

Estudos anteriores forneceram evidência de que a degeneração do disco intervertebral está correlacionada com o aumento dos níveis de citocinas próinflamatórias no tecido do disco, como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-17 (IL-17) e TNF- $\alpha$  (WEILER *et al.*, 2005; BACHMEIER *et al.*, 2007; LE MAITRE *et al.*, 2007; ADAMS *et al.*, 2010; SHAMJI *et al.*, 2010; WUERTZ *et al.*, 2012). Estas citocinas podem promover a ativação e diferenciação de linfócitos, além de recrutar macrófagos e ativar a fagocitose e a secreção de enzimas proteolíticas (SHAMJI *et al.*, 2010).

As enzimas proteolíticas fragmentam os proteoglicanos e podem induzir ou inibir as respostas inflamatórias, ao alterar a habilidade da matriz extracelular de manter a sua estabilidade estrutural (ADAMS; ROUGHLEY, 2006). As enzimas mais estudadas na degeneração discal são as da família das MMP, responsáveis pela degradação de colágeno e de proteoglicanos de alto peso molecular (agrecam e versicam). Além das MMP, as catepsinas são outro grupo de proteinases dominantes, capazes de degradar colágeno dos tipos I e II e agrecam.

Catepsinas são cisteíno-proteases envolvidas em doenças que são caracterizadas por remodelação tecidual e inflamação (ALMEIDA *et al.*, 2001). Citocinas inflamatórias e fatores de crescimento parecem participar da regulação da síntese e ativação das catepsinas (CS-SZABO *et al.*, 2002). Apesar da escassez de informações na literatura relacionadas ao envolvimento de catepsinas ao processo de degeneração do disco intervertebral, tais enzimas podem desempenhar importante papel no processo inflamatório e catabólico da degeneração discal.

O ácido hialurônico também pode estar envolvido no processo inflamatório da degeneração do disco intervertebral. Sob condições inflamatórias, o ácido hialurônico apresenta grande diversidade de tamanhos, com preponderância das formas de baixo peso molecular. Sabidamente, o uso terapêutico de ácido hialurônico promove resultados que melhoram a condição do processo degenerativo do disco intervertebral em estudos que utilizam isoladamente aplicações deste, ou em combinação com terapia celular (LECKIE *et al.*, 2012; OMLOR *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; ROSENZWEIG *et al.*, 2018).
Há evidências de que, após a lesão tecidual discal, são produzidos fragmentos de ácido hialurônico de baixo peso molecular, que estão envolvidos na inflamação, recrutamento de células imunes e angiogênese (JIANG *et al.*, 2007; 2011).

#### 1.2.2 Biomarcadores na degeneração do disco intervertebral

A identificação de biomarcadores é fundamental para a abordagem bemsucedida ao tratamento da degeneração do disco intervertebral, principalmente nos estágios iniciais da doença, quando as imagens de ressonância ainda não evidenciam alterações significantes, que poderiam concluir o diagnóstico de degeneração discal (GUO *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018; VADAPALLI *et al.*, 2019).

Atualmente, a tecnologia da ressonância magnética é o método mais utilizado para o diagnóstico da degeneração do disco intervertebral. Porém, alguns autores acreditam que o parâmetro de baixa intensidade de sinal não reflete alterações claras na morfologia do disco intervertebral Spine (TERTTI *et al.*, 1991; SHER *et al.*, 2019; ZHANG, C. *et al.*, 2019)

Durante a progressão e o tratamento da doença degenerativa discal, proteínas das células lesadas podem entrar na corrente sanguínea, alterando o espectro das proteínas circulantes no sangue. Algumas proteínas plasmáticas, como citocinas, podem servir como marcadores de diagnóstico da degeneração do disco intervertebral (WEBER *et al.*, 2016).

Existem painéis de biomarcadores para caracterização do tipo de célula. Entretanto, deve-se lembrar a heterogeneidade nas células da AF e NP, indicando a necessidade de avaliação de célula única, por métodos como hibridização *in situ*, para avaliar a expressão específica de RNA. Existem marcadores exclusivos de célulastronco mesenquimais, constituintes do NP, e que podem beneficiar futuras estratégias de medicina regenerativa e engenharia de tecidos em humanos (LIU *et al.*, 2019).

A análise de bioinformática pode facilitar na revelação de diferentes padrões de expressão gênica no ânulo fibroso e no núcleo pulposo, durante a degeneração do disco intervertebral (WANG *et al.*, 2018).

#### 1.2.3 Interleucinas

O aumento da expressão de citocinas, em particular a interleucina-1β (IL-1β), é considerado uma marca da degeneração do disco intervertebral. No entanto, a relação causativa entre IL-1 e degeneração discal dependente da idade até o momento ainda não foi estabelecida. A deleção da IL-1 altera o ambiente inflamatório sistêmico e a morfologia do osso vertebral. No entanto, em vez de proteger os discos do processo degenerativo relacionado à idade, a deleção global da IL-1 amplifica o fenótipo degenerativo (GORTH *et al.*, 2019).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica, que exerce diversas atividades biológicas em diferentes células-alvo – principalmente a regulação das respostas imune e inflamatória – e está envolvida com vias de sinalização celular no processo degenerativo discal (CHEN *et al.*, 2019). A IL-6 participa ativamente da interação entre macrófagos e disco intervertebral (TAKADA *et al.*, 2002). A diminuição na produção de IL-6 no disco intervertebral pode fornecer alguma proteção contra os efeitos adversos da IL-1 e do TNF- $\alpha$ , ajudando a preservar a composição, estrutura e função do disco (STUDER *et al.*, 2011). Estudos prévios relataram altos níveis de IL-6 na cartilagem e no líquido sinovial da faceta articular de pacientes com degeneração de discos intervertebrais lombares, e aumento significativo da expressão proteica desta citocina em fragmentos de discos herniados (SHAMJI *et al.*, 2010).

Oliveira e colaboradores demonstraram que não existe alteração na expressão de IL-6 durante a evolução do processo degenerativo intervertebral, utilizando em modelo experimental com ratos. Porém, houve diminuição significativa da interleucina-10 (IL-10) no 15° dia do processo degenerativo. Sabidamente, IL-10 é uma interleucina anti-inflamatória, sugerindo que, durante o desenvolvimento do processo de degeneração discal, a diminuição de IL-10 possivelmente contribui para a inflamação (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

### 1.2.4 Catepsina B

A catepsina B (CatB) é uma cisteíno-protease da família da papaína, localizada nos lisossomos. Catepsinas participam de vários processos celulares envolvidos com a degeneração discal (KONTTINEN *et al.*, 1999; ARIGA *et al.*, 2001; GRUBER *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que a concentração de CatB na cartilagem de pacientes com osteoartrite é significativamente maior do que no tecido normal (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 1990). Foi demonstrado que a Catepsina B liberada por células sinoviais e inflamatórias contribui para a progressão do processo inflamatório e destruição da cartilagem (CHU *et al.*, 2010).

Padrões de expressão gênica em discos degenerados de grau III, IV e V (segundo a classificação de Thompson), comparativamente com discos intervertebrais classificados como grau I e II, mostraram aumento significativo de vários genes envolvidos com apoptose, incluindo a ação da catepsina B. Portanto, a expressão *in vivo* de genes relacionados à apoptose, associados à perda da integridade da membrana mitocondrial e à diminuição do potencial de membrana mitocondrial com o aumento dos escores de Thompson, ressaltam a importância das alterações mitocondriais relacionadas à apoptose mediada por catepsina B e TNF- $\alpha$ , durante a degeneração discal humana (GRUBER *et al.*, 2015).

A catepsina B participa da regulação da expressão dos colágenos III e IV, sintetizados por fibroblastos. Foi evidenciado que inibidores específicos de catepsina B podem melhorar o reparo tecidual durante o processo de inflamação crônica (LI *et al.*, 2016).

Segundo Bourguignon e colaboradores, a atividade da catepsina B é estimulada pela ligação do ácido hialurônico ao seu receptor CD44. Esta interação gera um microambiente acídico, capaz de ativar a enzima catepsina B (BOURGUIGNON *et al.*, 2004).

Os estudos em conjunto mencionados sugerem, portanto, possível participação da catepsina B na degeneração discal.

A catepsina G provavelmente desempenha um papel importante na degradação da matriz extracelular no ânulo fibroso. A catepsina catiônica G parece ser inibida por proteoglicanos derivados da matriz extracelular do tecido conjuntivo do ânulo fibroso (KONTTINEN *et al.*, 1999).

A catepsina K desempenha papel significativo na remodelação da matriz discal e na degradação da matriz extracelular no microambiente pró-inflamatório rico em citocinas, que ocorre durante o processo de degeneração do disco intervertebral. A expressão constitutiva da catepsina K no disco intervertebral humano mostra uma nova percepção da remodelação da matriz extracelular do disco intervertebral, via ativação do receptor do fator nuclear-κB (NF-κB) (GRUBER *et al.*, 2011).

#### 1.2.5 Ácido hialurônico (AH)

O ácido hialurônico é sintetizado pelas células constituintes da matriz extracelular e desempenha importante função na modulação de vários eventos de sinalização celular.

A degradação e o *turnover* da matriz extracelular resultam em liberação de fragmentos de ácido hialurônico na circulação. Em indivíduos saudáveis, são encontrados baixos níveis de ácido hialurônico circulante, devido à depuração realizada pelo fígado e pelos vasos linfáticos (YAGMUR *et al.*, 2012).

O ácido hialurônico, na forma de hidrogel termorreversível de hialuronano-poli (N-isopropilacrilamida) (HAP), apresenta potencial utilização como sistema de entrega quimioatrativo, para recrutar células-tronco humanas no tratamento de degeneração do disco intervertebral. Foi evidenciado que HAP é eficaz para o recrutamento de células-tronco no disco intervertebral degenerado, abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento de terapias regenerativas, baseadas na migração celular endógena (PEREIRA *et al.*, 2014).

Duas hialuronidases, HYAL1 e HYAL2, estão envolvidas no catabolismo do ácido hialurônico nos tecidos. A degradação começa quando polímeros de ácido hialurônico de alto peso molecular da matriz extracelular são levados à superfície celular pela ação combinada do receptor CD44 e HYAL2 (BOURGUIGNON et al., 2004).

A enzima HYAL2 realiza a clivagem inicial no ácido hialurônico de alto peso molecular, gerando fragmentos de aproximadamente 20 kDa, com cerca de 50 unidades dissacarídicas, capazes de estimular a síntese de citocinas inflamatórias (BOURGUIGNON *et al.*, 2004).

A expressão de interleucinas, catepsinas e ácido hialurônico parece influenciar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de degeneração do disco intervertebral.

#### 1.2.6 Metaloproteases

Metaloproteases, (MMP-3, MMP-9), assim como inibidores de metaloproteases (TIMP-3), podem desempenhar um papel no processo de degeneração da placa terminal da cartilagem do disco intervertebral.

A MMP-3 pode ser regulada por IL-1 $\alpha$  e o TIMP-3, enquanto MMP-9 parece ser regulada por IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (PERERA *et al.*, 2017).

Os eventos de autofagia e apoptose detectadas nas células do NP parecem sofrer modulação por metaloproteases. Observou-se diminuição dramática no processo de autofagia do NP, concomitante com o aumento da expressão de MMP-3 e MMP-13, evidenciando que tais metaloproteases estão envolvidas com a promoção de autofagia em células do núcleo pulposo de ratos (AO *et al.*, 2018).

Há evidências de que MMP-9 participa da patogênese do processo de formação da hérnia de disco lombar (JING *et al.*, 2018).

A curcumina é um produto natural com propriedades antimutagênicas, antitumorais, antioxidantes e neuroprotetoras. No entanto, até onde sabemos, a curcumina ainda precisa ser investigada para o tratamento da degeneração do disco intervertebral lombar. Observou-se que esta pode prevenir o desenvolvimento de

degeneração do disco intervertebral lombar em ratos, reduzindo significativamente os níveis de interleucina (IL) -1β e IL-6, iNOS, COX-2 e MMP-9 (HU *et al.*, 2017).

Durante a hipóxia, foi notado que MMP-1 foi significativamente aumentada nas células do ânulo fibroso, enquanto os inibidores de metaloproteasesTIMP-1 e TIMP-2 diminuíram em ambas as células do NP e AF, sugerindo o papel das metaloproteases durante o remodelamento da matriz extracelular (KWON *et al.*, 2017).

#### 1.2.7 Heparanase

A heparanase-1 ou heparanase (HPSE1 ou HPSE) é uma endo-βglucuronidase, que cliva ligações glicosídicas intrassacarídicas do heparam sulfato, constituinte dos proteoglicanos presentes na superfície celular e matriz extracelular. A clivagem ocorre entre resíduos de hexosamina (glucosamina N-sulfatada ou Nacetilada) e o ácido glucurônico (VLODAVSKY *et al.*, 1990).

A ação da heparanase sobre as cadeias de heparam sulfato dos proteoglicanos gera oligossacarídeos, que podem apresentar atividades biológicas importantes. Foi demonstrado que tais oligossacarídeos, gerados por ação da heparanase, apresentam maior afinidade por fatores de crescimento, fatores angiogênicos e citocinas presentes no meio extracelular, facilitando, assim, a apresentação de tais fatores a receptores específicos na superfície celular, intensificando eventos de angiogênese, proliferação celular e diferenciação celular, como mostra o esquema da Figura 9.

Conforme mencionado anteriormente, os resultados de estudo de nosso grupo (RODRIGUES *et al.*, 2011) evidenciam o aumento da expressão das isoformas da HPSE na degeneração discal, sugerindo a participação destas proteínas na degradação da matriz extracelular e na inflamação crônica, características da doença.

Li e colaboradores demonstraram o aumento significativo da atividade da HPSE1 no líquido e no tecido sinoviais de pacientes com artrite reumatoide e osteoartrite, bem como o aumento da expressão do RNAm da HPSE1 no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, quando comparados com doadores assintomáticos, que não possuíam histórico de doenças inflamatórias ou degenerativas das articulações (LI; VLODAVSKY, 2009).

O estudo de nosso grupo relatou aumento da angiogênese e do infiltrado inflamatório no tecido de discos intervertebrais degenerados. Também foi relatado aumento das expressões proteica e do RNAm das isoformas da HPSE (HPSE1 e HPSE2) no tecido de discos degenerados, quando comparados com discos não degenerados (RODRIGUES *et al.*, 2011).



**Figura 9 - Mecanismo de ação da heparanase-1 (HPSE). Nota**: As setas indicam o sítio de clivagem da heparanase sobre as cadeias de heparam sulfato dos proteoglicanos da matriz extracelular, liberando oligossacarídeos que sequestram moléculas, como fatores angiogênicos, fatores de crescimento, moléculas de adesão, citocinas, entre outras, tornando-as biologicamente ativas. **Fonte**: Adaptado de (VLODAVSKY *et al.*, 2002).

Os marcadores são muito importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do processo de degeneração do disco intervertebral, apontando para moléculas que poderiam ser utilizadas como marcadores de diagnóstico, prognóstico e alvo de novos tratamentos.

Até o momento, ainda não está claro se o processo inflamatório é a causa ou consequência da degeneração do disco intervertebral. Entretanto, sabe-se que a inflamação pode desencadear ativação e recrutamento de diferentes células do sistema imune.

Ainda, o processo normal de envelhecimento, aliado a alguma predisposição genética, faz com que o disco intervertebral se degenere, dando origem a mudanças profundas de componentes da matriz extracelular, como perda de conteúdo de proteoglicanos, desidratação, desnutrição, diminuição da população de células nativas, degradação de componentes da matriz extracelular e calcificações. Neste cenário, a resposta natural à carga mecânica é comprometida e o disco intervertebral torna-se propenso a microfissuras.

Resumidamente, o esquema da Figura 10 evidencia a complexidade de eventos que ocorrem durante o desenvolvimento do processo de degeneração do disco intervertebral, que envolvem alterações de componentes da matriz extracelular.

Cumpre ser destacado que não é bem compreendido como células endógenas do disco intervertebral interagem com células inflamatórias exógenas, e se elas contribuem para a reabsorção e regeneração tecidual. Atualmente, acredita-se que a regressão espontânea de disco intervertebral seja uma consequência da atividade dos macrófagos.

Os estudos relacionados aos processos envolvidos na degeneração do disco intervertebral exigem modelos experimentais adequados, que permitam tal investigação.



Figura 10 - Esquema dos eventos de degeneração do disco intervertebral.

**Nota: 1**, A formação da hérnia de disco intervertebral pode ocorrer quando a AF não é capaz de sustentar o NP. Os fragmentos de ECM e micro cristais podem induzir internamente um processo inflamatório, assim como a extrusão da hérnia discal, estimulando as células endógenas do disco intervertebral a produzirem mediadores pró-inflamatórios, que alimentarão ainda mais a cascata de degeneração tecidual, tais como interleucinas (IL-1b, IL-8, IL-6). **2**, O NP é reconhecido como não próprio pelo sistema imunológico e sua exposição (tanto em microfissuras quanto em processo de herniação) gera uma resposta imunológica, com recrutamento de macrófagos, linfócitos e outras células inflamatórias. A dor discogênica tem sido muitas vezes atribuída à secreção de fatores como TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral), PGE2 (prostaglandina E2), NO (óxido nítrico) e IFN- $\gamma$  (interferon-gama) por macrófagos, concomitantemente à produção de NGF (*nerve growth fator*) e substância P (*substance P*). **Fonte**: Figura adaptada de (MOLINOS *et al.*, 2015).

# 1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DO DISCO INTERVERTEBRAL DEGENERADO

A investigação das alterações moleculares e estruturais, que ocorrem no disco intervertebral durante o processo de degeneração discal, são importantes para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de tal doença, tornando-se possível identificar moléculas-alvo para o diagnóstico, prognóstico ou para novas alternativas de tratamento. O uso de amostras humanas obtidas de ressecções cirúrgicas serve como um dos modelos experimentais para a realização de tais estudos; entretanto, por problemas éticos, existe grande dificuldade na obtenção de amostras de tecidos de indivíduos não afetados por degeneração discal. Diante de tal limitação, os modelos experimentais em animais representam grande importância no avanço do conhecimento, tanto na área básica como nas investigações clínicas no processo de degeneração do disco intervertebral. Entretanto, modelos animais representam certas limitações, como por exemplo a grande diversidade no tamanho do disco intervertebral nas diferentes espécies, além do bipedalismo.

O tamanho do disco intervertebral varia imensamente entre as espécies. A altura do disco intervertebral pode variar de 0,25 mm no rato a 11 mm no homem. Tal diferença no tamanho do disco intervertebral entre as espécies acarreta diferenças significativas em relação à disponibilidade de nutrientes e oxigênio para o disco intervertebral, que é um tecido avascular, além de também alterar o transporte de produtos do metabolismo, como o lactato. Foi demonstrado, por análise computacional, que o transporte de glucosamina dentro do disco intervertebral é inversamente proporcional ao tamanho do disco (MOTAGHINASAB *et al.*, 2014).

Os proteoglicanos são constituintes majoritários do núcleo pulposo, sendo que a carga negativa das cadeias de glicosaminoglicanos é essencial para a osmolaridade e resistência a forças de compressão do disco intervertebral. Foi observado que a constituição de glicosaminoglicanos do AF e NP é muito similar entre as diferentes espécies (BECKSTEIN *et al.*, 2008).

A constituição de células do NP também apresenta alterações significativas entre as diferentes espécies. Como mencionado anteriormente, durante o desenvolvimento embrionário da coluna, o NP é formado por células derivadas da notocorda (NC). Roedores mantêm alto número de células notocordais durante toda a vida; porém, em outros animais, como bovinos, ovelhas e humanos, as NC desaparecem em estágios iniciais da vida (WEILER *et al.*, 2010).

Portanto, considerando as diferenças na constituição, e principalmente no tamanho do disco intervertebral entre as espécies, o modelo animal apresenta várias críticas como um modelo experimental adequado para o estudo do disco

intervertebral. Não se pode deixar de observar que, de modo geral, o modelo animal contribui para avaliar terapias regenerativas do disco intervertebral, apesar de não existir um modelo padronizado ideal para testes de eficácia clínica.

Nos últimos anos, novas estratégias terapêuticas para a regeneração do disco intervertebral têm surgido, sendo que tais estratégias envolvem o uso de fatores de crescimento e terapias celulares. Ensaios *in vitro* possibilitaram grande avanço no conhecimento de novas estratégias para o processo de regeneração de discos intervertebrais.

Uma das funções primordiais das células constituintes do disco intervertebral é produzir matriz extracelular (MEC). A reconstituição de componentes da MEC em discos intervertebrais degenerados é uma das estratégias de terapias que envolvem a regeneração do tecido. Tal resultado pode ser atingido por terapias celulares, que utilizam células que produzem componentes da matriz extracelular, ou o uso de células-tronco, que podem sofrer diferenciação *in situ* e, então, gerarem MEC.

A terapia celular, em conjunto com o uso de biomoléculas, como TGF-β (*transforming growth factor beta*, (em português: fator de transformação do crescimento beta)); BMP (proteínas morfogênicas ósseas); PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas); IGF (fator de crescimento insulina-like), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), entre outros, induz a proliferação celular e a produção de componentes da MEC.

No tratamento de doenças de degeneração do disco intervertebral, a injeção de peptídeos, proteínas e outros compostos é realizada destacando estatinas, peniel 2000, proteína de ligação e resveratrol.

Estatinas são inibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase e são drogas efetivas na redução da síntese de colesterol. Resultados demonstraram que o uso de estatinas aumenta a expressão de agrecam, glicosaminoglicanos sulfatados, o nível de RNA mensageiro de BMP e colágeno tipo II, constituintes essenciais da MEC do disco intervertebral. Peniel 2000 (P2K) é um peptídeo que se liga ao TGF-β1, que compreende um fator de crescimento que modula a ação do biglicam, outro proteoglicano importante, constituinte da MEC do disco intervertebral.

A proteína de ligação é uma glicoproteína, que estabiliza a interação de proteoglicanos de alto peso molecular, como agrecam e versicam da MEC, com o ácido hialurônico. Tal interação gera um complexo macromolecular, que contribui para a retenção de água e resistência à compressão (SEYFRIED *et al.*, 2005). Resveratol é um composto natural, que apresenta a atividade de bloquear a ação catalítica de metaloprotease-13 na MEC de disco intervertebral degenerado. Também apresenta efeito anti-inflamatório.

É importante lembrar que a utilização de biomateriais, como "scaffolds", que repõem o tecido ou funcionam como carreadores de células e proteínas, como citocinas e fatores de crescimento, também são estratégias utilizadas no processo de regeneração discal.

A injeção de plasma enriquecido de plaquetas (PRP) apresenta uma fonte de muitos fatores de crescimento, que o auxiliam processo de degeneração discal. Entretanto, por não haver uma padronização exata do uso do PRP, os resultados são bastante diversificados. Uma revisão sobre o assunto foi realizada, para discutir o uso do PRP, destacando tais resultados incongruentes (FORMICA *et al.*, 2015).

O uso de células, como condrócitos, células-tronco e outros tipos celulares tem se destacado na área de engenharia tecidual, no tratamento da regeneração do disco intervertebral. A escolha adequada do tipo celular é essencial para o sucesso da terapia celular (KANDEL *et al.*, 2008).

Células do núcleo pulposo são similares a condrócitos; portanto, células com capacidade de diferenciação em condrócitos são células de escolha para o tratamento de disco intervertebral degenerado.

As células-tronco são usualmente denominadas como células pluripotentes, derivam das três linhagens germinativas (endoderma, ectoderma e mesoderma) e possuem a capacidade de originar qualquer tipo celular, de acordo com o microambiente.

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células multipotentes, derivadas do mesoderma, e podem se diferenciar em vários tipos celulares. Uma das principais características de tais células é o fato de não serem imunogênicas. Células-tronco

embrionárias (ES) são pluripotentes e derivadas de estágios iniciais do desenvolvimento embrionário; porém, o desenvolvimento de tumores ainda é um dos graves entraves de utilização destas células (GUTIERREZ-ARANDA *et al.*, 2010).

A utilização de células, como a terapia do processo de degeneração do disco intervertebral, demonstrou, até a presente data, ser segura, embora resultados de tal terapia a longo prazo ainda não foram totalmente elucidados. Ensaios clínicos que utilizam a terapia celular poderão evidenciar vantagens, quando comparamos o tratamento agressivo de intervenções cirúrgicas.

Deve-se considerar que o transplante autólogo de células do disco intervertebral representa uma nova abordagem extremamente segura e tecnicamente mais adequada. Entretanto, uma das desvantagens do uso de células autólogas é o fato de ser necessário a expansão *ex vivo* das células, o que representa um custo adicional, tempo e protocolos padronizados, que vão além do procedimento cirúrgico e dos cuidados médicos, necessitando de uma interface entre profissionais da área básica experimental e médicos.

As células obtidas para o tratamento de disco intervertebral podem ser originadas de culturas bidimensionais (culturas 2D), onde as células são cultivadas em placas ou frascos de poliestireno e crescem em monocamadas. Porém, este sistema apresenta desvantagens, comparativamente com células cultivadas em três dimensões (culturas 3D). As culturas celulares 3D preservam o fenótipo e estão circundadas por matriz extracelular. Tais células podem ser cultivadas em meios de cultura contendo agarose, colágeno, ácido hialurônico ou materiais sintéticos, como ácido poliláctico e polietileno glicol.

Em um nível mais complexo, podemos citar culturas celulares que mimetizam órgãos e tecidos. Por exemplo, pode ser realizada cocultura entre células do NP e AF, em associação com células-tronco mesenquimais. Adicionalmente, a cultura de organoides pode ser obtida a partir de cultura do tecido obtido do disco intervertebral, com o uso de sistema de biorreator, que mimetiza as condições mecânicas (PONNAPPAN *et al.*, 2011; CHAN *et al.*, 2013; WALTER *et al.*, 2014).

No presente trabalho, iremos discutir a padronização de uma metodologia para obter culturas celulares tridimensionais, que poderão servir como modelo experimental para investigar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de degeneração do disco intervertebral. As culturas 3D também poderão ser utilizadas em terapia celular, no processo de regeneração do disco intervertebral.

#### 1.3.1 Cultura tridimensional (Cultura 3D)

Em comparação com outras espécies, os mamíferos possuem órgãos e tecidos que não permitem fácil acesso para análises microscópicas. Em 1907, tal limitação conduziu Harrison e colaboradores a desenvolverem a cultura de células, o que permitiu a análise molecular e celular de maneira mais acessível e fácil (HARRISON *et al.*, 1907; SHAMIR; EWALD, 2014).

Porém, o cultivo celular bidimensional (2D) não representa fielmente a organização celular dos tecidos e órgãos. Isso se deve ao fato da diferença na interação célula-célula e célula-matriz extracelular, que está relacionada tanto pela presença do plástico dos frascos e placas de cultura, quanto pelo crescimento celular em monocamada, visto que as células eucarióticas crescem em ambientes tridimensionais e não em monocamadas.

Já que a interação entre as células e matriz extracelular possui importante papel na modulação de diversos processos celulares, como proliferação celular, diferenciação, migração, apoptose e controle de expressão gênica, tornou-se essencial o desenvolvimento de modelos *in vitro*, que permitissem o estudo experimental (TALUKDAR *et al.*, 2011; JAGANATHAN *et al.*, 2014; SHAMIR; EWALD, 2014; TSENG *et al.*, 2015).

A cultura *ex vivo* de órgãos e tecidos foi descrita em 1929, com o intuito de buscar metodologias *in vitro* mais parecidas com o que é visto de fato na organização de tecidos humanos. Porém, a difusão de moléculas extracelulares para o centro do tecido é um fator limitante deste tipo de estudo (SHAMIR; EWALD, 2014).

Em 1975 e 1980, Barcellos-Hoff e Michalopoulos já haviam observado alterações nas células, quando cultivadas em presença de matriz extracelular, e portanto, sem a interação com o plástico de cultura (MICHALOPOULOS; PITOT, 1975; BARCELLOS-HOFF *et al.*, 1989; ROSSI *et al.*, 2018).

No final dos anos 80, foi demonstrado que a morfogênese *in vitro* de células mamárias podia ser visualizada quando as células eram embebidas em matriz extracelular rica em laminina. As células de mama eram capazes de formar estruturas parecidas com alvéolos e possuíam características, como polarização e secreção direcionada. Essas características foram vinculadas à interação célula-célula e célula-componentes de membrana basal (BARCELLOS-HOFF *et al.*, 1989; PETERSEN *et al.*, 1992; ROSSI *et al.*, 2018).

A seguir, surgiu a definição de esferoides, sistema de cultivo *in vitro* com complexa estrutura tridimensional, que apresenta processo de organização próprio. Com o desenvolvimento de um sistema em que as células não aderem a nenhuma superfície, tais células são forçadas a interagir umas com as outras, o que acelera a produção de componentes de matriz extracelular. Este sistema pode ser obtido com células de cultura bidimensional e coculturas de linhagens estabelecidas diferentes, além de células de explantes de tecidos e órgãos (SIMIAN *et al.*, 2001; GUIBERT *et al.*, 2005; FATA *et al.*, 2007; LANCASTER; KNOBLICH, 2014; LASCHKE; MENGER, 2017; ROSSI *et al.*, 2018).

Portanto, a mudança do cultivo em monocamada para a cultura em três dimensões (cultura 3D) surgiu, de fato, pela necessidade de mimetizar tecidos vivos e aumentar a significância clínica dos ensaios realizados *in vitro*. Consequentemente, tal metodologia de cultura 3D representa um modelo experimental intermediário entre o cultivo celular convencional bidimensional (cultura 2D) e o estudo *in vivo* (PAMPALONI *et al.*, 2007). As diferenças entre os métodos de cultura celular mencionados estão descritas na Figura 11.



Figura 11 - Principais diferenças entre os diferentes métodos de cultivo celular. Nota: A- Cultura 2D. Na cultura 2D, as células interagem com o vidro ou plástico, e são cultivadas em meio de cultura normalmente, com soro fetal bovino. Quando o meio de cultura celular é suplementado com componentes da matriz extracelular, existe diferença na polarização celular. B- Cultura 2,5D. Já no cultivo celular com revestimento de componentes de matriz extracelular, as células não interagem com o plástico, mas ainda repousam sobre o revestimento. C- Cultura 3D. Na cultura 3D, as células interagem entre si, sem contato com o plástico ou revestimento, formando uma organizando similar ao que é visto *in vivo*. Fonte: Adaptado de (SHAMIR; EWALD, 2014).

#### 1.3.1.1 Tipos de cultura 3D

A cultura 3D mais utilizada é realizada com as células embebidas em componentes sólidos da matriz extracelular. O matrigel é o mais utilizado, porém, a variabilidade química dos reagentes naturais torna o controle do ensaio difícil, bem como afeta a reprodutibilidade dos resultados obtidos quando são utilizados tais modelos experimentais.

Além do matrigel, colágeno e hidrogel também são bastante utilizados em métodos de obtenção de culturas 3D (EHRMANN; GEY, 1956; ORKIN *et al.*, 1977; GJOREVSKI *et al.*, 2016; LINDBORG *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2018).

A vantagem dos componentes sintéticos, como o hidrogel, se dá pelo fato de serem quimicamente bem definidos. Porém, alguns tecidos não se diferenciam de maneira adequada e a obtenção dos esferoides 3D somente ocorre com a suplementação do hidrogel com componentes naturais da matriz extracelular, que precisam muitas vezes ser adicionados ao meio de cultura celular (EHRMANN; GEY, 1956; ORKIN *et al.*, 1977; GJOREVSKI *et al.*, 2016; LINDBORG *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2018).

Existe a possibilidade de obter culturas 3D em suspensão, onde não há interação com o revestimento plástico da placa ou frasco de cultura, ou ainda componentes da matriz extracelular. Neste caso, a obtenção da cultura 3D em suspensão ocorre por agregação celular e a suplementação de componentes da matriz extracelular é optativa. A cultura em suspensão pode se dar por utilização de biorreatores, dispositivos microfluídicos e placa com materiais de baixa adesão celular (OTA *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2015; LOPA *et al.*, 2015; SAKAGUCHI *et al.*, 2015; LASCHKE; MENGER, 2017; ROSSI *et al.*, 2018).

Outro método de cultivo é a interface ar-água, onde as células são cultivadas sobre uma membrana porosa e o meio de cultura fica em contato somente com a membrana basal (TAKASATO *et al.*, 2014; TAKASATO *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2018). Os diferentes métodos de culturas tridimensionais (culturas 3D) estão esquematizados na Figura 12.



Figura 12 - Diferentes métodos de cultivo celular 3D. Nota: O cultivo 3D pode ser realizado com matriz natural ou sintética, em suspensão ou utilizando interface ar-água. Fonte: Adaptado de (ROSSI *et al.*, 2018).

Com o objetivo de aumentar a reprodutibilidade, diminuir o custo e o tempo e facilitar o manuseio da cultura 3D, foi desenvolvida uma metodologia com nanopartículas magnéticas, que é desenvolvida utilizando os princípios da técnica de cultura 3D em suspensão. Porém, a organização celular se dá pela interação do agregado celular com a matriz extracelular, produzida pelas próprias células cultivadas. Sendo assim, a suplementação com componentes da matriz extracelular é optativa, o que é um grande benefício em relação ao custo e manutenção de tais culturas celulares (SOUZA *et al.*, 2010; JAGANATHAN *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2017).

Diferente dos biorreatores, com o uso de nanopartículas magnéticas, o agregado celular é formado por atração magnética. Na técnica de *bioprinting*, as nanopartículas de ferro são adicionadas à cultura de células e um ímã é colocado abaixo da placa de cultura celular. Já na técnica de levitação, o ímã é colocado acima da placa de cultura celular, como mostram os esquemas representados na Figura 13 (SOUZA *et al.*, 2010; JAGANATHAN *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2017).



Figura 13 - Diferentes tipos de Cultura 3D, utilizando nanopartículas de ferro. Nota: Na técnica de levitação, o ímã é colocado acima da placa de cultura, as células são atraídas para a superfície do meio de cultura. Na técnica de *bioprinting*, o ímã é colocado abaixo da placa de cultura, as células são atraídas para o fundo da placa de baixa adesão e forçadas a formar um agregado celular. Fonte: Adaptado de (GREINER BIO-ONE, 2016).

## 1.3.2 Aplicações da cultura 3D

Os esferoides celulares, obtidos na obtenção de culturas tridimensionais (3D), representam um modelo experimental que, de forma mais fidedigna, representa as características biológicas dos tecidos *in vivo* (YEUNG *et al.*, 2010; DEKKERS *et al.*, 2013; LANCASTER *et al.*, 2013; XIA *et al.*, 2013; MCCRACKEN *et al.*, 2014; BARTFELD *et al.*, 2015; BOJ *et al.*, 2015; HUCH *et al.*, 2015; TANEJA, 2015; CUGOLA *et al.*, 2016; DROST *et al.*, 2016; QIAN *et al.*, 2016; TAO. *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2018).

A cultura 3D pode ser empregada para o desenvolvimento de novas drogas, determinação de tratamento farmacológico de maneira individual (medicina personalizada), melhor determinação da fisiopatologia das doenças e também como um potente ensaio na investigação de biomarcadores em várias doenças. As possibilidades de utilização de culturas 3D são mostradas na Figura 14 (YEUNG *et* 

*al.*, 2010; DEKKERS *et al.*, 2013; LANCASTER *et al.*, 2013; XIA *et al.*, 2013; MCCRACKEN *et al.*, 2014; BARTFELD *et al.*, 2015; BOJ *et al.*, 2015; HUCH *et al.*, 2015; TANEJA, 2015; CUGOLA *et al.*, 2016; DROST *et al.*, 2016; QIAN *et al.*, 2016; TAO, L. *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2018).

Outra aplicação dos esferoides gerados por culturas celulares 3D é a utilização como terapia celular para medicina regenerativa. Estudos em animais mostraram que o transplante de organoides (esferoides formados por mais de um tipo celular) é seguro e as células transplantadas mantêm as características do tecido original, sendo capazes de se integrarem ao tecido hospedeiro e restabelecerem sua função (FORDHAM *et al.*, 2013; FUKUDA *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; ROSSI *et al.*, 2018).



Figura 14 - Aplicações da cultura 3D.

**Nota**: Os esferoides tentam recapitular as características da biologia *in vivo*. Portanto, esta metodologia pode ser empregada para desenvolvimento de novas drogas, medicina personalizada, melhor determinação da fisiopatologia das doenças e busca de novos biomarcadores. **Fonte**: Adaptado de (ROSSI *et al.*, 2018). A utilização da terapia celular vem sendo estudada como uma possibilidade para tratamento de degeneração de disco intervertebral, já que o transplante de células pode aumentar o número de células viáveis como componentes de matriz extracelular do disco intervertebral. Observou-se que células constituintes do núcleo pulposo parecem ser melhores para este procedimento, porque apresentam menor reação com o sistema imune (PARK *et al.*, 2001; TAKADA *et al.*, 2002; GANEY *et al.*, 2003; LEO *et al.*, 2004).

Dados da literatura mostraram resultados favoráveis no transplante de células de núcleo pulposo dentro de discos intervertebrais degenerados (PARK *et al.*, 2001; TAKADA *et al.*, 2002; GANEY *et al.*, 2003; MEISEL *et al.*, 2007; OEHME *et al.*, 2015). Porém, a escassez do número de células no núcleo pulposo escasso representa uma limitação para a obtenção de células suficientes para a realização deste procedimento de formação de esferoides. A expansão inicial em cultura celular pode ser uma alternativa para aumentar o número de células do núcleo pulposo, lembrando que tal cultivo celular não deve alterar as características celulares do tecido original (PARK *et al.*, 2001; TAKADA *et al.*, 2002; GANEY *et al.*, 2003; LEO *et al.*, 2004).

Um dos objetivos do presente estudo será padronizar uma metodologia para obtenção de culturas tridimensionais de células do NP e investigar a possível utilização de tais culturas 3D, como alternativa de obtenção de células-tronco de disco intervertebral com degeneração.

### 1.4 MICROSCOPIA

A compreensão de mecanismos moleculares sobre o funcionamento celular foi adquirida a partir do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e bioquímica, tais como *western blotting*, cromatografia, citometria de fluxo, entre outros ensaios que avaliam a composição de moléculas constituintes das células. Entretanto, cumpre ser observado que as técnicas bioquímicas e de biologia molecular não são aplicadas a uma única célula, mas a um conjunto de células (tecidos). Por outro lado, o padrão ouro para análises morfológicas/estruturais de tecidos e células envolve fixação em formol tamponado e coloração por Hematoxilina e Eosina de tecidos de biópsias ou ressecções cirúrgicas para avaliação patológica, resultando em uma avaliação experimental que permite apenas a obtenção de resultados estruturais, perdendo a informação química das células. Portanto, a microscopia passou a ter uma importância ímpar para estudos da composição química de células e tecidos intactos.

Portanto, análises que permitam a observação de processos celulares nos aspectos bioquímicos e biomecânicos, não destrutivas e em tempo real, com resolução subcelular, são o grande desafio para entender a bioquímica, mantendo a forma do sistema. Técnicas de microscopias ópticas são as principais ferramentas capazes de observar esses processos celulares, com o mínimo de dano biológico.

A seguir, serão descritos princípios de microscopia que descrevem a peculiaridade de cada tipo específico de análises realizadas em microscópios. Tais princípios foram descritos de maneira extremamente didática e, por essa razão, partes deste trabalho serão utilizados no texto apresentado a seguir (PELEGATI, 2010).

A sensibilidade da microscopia óptica permite a detecção de um único fóton, que pode ser devido à fluorescência de uma única molécula. Uma molécula fluorescente emite uma taxa de 1 bilhão de fótons por segundo, o que, em uma taxa de emissão constante, permite facilmente a observação de eventos em tempo real, e bem abaixo dos tempos típicos de difusão molecular. Um grande passo proporcionado pelas microscopias ópticas foi o princípio da confocalidade, que permite a aquisição de imagens em três dimensões de amostras espessas. Na microscopia confocal, um orifício micrométrico, denominado *pinhole*, é usado para rejeitar qualquer luz proveniente de regiões que não estejam no plano focal, sendo possível adquirir imagens em diferentes profundidades.

Os primeiros microscópios confocais adquiriam imagens movendo a amostra e mantendo o feixe de luz estático. Essa configuração se mostrou incompleta, devido à perda de precisão ao mover a amostra. Nos confocais modernos, o feixe de um *laser* é varrido sobre a amostra, que é mantida estática. O caminho óptico da fluorescência é o mesmo do feixe de excitação, garantindo que, ao passar de volta pelos dois

espelhos de varredura *(scanning),* o feixe de fluorescência torne-se colinear com o feixe de excitação. A microscopia confocal permite a reconstrução em três dimensões de estruturas, a partir de imagens em duas dimensões de diferentes profundidades (PELEGATI, 2010).

Além da microscopia confocal, surgiram as microscopias de óptica não linear. Processos não lineares ocorrem na presença de um ou mais fótons e, para isso, é necessário que esses fótons coincidam no tempo e no espaço, com a excitação da fluorescência ocorrendo apenas no volume focal. Dessa forma, não é necessário rejeitar luz advinda das camadas acima e abaixo da região focal, e as imagens adquiridas com 15 processos não lineares são naturalmente confocais, não necessitando do uso de pinhole. Nos processos de óptica não linear não ressonantes, o elétron é excitado para um nível virtual; é praticamente instantâneo, pois o elétron excitado só permanece no nível virtual pelo período de tempo dado pelo princípio da incerteza, e será inversamente proporcional à diferença entre o nível virtual e o nível real mais próximo. Conseguir efeitos não lineares com lasers contínuos necessitaria potências altas demais, o que causaria danos térmicos nas amostras. A utilização de lasers pulsados com duração de picossegundos ou femtossegundos, conhecidos como pulsos ultracurtos, nos quais a potência de pico é muito mais alta do que a potência média, facilitou imensamente a exploração desses efeitos para microscopia. Os processos não lineares incluem a fluorescência excitada por dois ou mais fótons, que têm espectro e direção de emissão igual à fluorescência por um fóton, mas é naturalmente confocal (PELEGATI, 2010).

Outros processos não lineares aplicáveis à biologia celular são processos coerentes, que incluem a geração de harmônicos. As microscopias de segundo harmônico [SHG] e terceiro harmônico [THG] não utilizam marcadores exógenos e permitem reconstrução de imagens em três dimensões com resolução espacial subcelular, aproximadamente 300 nm lateral e 500 nm axial. Em amostras animais, a microscopia SHG visualiza a matriz de colágeno, enquanto a microscopia THG visualiza heterogeneidades com contraste advindo da variação da susceptibilidade de terceira ordem (3)  $\chi$ , que varia por ordens de grandeza em diferentes materiais. Como cada emissão não linear coerente é devido a um processo particular, que não ocorre

em qualquer estrutura, elas não necessitam de marcadores exógenos, por isso são adequadas para estudo de tecidos *in vivo* ou de processos celulares, onde a adição de um marcador significa modificar o meio a ser estudado.

A janela mais interessante para a detecção dos comprimentos de ondas é no visível, onde a maioria dos detectores têm boa eficiência. Para efeitos multifótons, isso significa o uso de lasers no infravermelho, que proporcionam maior penetração em meios espalhadores. Devido a essas características, nos últimos anos as ferramentas de microscopias de óptica não linear se consolidaram como uma poderosa fonte de informações para estudos biológicos (PELEGATI, 2010).

Em amostras biológicas sem autofluorescência, ou que não suportam marcação exógena, a microscopia Raman e infravermelha podem ser usadas como mecanismo de contraste, baseado em propriedades vibracionais das moléculas. Entretanto, a microscopia infravermelha convencional está limitada a uma baixa resolução espacial, pois é realizada com grandes comprimentos de onda. Além disso, todo sistema biológico vivo está imerso em água, o que significa uma absorção muito alta do infravermelho após 2500 nm, onde começam as vibrações do hidrogênio, tornando as amostras opacas. O Raman traz a informação das vibrações moleculares do infravermelho para o visível, eliminando os problemas da baixa resolução espacial e opacidade das amostras. Além disso, a microscopia Raman pode ser utilizada em conjunto com sistemas confocais de varredura, para adquirir imagens com seletividade química. O problema em utilizar Raman para imagens está em sua baixa sensibilidade, que força a utilização de grande tempo de aquisição, e é um entrave para a aplicação em células e tecidos vivos.

#### 1.4.1 Microscopia RAMAN

Descoberta na década de 1920 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, a técnica de espectroscopia Raman, chamada assim em homenagem ao cientista, tornou-se, nos últimos anos, uma grande aliada da ciência. Quando a luz incide em uma molécula, os átomos que a compõem vibram, e essa vibração faz com que a luz reemitida tenha componentes de frequência diferentes da luz incidente. Quando um feixe de luz intenso e de uma única cor atravessa determinado material ou objeto, a luz espalhada mostrava, além da radiação de mesma frequência da luz incidente, uma série de novas linhas extremamente fracas, o que foi chamado de espalhamento inelástico da luz. Como em cada tipo de material, os átomos vibram de maneira diversa, cada material emite uma luz própria que conta a sua história, como uma impressão digital.

Entretanto, a técnica de espalhamento da luz era limitada, pela dificuldade de obtenção de luz monocromática. Mas, em 1960, o primeiro laser possibilitou obter espectros de amostras sólidas com alta intensidade e qualidade de resolução. A Figura 15 evidencia esquematicamente o princípio da técnica de RAMAN.



#### Figura 15 - Esquema que exemplifica o efeito RAMAN.

**Nota**: Quando a luz monocromática incide em determinada matéria, podem ser desencadeadas a absorção, vibração, reflexão ou até mesmo a fluorescência. Isso ocorre quando a incidência de luz muda o nível de energia da matéria, sendo capaz a geração de informações específicas sobre o material analisado. **Fonte da figura**: Universidade Federal de Uberlândia. Disponível em: http://www.gem.infis.ufu.br/raman.

É importante destacar que os espectros obtidos pelo espalhamento da luz são representados na forma de um gráfico, sendo que existe uma espécie de catálogo com o espectro Raman para cada tipo de material, sendo possível, deste modo, identificar os diferentes compostos e moléculas.

Em nosso estudo, a microscopia RAMAN foi utilizada para avaliar a composição de lipídeos e colágenos nas esferas celulares 3D. A microscopia RAMAN é também conhecida como espectroscopia vibracional que, ao ser utilizada com a autofluorescência, adquire informações sobre as composições bioquímicas de uma determinada célula/tecido, de forma que seja preservada sua integridade morfológica, produzindo, assim, espectros visíveis (espectros eletromagnéticos, cuja radiação é composta por fótons), baseados na interação do laser com a célula/tecido. Ou seja, as informações moleculares podem ser obtidas sem a necessidade de marcação (POTMA; XIE, 2004; KONG *et al.*, 2015).

Sabe-se que as moléculas são compostas por átomos e que esses átomos são mantidos juntos por interações químicas que, ao serem estimulados pelo laser, entram em estado de energia virtual, estimulando o elétron a ir para um nível de energia virtual mais alto. A forma como o elétron retorna para o nível energético pode variar, dando origem a diferentes tipos de espalhamentos, como espalhamento elástico (quando o elétron, após ser excitado, decai ao mesmo nível de energia inicial) e espalhamento inelástico (quando o elétron excitado decai para um nível de energia diferente da sua energia inicial, podendo ser superior ou inferior à sua energia original) (SMEKAL, 1923).

Existem dois tipos de espalhamento no RAMAN, que são dependentes da energia final dos elétrons, ou seja, dois tipos de espalhamentos inelásticos: se o nível de energia final do elétron for superior à energia inicial/original, o fóton inelasticamente disperso será deslocado para uma frequência menor e, por esse motivo, será denominado como deslocamento de Stokes. Já se o nível de energia final for menor do que a energia inicial, o fóton será deslocado para uma frequência o nível de energia final for menor do que a energia inicial, o fóton será deslocado para uma frequência mais alta, sendo assim denominado deslocamento anti-Stokes (RAMAN, 1928). Os fótons dispersos dão origem a um espectro único de picos, que são baseados nas ligações presentes na amostra, sendo diretamente proporcionais à concentração de moléculas nas quais

estão sendo analisadas. No caso das esferas de disco, a análise foi feita para detecção de colágeno e lipídeos (CHENG; XIE, 2015).

2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar uma metodologia adequada para obtenção de culturas celulares tridimensionais (culturas 3D), a partir de ressecções cirúrgicas do núcleo pulposo de discos intervertebrais degenerados.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir das culturas 3D obtidas de disco intervertebral degenerado, caracterizar células-tronco nos esferoides celulares obtidos, visto que tais células apresentam potencial aplicação na medicina regenerativa do disco intervertebral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS POR RESSECÇÃO CIRÚRGICA

As três amostras foram obtidas de pacientes que apresentavam hérnia discal cervical protusa. As cirurgias para coletas das amostras foram realizadas no Hospital AACD e da Rede São Luiz, e realizadas de março a novembro do ano de 2017. Os pacientes apresentavam dor cervical com radiculopatia, paresia e/ou diminuição do reflexo osteotendinoso profundo do músculo correspondente ao nível comprometido entre a terceira e quarta década de vida, durante as fases iniciais de degeneração do disco intervertebral, que apresentava fissuras da circunferência do ânulo fibroso. A cirurgia foi realizada após a falta de resposta do tratamento clínico por um período de 2 a 3 meses, ou se apresentavam dor intratável ou disfunção neurológica progressiva. A opção do tratamento cirúrgico foi de artrodese cervical, introduzindo uma abordagem realizada de maneira anterior, com uma incisão transversal no limite dos segmentos acometidos, partindo de 1 cm à frente da borda do músculo esternocleidomastoideo até a linha média cervical, do lado direito do paciente, como mostra a Figura 16. Foi utilizada a radioscopia durante todo o procedimento. O platisma foi aberto em cruz, para uma maior exposição da coluna cervical, afastado lateralmente o feixe vásculo-neural, e medialmente o esôfago e a traqueia, sendo identificado o corpo vertebral e feita a incisão nos ânulos fibrosos, para remoção dos discos intervertebrais acometidos.

O procedimento cirúrgico seguiu as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurocirurgia, Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia e Sociedade Brasileira de Reumatologia (2012). A região central de cada amostra de núcleo pulposo foi mergulhada em meio de cultura estéril *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) + F12, em presença de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 50 µg/mL de gentamicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. A amostra foi mantida em temperatura ambiente por no máximo 1 hora, encaminhada para o laboratório e mantida a 4°C, por no máximo 18 horas, e subsequentemente utilizada para a obtenção de culturas celulares, como mencionado a seguir. Durante o procedimento cirúrgico, após a remoção de amostras do núcleo pulposo, foi introduzido enxerto

ósseo de hidroxioapatita, juntamente com o *cage* cervical autotravante nos segmentos comprometidos (Figura 16 B).



Figura 16 - A - Ressonância Nuclear Magnética T1 pré-operatória; B - imagem intraoperatória; C - Raio X da coluna cervical pós-operatório.

# 3.2 PROCESSAMENTO DE TECIDO E OBTENÇÃO DE CULTURA CELULAR PRIMÁRIA

As amostras de disco intervertebral foram adquiridas por ressecção cirúrgica do núcleo pulposo do disco intervertebral, de pacientes que apresentavam degeneração discal. A amostra foi submetida a exaustivas lavagens em meio de cultura estéril, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, contendo Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> (Sigma Aldrich, Missouri, EUA). O tecido foi triturado manualmente com tesoura, estilete, e então digerido com 500 µL de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na concentração de 10 mg/mL (GIBSON *et al.*, 1998). A incubação do tecido com a enzima colagenase foi mantido em banho a 37°C, por 1 hora, com frequentes agitações. A enzima foi inativada com 500 uL de tripsina e a amostra submetida à dissociação mecânica, utilizando seringa e três tipos de agulhas com diferentes calibres, G18, G21 e G22, respectivamente. Entre as dissociações mecânicas com agulhas, as células foram filtradas com EASYstrainer<sup>®</sup> (Greiner Bio-One, Kremsmünster Áustria), com capacidade de filtração entre 70 e 40 µm. A amostra foi

centrifugada a 1.500 rpm, durante 3 minutos. Todo sobrenadante foi descartado e o *pellet,* contendo as células dissociadas, foi plaqueado em meio de cultura DMEM + F12, em presença de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 50 µg/mL de gentamicina, 2,5 µg/mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em estufa a 37°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até adquirirem a confluência adequada para os experimentos subsequentes de formação dos esferoides.

#### 3.3 FORMAÇÃO DO ESFEROIDE COM NANO SHUTTLE™

Para magnetizar as células, foram utilizadas nanopartículas NanoShuttle<sup>™</sup> (n3D, Biosciences, Greiner Bio-One), conforme descrito pelo fabricante. Estas nanopartículas se ligam na membrana celular e, com a utilização de um ímã por 18 horas, as células são aproximadas para formação do esferoide (SOUZA *et al.*, 2010; CASTRO-CHAVEZ *et al.*, 2013; TIMM *et al.*, 2013; TSENG *et al.*, 2013; TSENG *et al.*, 2014). Resumidamente, a obtenção da cultura celular tridimensional foi realizada seguindo metodologia semelhante à descrita por Jaganathan e colaboradores (JAGANATHAN *et al.*, 2014). Em resumo, as células obtidas do núcleo pulposo foram cultivadas em monocamadas e incubados por 12 horas, com nanopartículas magnéticas (Nanoshuttles<sup>™</sup>, Greiner Bio-One). Posteriormente, as células foram desaderidas, com solução de tripsina por 5 minutos e magnetizadas por um ímã, como mostra o esquema abaixo (Figura 17).



Figura 17 - Representação esquemática do ensaio experimental para obtenção de cultura tridimensional (3D).

Nota: Amostras do núcleo pulposo, obtidas por ressecção cirúrgica, foram processadas como descrito anteriormente e as células obtidas foram mantidas em placas de cultura (P60 mm), até obtenção de confluência. Em seguida, foram adicionadas nanopartículas magnéticas de ouro NanoShuttle™ à Placa P60 (n3D, Biosciences, Greiner Bio-One), e mantidas por 24 horas (culturas 2D). Posteriormente, as células da cultura 2D foram subcultivadas em placas de *multiwell* antiaderentes (96 poços), e mantidas em contato com a placa de ímã durante 18 horas, possibilitando a formação do esferoide 3D, que é mantido mesmo após a remoção do ímã.

### 3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células cultivadas bidimensionalmente, assim como as esferas celulares (culturas 3D), foram fixadas com paraformaldeído 4% e lavadas exaustivamente em tampão fosfato-salino, contendo Tween-20 20% (NaCl - 0,137 M; KCl - 0.0027 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.01 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.0018 M). Subsequentemente, foram armazenadas em metanol -20°C, por pelo menos 18 horas. Os esferoides celulares foram reidratados com lavagens sucessivas de 5 minutos (metanol 95%, metanol 75%, metanol 50%, metanol 25% e 100% de PBST). Os esferoides foram permeabilizados com acetona 4°C, e novamente lavados com solução tampão fosfato (PBST). Após lavagem, as esferas celulares 3D foram incubadas por 1 hora em solução de bloqueio (PBST contendo 5% de albumina). Em seguida, foi adicionado anticorpo primário específico na concentração de 1:100, durante 24 horas, a 4ºC. Os anticorpos primários estão mostrados na Tabela 1. Após 24 horas, as esferas foram lavadas em solução de bloqueio (PBST contendo 5% de albumina) por 20 minutos e, então, submetidas a 6 lavagens com PBST, com duração de 20 minutos cada. As esferas foram incubadas com o anticorpo secundário, conforme mencionado na Tabela 1 (AlexaFluor®, Molecular Probes, Óregon, EUA), com diluição de 1:250, por 18 horas, a 4ºC. As esferas foram lavadas em solução de bloqueio por 20 minutos e submetidas a 6 lavagens com PBST, com duração de 20 minutos cada. A coloração dos núcleos celulares foi realizada utilizando 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI), em diluição de 1:10.000, por 30 minutos. O DAPI foi removido, os esferoides foram lavados com solução de bloqueio, refixados com paraformaldeído e lavados com PBST. As imagens foram analisadas em microscópio confocal (Leica TCS SP8, Wetzlar, Alemanha).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nas reações de imunofluorescência.
Anticorpo monoclonal IgG HCAM (IM-7) SC-18849 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA)
Anticorpo policlonal IgG anti-Aggrecan (D-20) SC-16492 (Santa Cruz Biotechnology)
Anticorpo monoclonal IgG anti-CRTAC1 755315 (ThermoFisher Scientific, Waltham,
Massachusetts, EUA)
Anticorpo policlonal IgG anti-TGF-β (V) SC-146 (Santa Cruz Biotechnology)
Anticorpo policional IgG anti-Biglicam (L-15) SC- 27936(Santa Cruz Biotechnology)
Anticorpo secundário IgG anti-rat (Molecular Probes)
Anticorpo secundário IgG anti-goat (Molecular Probes)
Anticorpo secundário IgG anti-rabbit (Molecular Probes)
Anticorpo secundário IgG anti-mouse (Molecular Probes)

# 3.5 MICROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN "COHERENT ANTI-STOKES RAMAN SCATTERING" (CARS)

Os tecidos foram analisados utilizando Microscópio Confocal TCS SP8CARS (Leica). Este sistema consiste em um microscópio invertido (DMI 6000 CSTrino, Leica), equipado com uma fonte de luz de fundo pico Emerald (APE). A luz de excitação foi focalizada usando um plano de objetivo multi-imersão apocromática (HC PL APO CS2 20 × / 0,75). A fonte foi ajustada para 816,2 nm, para excitar ressonantemente a vibração de estiramento simétrica dos grupos metileno a 2850 cm-1. O detector Epi-CARS foi utilizado para detectar os sinais CH<sub>2</sub>, enquanto o Epi-SHG foi utilizado para detectar a geração harmônica das fibras de colágeno. As imagens foram representadas como projeções de intensidade máxima, correspondendo à série Z de imagens do confocal, foram coletadas por varredura e processadas com o *software* Leica LAS AF.

## 3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Esferas obtidas do cultivo tridimensional de células do NP de discos intervertebrais acometidos por degeneração foram fixadas em formalina embebidas em parafina e, subsequentemente, submetidas a cortes de 3 µm de espessura. As lâminas, contendo os cortes, foram desparafinizadas e reidratadas. Em seguida, foi realizada coloração com hematoxilina-eosina (HE) e Alcian Blue.
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos estudos mostram que existem alterações do perfil de expressão gênica, dependendo do método de cultivo celular, sendo que alterações significativas são evidentes quando comparadas às células cultivadas em monocamada (culturas 2D) ou cultivo tridimensional (culturas 3D (GRUBER *et al.*, 1997; GRUBER; HANLEY, 2000; WANG *et al.*, 2001; HORNER *et al.*, 2002; CHOU *et al.*, 2006; CHOU *et al.*, 2008). Observou-se que a cultura 3D favorece a diferenciação das células progenitoras em condrócito diferenciado (SHEN *et al.*, 2009; WEI *et al.*, 2014).

Horner e colaboradores mostraram maior incorporação de sulfato radioativo [S<sup>35</sup>-sulfato] em células de cultura 3D, em comparação com a cultura 2D de células de núcleo pulposo, além de alteração de expressão de glicosaminoglicanos. Wang e colaboradores evidenciaram aumento na expressão de agrecam quando cultivado sobre matriz de alginato (cultura 3D), quando comparada à expressão do mesmo proteoglicano em cultivo 2D, ou seja, as células diretamente em contato com o plástico da placa de cultura (WANG *et al.*, 2001; HORNER *et al.*, 2002).

Os resultados da literatura sugerem que o modelo de cultura tridimensional apresenta variações, quando comparado ao modelo bidimensional, sendo que culturas 3D se aproximam de forma mais fiel ao ambiente em que as células se encontram nos tecidos, o qual é um ambiente circundado por matriz extracelular e tridimensional.

Por este motivo, tivemos o interesse em padronizar uma metodologia de cultivo tridimensional de células obtidas por ressecção cirúrgica do núcleo pulposo de pacientes acometidos por degeneração do disco intervertebral.

Tal estudo apresenta uma outra abordagem, com o objetivo de também obter células mesenquimais de notocorda da cultura 3D obtida, pois tais células apresentam a capacidade de diferenciação em condrócitos maduros de núcleo pulposo.

A obtenção de culturas 3D de células do NP de discos intervertebrais degenerados possibilita um modelo experimental adequado para avaliar marcadores moleculares e investigar mecanismos moleculares envolvidos com o processo de degeneração discal. Além disso, as culturas tridimensionais de células do NP vislumbram uma possível ferramenta para a utilização de tais culturas em medicina regenerativa do disco intervertebral.

O cultivo *in vitro* de células-tronco mesenquimais isoladas do núcleo pulposo de disco intervertebral permitiu evidenciar que tais células podem se diferenciar em linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica, dependendo das condições de cultivo (JIA *et al.*, 2017).

Diferente do ânulo fibroso que tem origem da mesoderme, as células-tronco mesenquimais do núcleo pulposo têm origem de células da notocorda. Quando isoladas e cultivadas como monocamada, apresentam morfologia similar a fibroblastos (LI *et al.*, 2018).

O agrecam, um proteoglicano de condroitim sulfato e queratam sulfato, representa um dos principais marcadores que caracterizam a presença de condrócitos. É importante lembrar que o agrecam também apresenta alta expressão em células-tronco de notocorda, que estão em estágios de diferenciação em condrócitos, sendo que outros tipos de células-tronco são negativas para agrecam (RODRIGUES-PINTO *et al.*, 2013).

Por este motivo, as culturas 2D e 3D, obtidas de tecidos coletados por ressecção cirúrgica do NP de pacientes acometidos por degeneração do disco intervertebral, foram analisadas para marcação de agrecam.

Na figura 18, observa-se a presença de agrecam nas células em cultura 2D e 3D.



Figura 18 - Marcação em cultura dimensional e tridimensional de disco intervertebral. Nota: A marcação do núcleo foi realizada com DAPI (azul), o agrecam foi marcado utilizando o anticorpo policional IgG anti-agrecam e AlexaFluor® 488 (verde). A microscopia confocal analisou tanto a cultura celular em monocamada quanto o esferoide formado na cultura 3D. A aquisição das imagens foi feita por microscopia confocal, com a objetiva de 40x. O esferoide apresenta intensa marcação para agrecam.

Entretanto, observamos que a cultura 3D apresenta maior marcação para agrecam, em comparação com a cultura convencional 2D (Figura 18), comprovando que a obtenção de culturas tridimensionais favorece a obtenção de um maior número de células, o que pode representar uma vantagem para o uso da cultura 3D, para um modelo experimental de estudo do processo de degeneração do disco intervertebral e também a possibilidade de utilização em terapia celular.

A marcação com o proteoglicano de alto peso molecular de condroitim sulfato e queratam sulfato (agrecam) sugere que as células obtidas por cultura 2D e 3D do NP são condrócitos diferenciados, visto que estes sintetizam intensamente tal proteoglicano. A Cartilage acidic protein 1 (CRTAC1) é uma proteína característica de matriz extracelular, utilizada como marcador de diferenciação de células-tronco em condrócitos. Foi evidenciado que tal proteína apresenta alta expressão em articulações (FRIEDL *et al.*, 2007; ALSHAMMARI *et al.*, 2015).

Os esferoides obtidos de células do NP obtidas por ressecção cirúrgica de pacientes acometidos por degeneração do disco intervertebral foram marcados com anticorpo anti-CTRAC1.

Como mostrado na Figura 19, os esferoides apresentam intensa marcação para CRTAC1, o que corrobora o fato de as células presentes no cultivo 3D representarem condrócitos maduros, sendo mais uma evidência da presença de condrócitos nos esferoides.



Figura 19 - Marcação de CRTAC1 em cultura tridimensional de disco intervertebral. Nota: A marcação do núcleo foi realizada com DAPI (azul), o CRTAC1 foi marcado utilizando o anticorpo monoclonal IgG anti-CRTAC1 e AlexaFluor® 594 (vermelho). A aquisição das imagens foi feita por microscopia confocal, com a objetiva de 40x. O esferoide apresenta marcação para CRTAC1.

CD44 é uma glicoproteína de superfície celular, envolvida nas interações célula-célula, adesão celular e migração celular. Em humanos, o antígeno CD44 é codificado no cromossomo 11 e representa o receptor de ácido hialurônico, também conhecido como HCAM (*Homing Cell Adhesion Molecule*).

O CD44 (HCAM) é um marcador característico de células progenitoras; no caso do disco intervertebral, é um marcador de células-tronco específicas do núcleo pulposo, pois somente células-tronco da notocorda apresentam marcação de CD44 (SHEN *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2015).

As células de disco intervertebral foram analisadas por imunofluorescência, para verificar o perfil de expressão de CD44 (HCAM). Na Figura 20, é possível verificar alta expressão de CD44 em toda a esfera formada na cultura 3D de NP do disco intervertebral de pacientes acometidos por degeneração discal.

Um estudo de Stevens e colaboradores mostrou que apenas disco de ratos em desenvolvimento embrionário tardio tinham marcação para CD44, isto é, este não é expresso em células-tronco da notocorda antes da diferenciação para formação do disco intervertebral. Portanto, o CD44 é um marcador de células-tronco mesenquimais, já designadas para diferenciação em condrócitos no núcleo pulposo (STEVENS *et al.*, 2000).

Vale ressaltar que o CD44 apresenta marcação positiva para células-tronco de outros tecidos, como as de cordão umbilical, por exemplo. Portanto, outros marcadores são necessários para confirmar que as células-tronco obtidas de tecido humano e cultivadas *in vitro* serão diferenciadas em condrócitos (WU *et al.*, 2017).



**Figura 20 - Microscopia Confocal de cultura tridimensional de disco intervertebral.** Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (**azul**) e o CD44 foi marcado com o anticorpo monoclonal IgG HCAM (**vermelho**). **A**, imagem bidimensional do esferoide **B**, lateral do esferoide (reconstrução 3D de microscopia z-stack). A objetiva foi de 40x. A microscopia confocal mostra alta expressão de CD44 em todas as regiões do esferoide.

As marcações de agregam, CRTAC1 e CD44 nos esferoides formados determinam que as células presentes na cultura 3D representam condrócitos maduros de núcleo pulposo que, possivelmente, derivam de células-tronco mesenquimais da notocorda que também estão presentes na população celular dos esferoides formados.

Um fato que chamou nossa atenção ao obter a cultura tridimensional de células obtidas do NP de disco intervertebral degenerado foi a projeção observada em uma porção do esferoide. Investigando uma possível explicação para a formação de tal projeção, encontramos dados na literatura que relatavam que, em tais projeções das culturas 3D, encontram-se células-tronco.

A Figura 21 foi obtida como resultado de material científico publicado pela Greiner Bio-One (2018), que caracterizou a presença de células-tronco humanas mesenquimais diferenciadas para condrócito em cultura 3D. A morfologia do esferoide é similar ao obtido pelo grupo.



Figura 21 - Células-tronco mesenquimais diferenciadas para condrócito. Esferoide obtido em material científico, apresenta morfologia similar ao obtido por nosso grupo Fonte: (GREINER BIO-ONE, 2018).

Diversos estudos já mostraram que as células-tronco mesenquimais expressam TGF-β, sendo tal fator importante para os processos de proliferação celular, diferenciação celular e desenvolvimento do núcleo pulposo, pois a maior expressão de TGF-β parece aumentar o potencial condrogênico, já que a diferenciação de células-tronco para condrócito parece ser mediada por proteínas SMAD, que estimula a expressão do fator de transcrição condrogênico SOX9 (FRISCH *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016; ARAÚJO FARIAS *et al.*, 2018).

Foi demonstrado que o núcleo pulposo de camundongos com deleção condicional do receptor tipo 2 do TGF- $\beta$  (TGFBR2) apresentava redução, em relação ao NP de camundongos controle (BAFFI *et al.*, 2004). Camundongo *knockout* para biglicam, um proteoglicano de baixo peso molecular constituído por cadeias de condroitim sulfato e dermatam sulfato, mostrou diminuição da atividade de TGF- $\beta$ , sugerindo que tal proteoglicano parece modular a atividade de TGF- $\beta$  (YAMAGUCHI *et al.*, 1990). Além do estímulo na atividade do TGF- $\beta$  pelo biglicam, o próprio TGF- $\beta$  possui a capacidade de aumentar a expressão gênica de biglicam (HEEGAARD *et al.*, 2004).

O biglicam é importante na manutenção de células-tronco, pois dados da literatura mostraram que em células-tronco de medula óssea que superexpressam biglicam parecem favorecer a proliferação celular (WU *et al.*, 2013). Dada a importância da sinalização de TGF- $\beta$  e a modulação do TGF- $\beta$  pelo biglicam, a expressão de TGF- $\beta$  e biglicam foi analisada na cultura 3D e 2D de células obtidas do NP de pacientes que apresentavam degeneração do disco intervertebral (Figura 22).



Figura 22 - Comparação de cultura dimensional (A) e tridimensional (B) de células obtidas de núcleo pulposo de disco intervertebral.



Como podemos observar, a cultura 3D apresenta maior expressão de TGF- $\beta$  e biglicam, quando comparada com a expressão de tais moléculas na cultura bidimensional obtida do mesmo tecido. É interessante salientar que, em ambos os casos, o TGF- $\beta$  e biglicam possivelmente apresentam colocalização, pois quando as imagens de ambos marcadores são sobrepostas, podemos observar a cor amarela, que corresponde à sobreposição da fluorescência vermelha (marcação do TGF- $\beta$ ) com a fluorescência verde (marcação de biglicam), como mostra a Figura 22.

A alta expressão de TGF-β e biglicam corroboram com os dados descritos na literatura, confirmando que as células-tronco mesenquimais obtidas neste estudo podem apresentar capacidade para diferenciação em condrócitos.

Barry e colaboradores demonstraram que o TGF-β estimula a síntese de componentes da matriz extracelular, como agrecam e colágeno tipo II (BARRY *et al.*, 2001; ARAÚJO FARIAS *et al.*, 2018). Por este motivo, foi analisada a expressão de colágeno utilizando microscópio RAMAN para análise dos esferoides, sendo que o colágeno está localizado tanto na matriz extracelular como na intracelular (Figura 23).



Figura 23 - Marcação de lipídeo (RAMAN) e colágeno pelo método de segundo harmônico (SHG). Nota: A, foi realizada a detecção de lipídeo (vermelho) pelo fenômeno de RAMAN. B, a esfera foi exposta a uma vibração de 2855 cm<sup>-1</sup>, onde foi detectado colágeno (verde) e C, a colocalização de colágeno e lipídeos (amarelo). O esferoide expressa colágeno e esta molécula está localizada tanto na matriz extracelular quanto intracelular.

A Figura 23 também representa a distribuição de lipídeos, bem como a sobreposição das imagens obtidas por microscopia RAMAN.

Para confirmar que o centro da esfera apresenta células circundadas por rica matriz extracelular, foram realizados cortes histológicos nos esferoides e subsequente coloração com hematoxilina e eosina (H&E), confirmando a histologia do esferoide com detecção de muitas células e fibras colágenas.

A coloração com Alcian Blue permitiu a visualização de glicoconjugados, essencialmente glicosaminoglicanos, que representam um dos principais constituintes da matriz extracelular (Figura 24).

## H&E

## **Alcian Blue**



Figura 24 - Corte histológico das esferas de núcleo pulposo (NP) Nota: H&E, corte histológico do esferoide de NP com coloração hematoxilina e eosina; coram em rosa as fibras colágenas e citoplasma, já o núcleo é corado na cor roxa. Alcian Blue, corte histológico do esferoide de NP com coloração Alcian Blue; coram em azul, principalmente os glicosaminoglicanos.

Foi confirmado que, no centro do esferoide, existe a presença de células (H&E, roxo, núcleo), apresentando grandes quantidades de matriz extracelular (Alcian Blue, azul, glicosaminoglicanos).

5 CONCLUSÃO

O método de obtenção de cultura 3D, estabelecido no presente estudo, permite concluir que as células coletadas a partir da amostra do NP por ressecção cirúrgica de disco intervertebral degenerado são capazes de se diferenciar condrócitos com alta capacidade de proliferação e produção de matriz extracelular.

Sugerimos que os condrócitos da cultura tridimensional sejam originados de células-tronco presentes no NP dos discos intervertebrais degenerados, pois sabidamente existem células-tronco notocordais presentes no NP.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS

Aproximadamente 80% da população mundial experimenta algum tipo de dor nas costas em alguma fase de vida, sendo que, em 10% de tal população, as dores acarretam incapacidade crônica, deflagrando alto custo para o tratamento desses pacientes, além de comprometer as habilidades de trabalho e convívio social desses indivíduos.

Alterações significativas de constituintes da matriz extracelular são observadas em pacientes acometidos por degeneração do disco intervertebral, como diminuição de colágeno tipo II; diminuição de proteoglicanos de alto peso molecular, como agrecam; aumento de proteoglicanos de baixo peso molecular, como decorim e biglicam, e alterações na expressão de metaloproteases, catepsinas e glicosidases, como heparanase.

As estratégias de tratamento atuais incluem o procedimento cirúrgico por ressecção do disco intervertebral degenerado, bloqueio de raízes nervosas e fisioterapia. Entretanto, tais tratamentos apenas aliviam os sintomas e não impedem que ocorra degeneração de discos intervertebrais. Portanto, novas estratégias terapêuticas incluem a manipulação de células com o objetivo de recuperar o disco degenerado.

A utilização de transplante autólogo de condrócitos representa uma das formas de terapia celular, visto que tais células efetivamente participam da formação de matriz extracelular do disco intervertebral e, assim, contribuem com o processo de regeneração do disco intervertebral. Entretanto, existem limitações nesse tipo de terapia, que envolvem a necessidade de expansão dos condrócitos em cultura, pois tais células apresentam velocidade lenta de proliferação *in vitro*, além de necessitar da remoção de biópsias de disco intervertebral adjacente ao disco intervertebral degenerado, o que pode lesionar tal tecido e contribuir para um processo de degeneração discal.

Diante de tais considerações, o uso de células-tronco mesenquimais (MSC) coletadas da medula óssea mostrou-se uma alternativa mais favorável, em comparação com o transplante de condrócitos, pois MSC são células pluripotentes, que apresentam alta capacidade de proliferação rápida, além de possuírem a capacidade de produzirem citocinas, como interleucinas, que sabidamente auxiliam

no processo de regeneração discal. MSC podem se diferenciar em condrócitos e células do NP, desde que apresentem um microambiente favorável para tal diferenciação, que inclui pH favorável e fatores específicos. Foi evidenciado que MSC são capazes de sofrer diferenciação em NP, em presença de hipóxia e TGF-β. Alternativamente, o uso de culturas 3D obtidas a partir de MSC têm sido outra alternativa terapêutica, sendo que a grande vantagem da obtenção destas é a formação de culturas que exibem maior proliferação e produção de matriz extracelular, incluindo a síntese de proteoglicanos.

Os resultados mostrados no presente estudo indicam que a utilização de culturas tridimensionais obtidas de tecidos obtidos por ressecção cirúrgica de discos intervertebrais degenerados representa uma alternativa terapêutica bastante promissora para os discos intervertebrais adjacentes à cirurgia, já que, em alguns casos, estes discos podem apresentar algum grau de degeneração. Uma vantagem deste método é que as células são obtidas do próprio paciente, de tecido que seria descartado, e apresentam alto potencial de proliferação e diferenciação em condrócitos, além de alta capacidade de produção de matriz extracelular.

Finalmente, a obtenção de culturas 3D de disco intervertebral degenerado pode ser obtida num período de duas a três semanas, a partir da obtenção do tecido coletado por ressecção cirúrgica. Isso representa um período razoável para que o paciente possa ser submetido a um novo procedimento para inoculação de tais células nos discos adjacentes a prótese, sugerindo uma alternativa favorável de tratamento para pacientes acometidos por degeneração discal.

REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ADAMS, M. A.; ROUGHLEY, P. J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? **Spine,** Hagerstown, v. 31, n. 18, p. 2151-2161, Aug 2006. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16915105. Acesso em: 10 out. 2018.

ADAMS, M. A.; STEFANAKIS, M.; DOLAN, P. Healing of a painful intervertebral disc should not be confused with reversing disc degeneration: implications for physical therapies for discogenic back pain. **Clinical Biomechanics**, Bristol, v. 25, n. 10, p. 961-971, Dec 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739107. Acesso em: 19 set. 2018.

ALMEIDA, P. C. *et al.* Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminogylcans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 276, n. 2, p. 944-951, Jan 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11016923. Acesso em: 3 nov. 2018.

ALSHAMMARI, A. M.; SALMAN, M. I.; UMRAN, M. A. IN VITRO Effect of differentiation factors on accumulation of COL1A1, COL2A1 and CRTAC1 for chondrogenesis of mice bone marrow mesenchymal stem cells. **International Journal of Research Studies in Biosciences**, Sheridan, v. 3, n. 4, p. 45-56, April 2015. Disponível em:

https://pdfs.semanticscholar.org/2c15/f2c4d8881ee61e35fd9d1e2409b73cf467d0.pdf Acesso em: 2 jan. 2019.

ANDERSSON, G. B. Epidemiological features of chronic low-back pain. Lancet, London, v. 354, n. 9178, p. 581-585, Aug 1999. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10470716. Acesso em: 3 mar. 2019.

ANTONIOU, J. *et al.* The human lumbar endplate. Evidence of changes in biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, aging, and degeneration. **Spine**, Hagerstown, v. 21, n. 10, p. 1153-1161, May 1996. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8727189. Acesso em: 5 maio. 2019.

AO, P. *et al.* 17β-estradiol protects nucleus pulposus cells from serum deprivationinduced apoptosis and regulates expression of MMP-3 and MMP-13 through promotion of autophagy. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** New York, v. 503, n. 2, p. 791-797, 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29928874. Acesso em: 12 out. 2018.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 68 p.

ARAÚJO FARIAS, V. *et al.* TGF- $\beta$  and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews,** Oxford, v. 43, p. 25-37, Oct. 2018. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29954665. Acesso em: 4 out. 2018.

ARIGA, K. *et al.* Localization of cathepsins D, K, and L in degenerated human intervertebral discs. **Spine**, Hagerstown, v. 26, n. 24, p. 2666-2672, Dec 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11740352. Acesso em: 29 out. 2018.

AYAD, S. A.; WEISS, J. B. Biochemistry of the intervertebral disc. *In*: Jayson MIV. (ed.). **The lumbar spine and back pain**. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1992. p. 111-131.

BACHMEIER, B. E. *et al.* Analysis of tissue distribution of TNF-alpha, TNF-alphareceptors, and the activating TNF-alpha-converting enzyme suggests activation of the TNF-alpha system in the aging intervertebral disc. **Annals of the New York Academy of Sciences,** New York, v. 1096, p. 44-54, Jan 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17405915. Acesso em: 25 fev. 2019.

BAFFI, M. O. *et al.* Conditional deletion of the TGF-beta type II receptor in Col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones. **Developmental Biology,** New York, v. 276, n. 1, p. 124-142, Dec 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531369. Acesso em: 20 dez. 2018.

BARCELLOS-HOFF, M. H. *et al.* Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. **Development,** Cambridge, v. 105, n. 2, p. 223-235, Feb 1989. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2806122. Acesso em: 17 out. 2018.

BARRY, F. *et al.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. **Experimental Cell Research,** New York, v. 268, n. 2, p. 189-200, Aug 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478845. Acesso em: 5 abr. 2019.

BARTFELD, S. *et al.* In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 148, n. 1, p. 126-136.e6, Jan 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25307862. Acesso em: 16 jan. 2019.

BECKSTEIN, J. C. *et al.* Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: axial compression mechanics and glycosaminoglycan content. **Spine**, Hagerstown, v. 33, n. 6, p. E166-173, Mar 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18344845. Acesso em: 13 dez. 2018.

BERLEMANN, U.; GRIES, N. C.; MOORE, R. J. The relationship between height, shape and histological changes in early degeneration of the lower lumbar discs. **European Spine Journal**, Heidelberg, v. 7, n. 3, p. 212-217, 1998. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684954. Acesso em: 9 fev. 2019.

BINCH, A. L. A.; SHAPIRO, I. M.; RISBUD, M. V. Syndecan-4 in intervertebral disc and cartilage: Saint or synner? **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 52-54, p. 355-362, May-Jul 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26796346. Acesso em: 22 out. 2018.

BOJ, S. F. *et al.* Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. **Cell**, Cambridge, v. 160, n. 1-2, p. 324-338, Jan 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557080. Acesso em: 22 mar. 2019.

BOURGUIGNON, L. Y. *et al.* CD44 interaction with Na+-H+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 279, n. 26, p. 26991-7007, Jun 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090545. Acesso em: 14 mai. 2019.

BRUEHLMANN, S. B. *et al.* Regional variations in the cellular matrix of the annulus fibrosus of the intervertebral disc. **Journal of Anatomy**, London, v. 201, n. 2, p. 159-171, Aug 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220124. Acesso em: 17 mar. 2019.

BYVALTSEV, V. A. *et al.* [Analysis of the effectiveness of Dexmedetomidine in the treatment of degenerative diseases of the lumbar spine with minimally invasive puncture techniques in elderly patients]. **Advances in Gerontology,** Sankt-Peterburg, v. 31, n. 3, p. 408-415, 2018 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30584882. Acesso em: 13 fev. 2019.

CAPPELLO, R. *et al.* Notochordal cell produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus pulposus. **Spine,** Hagerstown, v. 31, n. 8, p. 873-882; discussion 883, Apr 2006. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622374. Acesso em: 10 out. 2018.

CASTRO-CHAVEZ, F. *et al.* Effect of lyso-phosphatidylcholine and Schnurri-3 on osteogenic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to calcifying vascular cells in 3D culture. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 1830, n. 6, p. 3828-3834, Jun 2013. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500015. Acesso em: 20 jan. 2019.

CHAN, S. C. *et al.* Region specific response of intervertebral disc cells to complex dynamic loading: an organ culture study using a dynamic torsion-compression bioreactor. **PLoS One,** San Francisco, v. 8, n. 8, p. e72489, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24013824. Acesso em: 10 dez. 2018.

CHELLADURAI, A. *et al.* Dorsal Spinal Ligamentum Flavum Thickening: A Magnetic Resonance Imaging Study. **Asian Spine Journal,** Seoul, v. 12, n. 1, p. 47-51, Feb 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29503681. Acesso em: 29 dez. 2018.

CHEN, J. *et al.* IL-6/YAP1/β-catenin signaling is involved in intervertebral disc degeneration. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 234, n. 5, p. 5964-5971, May 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30511395. Acesso em: 2 mar. 2019.

CHEN, L. *et al.* Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs): characteristics and function in the intervertebral disc. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine,** Chichester, v. 11, n. 3, p. 602-608, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26370612. Acesso em: 12 mai. 2019.

CHEN, M. H. *et al.* Dose-dependent regulation of cell proliferation and collagen degradation by estradiol on ligamentum flavum. **BMC Musculoskeletal Disorders,** London, v. 15, p. 238, Jul 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25022571. Acesso em: 5 out. 2018.

CHEN, Y. C. *et al.* Histologic findings of disc, end plate and neural elements after coblation of nucleus pulposus: an experimental nucleoplasty study. **Spine Journal**, New York, v. 3, n. 6, p. 466-470, 2003 Nov-Dec 2003. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609691. Acesso em: 21 nov. 2018.

CHENG, J. X.; XIE, X. S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine. **Science**, New York, v. 350, n. 6264, p. aaa8870, Nov 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26612955. Acesso em: 20 set. 2018.

CHOI, H.; JOHNSON, Z. I.; RISBUD, M. V. Understanding nucleus pulposus cell phenotype: a prerequisite for stem cell based therapies to treat intervertebral disc degeneration. **Current Stem Cell Research and Therapy,** Sharjah, v. 10, n. 4, p. 307-316, 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584906. Acesso em: 10 mar. 2019.

CHOU, A. I. *et al.* The effect of serial monolayer passaging on the collagen expression profile of outer and inner anulus fibrosus cells. **Spine,** Hagerstown, v. 31, n. 17, p. 1875-1881, Aug 2006. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924203. Acesso em: 2 abr. 2019.

CHOU, A. I.; REZA, A. T.; NICOLL, S. B. Distinct intervertebral disc cell populations adopt similar phenotypes in three-dimensional culture. **Tissue Engineering Part A,** New Rochelle, v. 14, n. 12, p. 2079-2087, Dec 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636941. Acesso em: 27 fev. 2019.

CHU, C. R. *et al.* Clinical optical coherence tomography of early articular cartilage degeneration in patients with degenerative meniscal tears. **Arthritis and Rheumatism,** Atlanta, v. 62, n. 5, p. 1412-1420, May 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213801. Acesso em: 10 mar. 2019.

CS-SZABO, G. *et al.* Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the anulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration. **Spine,** Hagerstown, v. 27, n. 20, p. 2212-2219, Oct 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12394896. Acesso em: 18 mar. 2019.

CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature,** London, v. 534, n. 7606, p. 267-271, 06 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27279226. Acesso em: 21 nov. 2018.

DEKKERS, J. F.; VAN DER ENT, C. K.; BEEKMAN, J. M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. **Rare Diseases,** Austin, v. 1, p. e27112, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25003014. Acesso em: 19 fev. 2019.

DROST, J. *et al.* Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. **Nature Protocols,** London, v. 11, n. 2, p. 347-358, Feb 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26797458. Acesso em: 10 out. 2018.

EHRMANN, R. L.; GEY, G. O. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. **Journal of the National Cancer Institute,** Bethesda, v. 16, n. 6, p. 1375-1403, Jun 1956. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13320119. Acesso em: 11 jan. 2019.

EISENSTEIN, S.; ROBERTS, S. The physiology of the disc and its clinical relevance. **Journal of Bone and Joint Surgery – British volume,** London, v. 85, n. 5, p. 633-636, Jul 2003. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892180. Acesso em: 14 mar. 2019.

EMBRIOLOGIA. *In:* **Blog embriologia e tecnologias de ensino**. Ubá, 2015. Disponível em: http://ensinoembriologia.blogspot.com/2015/. Acesso em: 25 ago. 2018.

EVANS, L. Espectroscopia Raman: Espectroscopia - Técnica de quase 100 anos ajuda a ciência moderna. Uberlândia: Grupo de Espectroscopia de Materiais, 2012. Disponível em: http://www.gem.infis.ufu.br/raman. Acesso em: 15 jul. 2018.

FATA, J. E. *et al.* The MAPK(ERK-1,2) pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGFalpha and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium. **Developmental Biology,** New York, v. 306, n. 1, p. 193-207, Jun 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448457. Acesso em: 22 out. 2018.

FEARING, B. V. *et al.* Mechanotransduction and cell biomechanics of the intervertebral disc. **JOR Spine**, Hoboken, v. 1, n. 3, p. 1-19, Sep 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30569032. Acesso em: 29 dez. 2018.

FORDHAM, R. P. *et al.* Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 734-744, Dec 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24139758. Acesso em: 17 mar. 2019.

FORMICA, M. *et al.* What is the preclinical evidence on platelet rich plasma and intervertebral disc degeneration? **European Spine Journal**, Heidelberg, v. 24, n. 11, p. 2377-2386, Nov 2015. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26272374 . Acesso em: 10 abr. 2019.

FORTUNIAK, J. *et al.* [Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the intervertebral disc degeneration]. **Neurologia i Neurochirurgia Polska,** Warszawa, v. 39, n. 4, p. 324-327, 2005 Jul-Aug 2005. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096938. Acesso em: 9 mar. 2019.

FREITAG, J. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy - a review. **BMC Musculoskeletal Disorders,** London, v. 17, p. 230-242, 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27229856. Acesso em: 10 nov. 2018.

FRIEDL, G. *et al.* Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. **Osteoarthritis and Cartilage,** London, v. 15, n. 11, p. 1293-1300, Nov 2007. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17977755. Acesso em: 27 mai. 2019.

FRISCH, J. *et al.* Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor-β via recombinant adeno-associated viral vectors. **Human Gene Therapy,** New York, v. 25, n. 12, p. 1050-1060, Dec 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25333854. Acesso em: 18 jan. 2019.

FUKUDA, M. *et al.* Small intestinal stem cell identity is maintained with functional Paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. **Genes and Development,** Huntington, v. 28, n. 16, p. 1752-1757, Aug 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25128495. Acesso em: 18 nov. 2018.

FURUKAWA, T. *et al.* Absence of biglycan accelerates the degenerative process in mouse intervertebral disc. **Spine**, Hagerstown, v. 34, n. 25, p. E911-917, Dec 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940720. Acesso em: 10 mar. 2019.

GREINER BIO-ONE. **3D cell culture**. Germany: Greiner Bio-One, c2018. Disponível em: https://3dcellculture.gbo.com/. Acesso em: 28 abr. 2018.

GREINER BIO-ONE. **Magnetic 3D cell culturing**: a simple and effective technology with a wide range of applications. Germany: Greiner Bio-One, 2016. Disponível em: https://www.gbo.com/fileadmin/user\_upload/F073774\_Whitepaper\_Magnetic\_3D\_Cel I\_Culturing\_EN.pdf. Acesso em: 28 abr. 2018.

GANEY, T. *et al.* Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. **Spine**, Hagerstown, v. 28, n. 23, p. 2609-2620, Dec 2003. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652478. Acesso em: 7 out. 2018.

GIBSON, G. E. *et al.* A reproducible procedure for primary culture and subsequent maintenance of multiple lines of human skin fibroblasts. **Age,** Media, v. 21, n. 1, p. 7-14, Jan 1998. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23604329. Acesso em: 1 mar. 2019.

GILCHRIST, C. L. *et al.* Extracellular matrix ligand and stiffness modulate immature nucleus pulposus cell-cell interactions. **PLoS One,** San Francisco, v. 6, n. 11, p. e27170, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087260. Acesso em: 21 nov. 2018.

GJOREVSKI, N. *et al.* Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. **Nature,** London, v. 539, n. 7630, p. 560-564, 11 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27851739. Acesso em: 20 dez. 2018.

GONZÁLEZ MARTÍNEZ, E. *et al.* [Biology and mechanobiology of the intervertebral disc]. **Neurocirugía,** Asturias, v. 28, n. 3, p. 135-140, 2017 May - Jun 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28130014. Acesso em: 9 mai. 2019.

GORTH, D. J.; SHAPIRO, I. M.; RISBUD, M. V. A new understanding of the role of IL-1 in age-related intervertebral disc degeneration in a murine model. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, Mar 2019. doi: 10.1002/jbmr.3714. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30875127. Acesso em: 17 abr. 2019.

GOUPILLE, P.; MULLEMAN, D.; CHEVALIER, X. Is interleukin-1 a good target for therapeutic intervention in intervertebral disc degeneration: lessons from the osteoarthritic experience. **Arthritis Research & Therapy,** London, v. 9, n. 6, p. 110, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086327. Acesso em: 12 mar. 2019.

GRUBER, H. E. *et al.* Autophagy in the Degenerating Human Intervertebral Disc: In Vivo Molecular and Morphological Evidence, and Induction of Autophagy in Cultured Annulus Cells Exposed to Proinflammatory Cytokines-Implications for Disc Degeneration. **Spine,** Hagerstown, v. 40, n. 11, p. 773-782, Jun 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091153. Acesso em: 14 fev. 2019.

GRUBER, H. E. *et al.* Constitutive expression of cathepsin K in the human intervertebral disc: new insight into disc extracellular matrix remodeling via cathepsin K and receptor activator of nuclear factor-κB ligand. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 13, n. 4, p. R140, Aug 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880134. Acesso em: 8 mar. 2019.

GRUBER, H. E.; HANLEY, E. N. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation. **BMC Musculoskeletal Disorders,** London, v. 1, p. 1, Oct 2000. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11231882. Acesso em: 16 jan. 2019.

GRUBER, H. E.; STASKY, A. A.; HANLEY, E. N. Characterization and phenotypic stability of human disc cells in vitro. **Matrix Biology,** Stuttgart, v. 16, n. 5, p. 285-288, Nov 1997. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501328. Acesso em: 10 out. 2018.

GUIBERT, C. *et al.* Effect of short-term organoid culture on the pharmacomechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries. **British Journal of Pharmacology,** London, v. 146, n. 5, p. 692-701, Nov 2005. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151441. Acesso em: 2 mar. 2019.

GUO, W. *et al.* Gene expression profile identifies potential biomarkers for human intervertebral disc degeneration. **Molecular Medicine Reports,** Athens, v. 16, n. 6, p. 8665-8672, Dec 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29039500. Acesso em: 5 fev. 2019.

GUTIERREZ-ARANDA, I. *et al.* Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. **Stem Cells,** Dayton, v. 28, n. 9, p. 1568-70, Sep 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20641038. Acesso em: 19 abr. 2019.

HADJIPAVLOU, A. G. *et al.* The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. **Journal of Bone and Joint Surgery – British volume,** London, v. 90, n. 10, p. 1261-1270, Oct 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827232. Acesso em: 12 jan. 2019.

HARRISON, R. G. *et al.* Observations of the living developing nerve fiber. **The Anatomical Record**, Salt Lake City, p. 116-128, June 1907. Disponível em: https://zenodo.org/record/1844310#.XTzaiOhKjIU. Acesso em: 27 fev. 2019. HEE, H. T. *et al.* Vascularization and morphological changes of the endplate after axial compression and distraction of the intervertebral disc. **Spine**, Hagerstown, v. 36, n. 7, p. 505-511, Apr 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975621. Acesso em: 2 abr. 2019.

HEEGAARD, A. M. *et al.* Transforming growth factor beta stimulation of biglycan gene expression is potentially mediated by sp1 binding factors. **Journal of Cellular Biochemistry,** New York, v. 93, n. 3, p. 463-475, Oct 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372625. Acesso em: 18 set. 2018.

HORNER, H. A. *et al.* Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype. **Spine**, Hagerstown, v. 27, n. 10, p. 1018-1028, May 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12004167. Acesso em: 22 jan. 2019.

HU, Y. *et al.* Neuroprotective effects of curcumin alleviate lumbar intervertebral disc degeneration through regulating the expression of iNOS, COX-2, TGF- $\beta$ 1/2, MMP-9 and BDNF in a rat model. **Molecular Medicine Reports,** Athens, v. 16, n. 5, p. 6864-6869, Nov 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28901458. Acesso em: 11 nov. 2018.

HUCH, M. *et al.* Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. **Cell**, Cambridge, v. 160, n. 1-2, p. 299-312, Jan 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533785. Acesso em: 23 dez. 2018.

HUMZAH, M. D.; SOAMES, R. W. Human intervertebral disc: structure and function. **Anatomical Record,** New York, v. 220, n. 4, p. 337-356, Apr 1988. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3289416. Acesso em: 1 set. 2018.

HWANG, P. Y. *et al.* The role of extracellular matrix elasticity and composition in regulating the nucleus pulposus cell phenotype in the intervertebral disc: a narrative review. **Journal of Biomechanical Engineering,** New York, v. 136, n. 2, p. 021010, Feb 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390195. Acesso em: 19 mar. 2019.

INKINEN, R. I. *et al.* Relative increase of biglycan and decorin and altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc. **Journal of Rheumatology,** Toronto, v. 25, n. 3, p. 506-514, Mar 1998. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9517772. Acesso em: 21 fev. 2019.

INOUE, N.; ESPINOZA ORÍAS, A. A. Biomechanics of intervertebral disk degeneration. **Orthopedic Clinics of North America,** Philadelphia, v. 42, n. 4, p. 487-499, vii, Oct 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944586. Acesso em: 18 abr. 2019.

IOZZO, R. V. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 274, n. 27, p. 18843-18846, Jul 1999. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383378. Acesso em: 3 mar. 2019.

JAGANATHAN, H. *et al.* Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. **Scientific Reports,** London, v. 4, p. 6468, Oct 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25270048. Acesso em: 2 dez. 2018.

JIA, Z. *et al.* Comparison of biological characteristics of nucleus pulposus mesenchymal stem cells derived from non-degenerative and degenerative human nucleus pulposus. **Experimental and Therapeutic Medicine,** Athens, v. 13, n. 6, p. 3574-3580, Jun 2017. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28588682. Acesso em: 5 abr. 2019.

JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P. W. Hyaluronan in tissue injury and repair. **Annual Review of Cell and Developmental Biology,** Palo Alto, v. 23, p. 435-461, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506690. Acesso em: 28 out. 2018.

\_\_\_\_\_. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. **Physiological Reviews,** Washington, v. 91, n. 1, p. 221-264, Jan 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248167. Acesso em: 19 set. 2018.

JING, R. *et al.* Evaluation of Common Variants in Matrix Metalloproteinase-9 Gene with Lumbar Disc Herniation in Han Chinese Population. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers,** New Rochelle, v. 22, n. 10, p. 622-629, Oct 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30289281. Acesso em: 7 jan. 2019.

KAMITA, M. *et al.* Proteomic analysis of ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. **Proteomics,** Weinheim, v. 15, n. 9, p. 1622-1630, May 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25641790. Acesso em: 12 fev. 2019.

KANDEL, R.; ROBERTS, S.; URBAN, J. P. Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges. **European Spine Journal**, Heidelberg, v. 17 Suppl 4, p. 480-491, Dec 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19005701. Acesso em: 1 mar. 2019.

KAWAGUCHI, Y. *et al.* Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. **Spine**, Hagerstown, v. 24, n. 23, p. 2456-2460, Dec 1999. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626307.

KELEMPISIOTI, A. *et al.* Genetic susceptibility of intervertebral disc degeneration among young Finnish adults. **BMC Medical Genetics**, London, v. 12, p. 153, Nov 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22107760. Acesso em: 5 jan. 2019.

KELSEY, J. L.; WHITE, A. A. Epidemiology and impact of low-back pain. **Spine**, Hagerstown, v. 5, n. 2, p. 133-142, 1980 Mar-Apr 1980. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6446158. Acesso em: 9 fev. 2019.

KHAN, A. N. *et al.* Inflammatory biomarkers of low back pain and disc degeneration: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1410, n. 1, p. 68-84, 12 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29265416. Acesso em: 18 fev. 2019.

KIM, D. H. *et al.* Phenotypic stability, matrix elaboration and functional maturation of nucleus pulposus cells encapsulated in photocrosslinkable hyaluronic acid hydrogels. **Acta Biomaterialia,** Kidlington, v. 12, p. 21-29, Jan 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25448344. Acesso em: 22 mar. 2019.

KIM, J. H. *et al.* Sphere formation of adipose stem cell engineered by poly-2hydroxyethyl methacrylate induces in vitro angiogenesis through fibroblast growth factor 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** New York, v. 468, n. 1-2, p. 372-379, 2015 Dec 4-11 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26498525. Acesso em: 16 abr. 2019.

KJAER, P. *et al.* Prevalence and tracking of back pain from childhood to adolescence. **BMC Musculoskeletal Disorders,** London, v. 12, p. 98, May 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21575251. Acesso em: 27 mar. 2019.

KLYNE, D. M. *et al.* Are signs of central sensitisation in acute low back pain a precursor to poor outcome? **Journal of Pain**, Philadelphia, Mar 2019. pii: S1526-5900(18)30470-X. doi: 10.1016/j.jpain.2019.03.001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30853506. Acesso em: 10 set. 2018.

KOBIELARZ, M. *et al.* Qualitative and quantitative assessment of collagen and elastin in annulus fibrosus of the physiologic and scoliotic intervertebral discs. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials,** Amsterdam, v. 62, p. 45-56, 09 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27177214. Acesso em: 7 fev. 2019.

KONG, K. *et al.* Raman spectroscopy for medical diagnostics--From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. **Advanced Drug Delivery Reviews,** Amsterdam, v. 89, p. 121-134, Jul 2015. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25809988. Acesso em: 29 mar. 2019.

KONTTINEN, Y. T. *et al.* Cathepsin G in degenerating and healthy discal tissue. **Clinical and Experimental Rheumatology,** Pisa, v. 17, n. 2, p. 197-204, 1999 Mar-Apr 1999. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10342046. Acesso em: 12 abr. 2019.

KRAYCHETE, D. C. *et al.* Serum cytokine levels in patients with chronic low back pain due to herniated disc: analytical cross-sectional study. **São Paulo Medical Journal,** São Paulo, v. 128, n. 5, p. 259-262, 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21181064. Acesso em: 8 jan. 2019.

KWON, W. K. *et al.* The Role of Hypoxia in Angiogenesis and Extracellular Matrix Regulation of Intervertebral Disc Cells During Inflammatory Reactions. **Neurosurgery,** Baltimore, v. 81, n. 5, p. 867-875, Nov 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475716. Acesso em: 17 dez. 2018.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. **Science**, New York, v. 345, n. 6194, p. 1247125, Jul 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035496. Acesso em: 29 mar. 2019.

LANCASTER, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature,** London, v. 501, n. 7467, p. 373-379, Sep 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995685. Acesso em: 21 nov. 2018.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. **Trends in Biotechnology,** Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 133-144, 02 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27634310. Acesso em: 19 out. 2018.

LE MAITRE, C. L.; HOYLAND, J. A.; FREEMONT, A. J. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1beta and TNFalpha expression profile. **Arthritis Research & Therapy,** London, v. 9, n. 4, p. R77, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17688691. Acesso em: 24 mar. 2019.

LECKIE, A. E. *et al.* Evaluation of thiol-modified hyaluronan and elastin-like polypeptide composite augmentation in early-stage disc degeneration: comparing 2 minimally invasive techniques. **Spine**, Hagerstown, v. 37, n. 20, p. E1296-1303, Sep 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772576. Acesso em: 3 fev. 2019.

LEE, H. L. *et al.* Transforming Growth Factor-β-Induced KDM4B Promotes Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 34, n. 3, p. 711-719, Mar 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26485430. Acesso em: 10 out. 2018. LEO, B. M. *et al.* In vivo bioluminescent imaging of virus-mediated gene transfer and transduced cell transplantation in the intervertebral disc. **Spine,** Hagerstown, v. 29, n. 8, p. 838-844, Apr 2004. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15082981. Acesso em: 2 nov. 2018.

LI, J. P.; VLODAVSKY, I. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 102, n. 5, p. 823-828, Nov 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888515. Acesso em: 8 jan. 2019.

LI, X. *et al.* Cathepsin B Regulates Collagen Expression by Fibroblasts via Prolonging TLR2/NF-κB Activation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity,** Austin, v. 2016, p. 7894247, 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648120. Acesso em: 27 abr. 2019.

LI, X. C. *et al.* Co-culturing nucleus pulposus mesenchymal stem cells with notochordal cell-rich nucleus pulposus explants attenuates tumor necrosis factor-α-induced senescence. **Stem Cell Research & Therapy,** London, v. 9, n. 1, p. 171, 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29941029. Acesso em: 7 mar. 2019.

LINDBORG, B. A. *et al.* Rapid Induction of Cerebral Organoids From Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Chemically Defined Hydrogel and Defined Cell Culture Medium. **Stem Cells Translational Medicine,** Durham, v. 5, n. 7, p. 970-979, Jul 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27177577. Acesso em: 5 fev. 2019.

LIU, Y. *et al.* The effect of intervertebral disc degenerative change on biological characteristics of nucleus pulposus mesenchymal stem cell: an. **Connective Tissue Research,** New York, v. 60, n. 4, p. 376-388, Jul 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31119993. Acesso em: 12 fev. 2019.

LOPA, S. *et al.* Fabrication of multi-well chips for spheroid cultures and implantable constructs through rapid prototyping techniques. **Biotechnology and Bioengineering,** New York, v. 112, n. 7, p. 1457-1471, Jul 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678107. Acesso em: 10 nov. 2018.

LV, F. J. *et al.* Matrix metalloproteinase 12 is an indicator of intervertebral disc degeneration co-expressed with fibrotic markers. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 24, n. 10, p. 1826-1836, 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27211863. Acesso em: 11 set. 2018.

MALTER, A. D. *et al.* Cost-effectiveness of lumbar discectomy for the treatment of herniated intervertebral disc. **Spine**, Hagerstown, v. 21, n. 9, p. 1048-1054; discussion 1055, May 1996. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8724089. Acesso em: 9 ago. 2018.

MARCHAND, F.; AHMED, A. M. Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus. **Spine,** Hagerstown, v. 15, n. 5, p. 402-410, May 1990. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2363068. Acesso em: 10 mar. 2019.

MARTEL-PELLETIER, J.; CLOUTIER, J. M.; PELLETIER, J. P. Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research,** New York, v. 8, n. 3, p. 336-344, May 1990. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2324852. Acesso em: 29 out. 2018.

MATOS, M. G. *et al.* [Lower back pain in health insurance policyholders: prevalence and associated factors]. **Cadernos de Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 24, n. 9, p. 2115-2122, Sep 2008. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813687. Acesso em: 18 jan. 2019.

MCCRACKEN, K. W. *et al.* Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. **Nature,** London, v. 516, n. 7531, p. 400-404, Dec 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25363776. Acesso em: 25 mar. 2019.

MCGONAGLE, D.; BABOOLAL, T. G.; JONES, E. Native joint-resident mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. **Nature Reviews – Rheumatology,** New York, v. 13, n. 12, p. 719-730, Dec 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118440. Acesso em: 18 jan. 2019.

MEISEL, H. J. *et al.* Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. **Biomolecular Engineering,** Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 5-21, Feb 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963315. Acesso em: 13 out. 2018.

MELROSE, J.; GHOSH, P.; TAYLOR, T. K. A comparative analysis of the differential spatial and temporal distributions of the large (aggrecan, versican) and small (decorin, biglycan, fibromodulin) proteoglycans of the intervertebral disc. **Journal of Anatomy,** London, v. 198, n. Pt 1, p. 3-15, Jan 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11215765. Acesso em: 2 abr. 2019.

MICHALOPOULOS, G.; PITOT, H. C. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. **Experimental Cell Research,** New York, v. 94, n. 1, p. 70-78, Aug 1975. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/243. Acesso em: 6 set. 2018.

MOLINOS, M. *et al.* Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration. **Journal of the Royal Society – Interface,** London, v. 12, n. 108, p. 20150429, Jul 2015. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26040602. Acesso em: 10 mar. 2019.

MOON, H. J. *et al.* Annulus fibrosus cells interact with neuron-like cells to modulate production of growth factors and cytokines in symptomatic disc degeneration. **Spine**, Hagerstown, v. 37, n. 1, p. 2-9, Jan 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21386768. Acesso em: 14 abr. 2019.

MOTAGHINASAB, S. *et al.* Disc size markedly influences concentration profiles of intravenously administered solutes in the intervertebral disc: a computational study on glucosamine as a model solute. **European Spine Journal**, Heidelberg, v. 23, n. 4, p. 715-723, Apr 2014. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375329. Acesso em: 17 fev. 2019.

NETTER. Atlas of human anatomy. 4ª edição. Filadélfia: Saunders Elsevier, 2006.

O'HALLORAN, D. M.; PANDIT, A. S. Tissue-engineering approach to regenerating the intervertebral disc. **Tissue Engineering**, New York, v. 13, n. 8, p. 1927-1954, Aug 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518718. Acesso em: 27 out. 2018.

OEHME, D. *et al.* Cell-Based Therapies Used to Treat Lumbar Degenerative Disc Disease: A Systematic Review of Animal Studies and Human Clinical Trials. **Stem Cells International,** London, v. 2015, p. 946031, 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26074979. Acesso em: 29 jan. 2019.

OLIVEIRA, C. B. *et al.* Association between clinical tests related to motor control dysfunction and changes in pain and disability after lumbar stabilization exercises in patients with chronic low back pain. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Philadelphia, v. 100, n. 7, p. 1226-1233, Feb 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30822389. Acesso em: 10 nov. 2018.

OLIVEIRA, C. P. *et al.* Extracellular matrix remodeling in experimental intervertebral disc degeneration. **Acta Ortopédica Brasileira,** São Paulo, v. 21, n. 3, p. 144-149, May 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453658. Acesso em: 7 nov. 2018.

OMLOR, G. W. *et al.* Injection of a polymerized hyaluronic acid/collagen hydrogel matrix in an in vivo porcine disc degeneration model. **European Spine Journal**, Heidelberg, v. 21, n. 9, p. 1700-1708, Sep 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531895. Acesso em: 1 fev. 2019.

ORKIN, R. W. *et al.* A murine tumor producing a matrix of basement membrane. **Journal of Experimental Medicine,** New York, v. 145, n. 1, p. 204-220, Jan 1977. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/830788. Acesso em: 21 mar. 2019.

OTA, H.; KODAMA, T.; MIKI, N. Rapid formation of size-controlled three dimensional hetero-cell aggregates using micro-rotation flow for spheroid study. **Biomicrofluidics,** New York, v. 5, n. 3, p. 34105-34115, Sep 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22662035. Acesso em: 19 nov. 2018.

OZAWA, T. *et al.* The degenerated lumbar intervertebral disc is innervated primarily by peptide-containing sensory nerve fibers in humans. **Spine,** Hagerstown, v. 31, n. 21, p. 2418-2422, Oct 2006. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023849. Acesso em: 3 abr. 2019.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews – Molecular Cell Biology,** London, v. 8, n. 10, p. 839-845, Oct 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684528. Acesso em: 7 ago. 2018.

PARISIEN, M. *et al.* Genetic pathway analysis reveals a major role for extracellular matrix organization in inflammatory and neuropathic pain. **Pain,** Amsterdam, v. 160, n. 4, p. 932-944, Apr 2019. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30763288. Acesso em: 18 fev. 2019.

PARK, J. B.; CHANG, H.; KIM, K. W. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue. **Spine,** Hagerstown, v. 26, n. 6, p. 618-621, Mar 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11246372. Acesso em: 1 abr. 2019.

PATEL, K. P. *et al.* Aggrecanases and aggrecanase-generated fragments in the human intervertebral disc at early and advanced stages of disc degeneration. **Spine**, Hagerstown, v. 32, n. 23, p. 2596-2603, Nov 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17978660. Acesso em: 7 jan. 2019.

PATTAPPA, G. *et al.* Cells under pressure - the relationship between hydrostatic pressure and mesenchymal stem cell chondrogenesis. **European Cells & Materials**, Glasgow, v. 37, p. 360-381, May 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31056740. Acesso em: 5 abr. 2019.

PELEGATI, V. B. **Microscopias ópticas de processos coerentes**. 2010. Universidade de Campinas, Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/277504. Acesso em: 12 jan. 2018.

PEREIRA, C. L. *et al.* The effect of hyaluronan-based delivery of stromal cell-derived factor-1 on the recruitment of MSCs in degenerating intervertebral discs. **Biomaterials,** Guildford, v. 35, n. 28, p. 8144-8153, Sep 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24969636. Acesso em: 13 dez. 2018.

PEREIRA, D. R. *et al.* Hydrogels in acellular and cellular strategies for intervertebral disc regeneration. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine,** Chichester, v. 7, n. 2, p. 85-98, Feb 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072398. Acesso em: 17 nov. 2018.

PERERA, R. S. *et al.* Single Nucleotide Variants of Candidate Genes in Aggrecan Metabolic Pathway Are Associated with Lumbar Disc Degeneration and Modic Changes. **PLoS One,** San Francisco, v. 12, n. 1, p. e0169835, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28081267. Acesso em: 19 out. 2018.

PETERSEN, O. W. *et al.* Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington DC, v. 89, n. 19, p. 9064-9068, Oct 1992. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384042. Acesso em: 3 set. 2018.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 5-19, Jan 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27793571. Acesso em: 10 mar. 2019.

PODICHETTY, V. K. The aging spine: the role of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration. **Cellular and Molecular Biology,** Noisy-Le-Grand, v. 53, n. 5, p. 4-18, May 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17543240. Acesso em: 15 fev. 2019.

PONNAPPAN, R. K. *et al.* An organ culture system to model early degenerative changes of the intervertebral disc. **Arthritis Research & Therapy,** London, v. 13, n. 5, p. R171, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018279. Acesso em: 11 nov. 2018.

POTMA, E.; XIE, S. CARS microscopy for biology and medicine. **Optics and Photonics News,** Washington DC, v. 15, n. 11, p. 40-45, 2004. Disponível em: https://www.osapublishing.org/opn/abstract.cfm?uri=opn-15-11-40. Acesso em: 2 mar. 2019.

PŁUSA, T.; BARANOWSKA, A.; BARANOWSKI, P. [Stem cells in contemporary medicine]. **Polski Merkuriusz Lekarski**, Warszawa, v. 46, n. 271, p. 5-8, Jan 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30810107. Acesso em: 30 dez. 2018.

QIAN, X. *et al.* Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. **Cell**, Cambridge, v. 165, n. 5, p. 1238-1254, May 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27118425. Acesso em: 28 fev. 2019.

RAMAN, C. A new radiation. **Indian Journal of Physics,** Calcutá, v. 2, p. 387-398, 1928. Disponível em:

https://www.thevespiary.org/library/Files\_Uploaded\_by\_Users/no1uno/pdf/Instrument ation/Raman/Sir.CV.RAMAN/Raman.A.New.Radiation.pdf. Acesso em: 9 mar. 2019.

RODRIGUES, L. M.; OLIVEIRA, L. Z.; PINHAL, M. A. Expression of heparanase isoforms in intervertebral discs classified according to Pfirrmann grading system for disc degeneration. **Spine**, Hagerstown, v. 38, n. 13, p. 1112-1118, Jun 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23370684. Acesso em: 5 jan. 2019.

RODRIGUES, L. M. *et al.* Heparanase isoform expression and extracellular matrix remodeling in intervertebral disc degenerative disease. **Clinics**, São Paulo, v. 66, n. 5, p. 903-909, 2011. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789398. Acesso em: 12 fev. 2019.

RODRIGUES-PINTO, R.; RICHARDSON, S. M.; HOYLAND, J. A. Identification of novel nucleus pulposus markers: Interspecies variations and implications for cellbased therapiesfor intervertebral disc degeneration. **Bone & Joint Research**, London, v. 2, n. 8, p. 169-178, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23958792. Acesso em: 17 mar. 2019.

RODRIGUES-PINTO, R. *et al.* Human notochordal cell transcriptome unveils potential regulators of cell function in the developing intervertebral disc. **Scientific Reports,** London, v. 8, n. 1, p. 12866, Aug 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30150762. Acesso em: 27 jan. 2019.

ROSENZWEIG, D. H. *et al.* Thermoreversible hyaluronan-hydrogel and autologous nucleus pulposus cell delivery regenerates human intervertebral discs in an ex vivo, physiological organ culture model. **European Cells & Materials,** Glasgow, v. 36, p. 200-217, 10 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30370912. Acesso em: 15 mar. 2019.

ROSSI, G.; MANFRIN, A.; LUTOLF, M. P. Progress and potential in organoid research. **Nature Reviews – Genetics,** London, v. 19, n. 11, p. 671-687, Nov 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30228295. Acesso em: 3 nov. 2018.

ROUGHLEY, P. J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. **Spine**, Hagerstown, v. 29, n. 23, p. 2691-2699, Dec 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564918. Acesso em: 1 out. 2018.

ROUGHLEY, P. J.; ALINI, M.; ANTONIOU, J. The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. **Biochemical Society Transactions,** London, v. 30, n. Pt 6, p. 869-874, Nov 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12440935. Acesso em: 20 nov. 2018.

SADLER. Langman fundamentos de embriologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

SAKAGUCHI, H. *et al.* Generation of functional hippocampal neurons from selforganizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. **Nature Communications,** London, v. 6, p. 8896, Nov 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26573335. Acesso em: 6 mar. 2019.

SATO, N. *et al.* Role of Epiligament in Ligamentum Flavum Hypertrophy in Patients with Lumbar Spinal Canal Stenosis:a Pilot Study. **Journal of Medical Investigation,** Tokushima, v. 65, n. 1.2, p. 85-89, 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29593200. Acesso em: 16 mar. 2019.

SEYFRIED, N. T. *et al.* Expression and purification of functionally active hyaluronanbinding domains from human cartilage link protein, aggrecan and versican: formation of ternary complexes with defined hyaluronan oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 280, n. 7, p. 5435-5448, Feb 2005. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590670. Acesso em: 10 jan. 2019.

SHAMIR, E. R.; EWALD, A. J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. **Nature Reviews – Molecular Cell Biology,** London, v. 15, n. 10, p. 647-664, Oct 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25237826. Acesso em: 21 jan. 2019.

SHAMJI, M. F. *et al.* Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues. **Arthritis and Rheumatism,** Atlanta, v. 62, n. 7, p. 1974-1982, Jul 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20222111. Acesso em: 12 abr. 2019.

SHEN, B. *et al.* BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. **Tissue Engineering Part A**, New Rochelle, v. 15, n. 6, p. 1311-1320, Jun 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950289. Acesso em: 25 fev. 2018.

SHER, I. *et al.* Novel Application of the Pfirrmann Disc Degeneration Grading System to 9.4T MRI: Higher Reliability Compared to 3T MRI. **Spine**, Hagerstown, v. 44, n. 13, p. E766-E773, Jul 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31205169. Acesso em: 28 nov. 2018.

SHU, C. *et al.* Comparative immunolocalisation of perlecan, heparan sulphate, fibroblast growth factor-18, and fibroblast growth factor receptor-3 and their prospective roles in chondrogenic and osteogenic development of the human foetal spine. **European Spine Journal,** Heidelberg, v. 22, n. 8, p. 1774-1784, Aug 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397188. Acesso em: 19 mar. 2019.

SILAGI, E. S.; SHAPIRO, I. M.; RISBUD, M. V. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: Dysregulation and the pathogenesis of disc degeneration. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 71-72, p. 368-379, 10 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29501510. Acesso em: 26 abr. 2019.
SILVA, M. C.; FASSA, A. G.; VALLE, N. C. [Chronic low back pain in a Southern Brazilian adult population: prevalence and associated factors]. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 377-385, 2004 Mar-Apr 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073617. Acesso em: 2 set. 2018.

SIMIAN, M. *et al.* The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. **Development,** Cambridge, v. 128, n. 16, p. 3117-3131, Aug 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688561. Acesso em: 18 jan. 2019.

SMEKAL, A. Zur Quantentheorie der Dispersion. **Naturwissenschaften**, v. 11, n. 43, p. 873-875, 1923. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/BF01576902. Acesso em: 11 out. 2018.

SMITH, L. J. *et al.* Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. **Disease Models & Mechanisms,** Cambridge, v. 4, n. 1, p. 31-41, Jan 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123625. Acesso em: 23 jan. 2019.

SOARES DA COSTA, D.; REIS, R. L.; PASHKULEVA, I. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. **Annual Review of Biomedical Engineering,** Palo Alto, v. 19, p. 1-26, 06 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28226217. Acesso em: 2 mar. 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEUROCIRURGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Hérnia de disco cervical no adulto: tratamento cirúrgico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 6, p. 639-643, 2012.

SOUZA, G. R. *et al.* Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology,** London, v. 5, n. 4, p. 291-296, Apr 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228788. Acesso em: 15 mar. 2019.

SOUZA, G. R. *et al.* Magnetically Bioprinted Human Myometrial 3D Cell Rings as A Model for Uterine Contractility. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 4, pii: E683, Mar 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28333087. Acesso em: 5 nov. 2018.

STERGAR, J. *et al.* Intervertebral disc tissue engineering: A brief review. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences,** Sarajevo, v. 19, n. 2, p. 130-137, May 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30726701. Acesso em: 16 mar. 2019.

STEVENS, J. W. *et al.* CD44 expression in the developing and growing rat intervertebral disc. **Developmental Dynamics**, New York, v. 219, n. 3, p. 381-390, Nov 2000. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11066094. Acesso em: 18 jan. 2019.

STUDER, R. K. *et al.* Human nucleus pulposus cells react to IL-6: independent actions and amplification of response to IL-1 and TNF-α. **Spine**, Hagerstown, v. 36, n. 8, p. 593-599, Apr 2011. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178846. Acesso em: 11 jan. 2019.

SZTROLOVICS, R. *et al.* The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 20, n. 2, p. 257-266, Mar 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11918305. Acesso em: 2 out. 2018.

TAKADA, T. *et al.* Fas ligand exists on intervertebral disc cells: a potential molecular mechanism for immune privilege of the disc. **Spine,** Hagerstown, v. 27, n. 14, p. 1526-1530, Jul 2002. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12131712. Acesso em: 17 mar. 2019.

TAKASATO, M. *et al.* Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. **Nature Cell Biology,** London, v. 16, n. 1, p. 118-126, Jan 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335651. Acesso em: 27 abr. 2019.

TAKASATO, M. *et al.* Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. **Nature,** London, v. 536, n. 7615, p. 238, 08 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27120161. Acesso em: 27 fev. 2019.

TALUKDAR, S. *et al.* Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model. **Biomaterials,** Guildford, v. 32, n. 8, p. 2149-2159, Mar 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167597. Acesso em: 23 nov. 2018.

TANEJA, S. S. Re: Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. **Journal of Urology**, Baltimore, v. 193, n. 4, p. 1442-1443, Apr 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890569. Acesso em: 19 jan. 2019.

TAO, L. *et al.* Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for C. difficile toxin B. **Nature,** London, v. 538, n. 7625, p. 350-355, Oct 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27680706. Acesso em: 5 set. 2018.

TAO, Y. *et al.* Proportion of collagen type II in the extracellular matrix promotes the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into nucleus pulposus cells. **BioFactors,** Oxford, v. 42, n. 2, p. 212-223, 2016 Mar-Apr 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26879681. Acesso em: 7 fev. 2019.

TERTTI, M. *et al.* Disc degeneration in magnetic resonance imaging. A comparative biochemical, histologic, and radiologic study in cadaver spines. **Spine**, Hagerstown, v. 16, n. 6, p. 629-634, Jun 1991. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1862401. Acesso em: 23 jan. 2019.

TIAN, Y. *et al.* Inflammatory cytokines associated with degenerative disc disease control aggrecanase-1 (ADAMTS-4) expression in nucleus pulposus cells through MAPK and NF-κB. **American Journal of Pathology,** Philadelphia, v. 182, n. 6, p. 2310-2321, Jun 2013. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602832. Acesso em: 8 out. 2018.

TIMM, D. M. *et al.* A high-throughput three-dimensional cell migration assay for toxicity screening with mobile device-based macroscopic image analysis. **Scientific Reports,** London, v. 3, p. 3000, Oct 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141454. Acesso em: 23 mar. 2019.

TONG, F. *et al.* An epidemiological study of the prevalence rate of inflammatory back pain and axial spondyloarthritis in a university in the south of China. **Clinical Rheumatology,** Brussels, v. 37, n. 11, p. 3087-3091, Nov 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29974281. Acesso em: 17 dez. 2018.

TSARYK, R. *et al.* Collagen-low molecular weight hyaluronic acid semiinterpenetrating network loaded with gelatin microspheres for cell and growth factor delivery for nucleus pulposus regeneration. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 20, p. 10-21, Jul 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861947. Acesso em: 5 out. 2018.

TSENG, H. *et al.* A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 10, n. 1, p. 173-182, Jan 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036238. Acesso em: 2 mar. 2019.

TSENG, H. *et al.* Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue Engineering – Part C – Methods**, New Rochelle, v. 19, n. 9, p. 665-675, Sep 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301612. Acesso em: 24 abr. 2019.

TSENG, H. *et al.* A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and realtime mobile device-based imaging. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 13987, Sep 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26365200. Acesso em: 18 set. 2018.

UDALL, M. *et al.* Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. **Journal of Pain Research,** Auckland, v. 12, p. 243-253, 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30662280. Acesso em: 11 mar. 2019.

URBAN, J. P.; ROBERTS, S. Degeneration of the intervertebral disc. **Arthritis Research & Therapy,** London, v. 5, n. 3, p. 120-130, 2003. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12723977. Acesso em: 3 mar. 2019.

URBAN, J. P.; SMITH, S.; FAIRBANK, J. C. Nutrition of the intervertebral disc. **Spine,** Hagerstown, v. 29, n. 23, p. 2700-9, Dec 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564919. Acesso em: 19 fev. 2019.

VADAPALLI, R. *et al.* Quantitative Predictive Imaging Biomarkers of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. **Asian Spine Journal**, Seoul, Apr 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30966725. Acesso em: 7 nov. 2018.

VLODAVSKY, I. *et al.* Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. **Seminars in Cancer Biology,** Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 121-129, Apr 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12027584. Acesso em: 19 mar. 2019.

VLODAVSKY, I. *et al.* Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. **Cancer Metastasis Reviews,** Boston, v. 9, n. 3, p. 203-226, Nov 1990. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705486. Acesso em: 27 dez. 2018.

WALTER, B. A. *et al.* Development and validation of a bioreactor system for dynamic loading and mechanical characterization of whole human intervertebral discs in organ culture. **Journal of Biomechanical Engineering,** New York, v. 47, n. 9, p. 2095-2101, Jun 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24725441. Acesso em: 4 mar. 2019.

WANG, J. Y. *et al.* Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture. **Spine**, Hagerstown, v. 26, n. 16, p. 1747-1751; discussion 1752, Aug 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11493844. Acesso em: 6 dez. 2018.

WANG, X. *et al.* Cloning and variation of ground state intestinal stem cells. **Nature,** London, v. 522, n. 7555, p. 173-178, Jun 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26040716. Acesso em: 31 out. 2018.

WANG, Y. *et al.* Bioinformatics analysis reveals different gene expression patterns in the annulus fibrosis and nucleus pulpous during intervertebral disc degeneration. **Experimental and Therapeutic Medicine,** Athens, v. 16, n. 6, p. 5031-5040, Dec 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30542457. Acesso em: 21 abr. 2019.

WEBER, K. T. *et al.* Serum levels of the proinflammatory cytokine interleukin-6 vary based on diagnoses in individuals with lumbar intervertebral disc diseases. **Arthritis Research & Therapy,** London, v. 18, p. 3, Jan 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26743937. Acesso em: 11 mar. 2019.

WEI, A. *et al.* Mesenchymal stem cells: potential application in intervertebral disc regeneration. **Translational Pediatrics,** Hong Kong, v. 3, n. 2, p. 71-90, Apr 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26835326. Acesso em: 18 nov. 2018.

WEILER, C. *et al.* Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls. **Spine,** Hagerstown, v. 30, n. 1, p. 44-53; discussion 54, Jan 2005. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626980. Acesso em: 7 mar. 2019.

WEILER, C. *et al.* Immunohistochemical identification of notochordal markers in cells in the aging human lumbar intervertebral disc. **European Spine Journal**, Heidelberg, v. 19, n. 10, p. 1761-1770, Oct 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372940. Acesso em: 25 abr. 2019.

WOGNUM, S.; HUYGHE, J. M.; BAAIJENS, F. P. Influence of osmotic pressure changes on the opening of existing cracks in 2 intervertebral disc models. **Spine**, Hagerstown, v. 31, n. 16, p. 1783-1788, Jul 2006. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845351. Acesso em: 24 mar. 2019.

WONG, J. *et al.* Nutrient supply and nucleus pulposus cell function: effects of the transport properties of the cartilage endplate and potential implications for intradiscal biologic therapy. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 27, n. 6, p. 956-964, Feb 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30721733. Acesso em: 14 out. 2018.

WU, B. *et al.* Lentiviral delivery of biglycan promotes proliferation and increases osteogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Journal of Molecular Histology,** Dordrecht, v. 44, n. 4, p. 423-431, Aug 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504199. Acesso em: 20 nov. 2018.

WU, H. *et al.* Comparison of nucleus pulposus stem/progenitor cells isolated from degenerated intervertebral discs with umbilical cord derived mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research,** New York, v. 361, n. 2, p. 324-332, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097182. Acesso em: 1 mar. 2019.

WUERTZ, K. *et al.* Inflammatory and catabolic signalling in intervertebral discs: the roles of NF-kB and MAP kinases. **European Cells & Materials**, Glasgow, v. 23, p. 103-19; discussion 119-120, Feb 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22354461. Acesso em: 26 fev. 2019.

XIA, Y. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. **Nature Cell Biology,** London, v. 15, n. 12, p. 1507-1515, Dec 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24240476. Acesso em: 16 set. 2018.

YAGMUR, E. *et al.* Hyaluronan serum concentrations are elevated in critically ill patients and associated with disease severity. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 45, n. 1-2, p. 82-87, Jan 2012. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085533. Acesso em: 11 fev. 2019.

YAMAGUCHI, Y.; MANN, D. M.; RUOSLAHTI, E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. **Nature,** London, v. 346, n. 6281, p. 281-284, Jul 1990. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2374594. Acesso em: 12 jan. 2019.

YEUNG, T. M. *et al.* Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington DC, v. 107, n. 8, p. 3722-3727, Feb 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133591. Acesso em: 15 abr. 2019.

YIN, X. *et al.* Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. **Nature Methods**, New York, v. 11, n. 1, p. 106-112, Jan 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292484. Acesso em: 7 abr. 2019.

YOSHIIWA, T. *et al.* Analysis of the Relationship between Hypertrophy of the Ligamentum Flavum and Lumbar Segmental Motion with Aging Process. **Asian Spine Journal,** Seoul, v. 10, n. 3, p. 528-535, Jun 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340534. Acesso em: 19 out. 2019.

ZARDO, E.; ABRAMCZUK, J.; ZIEGLER, M. S. Embriologia da coluna vertebral. *In:* PUDLES, E; DEFINO, H. L. A. (ed.). **Coluna vertebral:** conceitos básicos. Rio de Janeiro: Artmed, 2013.

ZEHRA, U. *et al.* Defects of the vertebral end plate: implications for disc degeneration depend on size. **Spine Journal**, New York, v. 17, n. 5, p. 727-737, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108405. Acesso em: 22 dez. 2018.

ZHANG, C. *et al.* Feasibility of T2 mapping and magnetic transfer ratio for diagnosis of intervertebral disc degeneration at the cervicothoracic junction: a pilot study. **BioMed Research International,** New York, v. 2019, p. 6396073, 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31187047. Acesso em: 18 fev. 2019.

ZHANG, J. *et al.* TNF-α enhances apoptosis by promoting chop expression in nucleus pulposus cells: role of the MAPK and NF-κB pathways. **Journal of Orthopaedic Research,** New York, v. 37, n. 3, p. 697-705, Mar 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30561076. Acesso em: 11 mar. 2019.

ZHANG, J. F. *et al.* Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and interleukins in vertebral cartilage endplate. **Orthopaedic Surgery,** Richmond, v. 10, n. 4, p. 306-311, Nov 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30474324. Acesso em: 3 dez. 2018.

APÊNDICES

# **APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: Hérnia Discal na Coluna Vertebral.

O motivo que nos leva a estudar o disco intervertebral é para podermos avaliá-lo anatomopatológica e bioquimicamente, ou seja, sua composição e perda da sua função devido à sua inflamação.

A pesquisa se justifica, pois trará importante resultado quanto ao tratamento das doenças da coluna. O objetivo desse projeto é, através da análise do disco intervertebral, saber a influência do mesmo na causa da doença da coluna.

O procedimento de coleta de material será da seguinte forma: Será retirada uma parte do disco intervertebral no ato cirúrgico, sendo que essa retirada se faz necessária para a descompressão do nervo, não haverá nenhuma alteração no procedimento cirúrgico padrão.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: Não haverá nenhum desconforto, risco ou benefício extra ou diferente de uma cirurgia padrão. O risco na sua participação deste projeto de pesquisa é de quebra da confidencialidade, e por isso me comprometo em manter o anonimato de todos os participantes, tomando cuidados como não identificação do seu nome, endereço, parentescos, e qualquer outro tipo de informação que comprometa a confidencialidade, ou seja, sua identificação.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Caso você apresente algum problema em seus exames, você será encaminhado para tratamento adequado ao tipo de doença da seguinte maneira:

Será acompanhado em segmento ambulatorial no consultório do Dr. Marcelo Ferraz de Campos, localizado na Rua Atlântica, 400, Jardim do Mar, São Bernardo do Campo. Telefones:4330-4487 (clínica) ou 94123-1068 (celular) e email: ferrazcampos@uol.com.br

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE **SIGILO**: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos seus exames serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Curso de Pós-Graduação Nível Doutorado da Faculdade de Medicina do ABC e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará nenhum custo para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Não haverá nenhum gasto extra de tempo, transporte, creche, alimentação, etc., uma vez que a extração do material se dará durante a cirurgia que irá ser realizada.

Rubrica Participante: \_\_\_\_\_ Rubrica Pesquisador: \_\_\_\_\_

### DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE:

Eu, Sr(a). XXX fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O Dr. Marcelo Ferraz de Campos certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso não existe a possibilidade de gastos adicionais, uma vez que esta pesquisa em nada alterará a cirurgia que já estou prestes a realizar. Em caso de dúvidas, poderei contatar o Dr. Marcelo Ferraz de Campos no telefone (11) 94123-1068 ou (11) 4330-4487.

Este estudo clínico foi analisado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O CEP é um órgão que tem por objetivo proteger o bem-estar dos indivíduos pesquisados. É responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, visando assegurar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do sujeito da pesquisa.

Declaro que concordo em participar desse estudo, sendo que este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

#### Consentimento Pós-Informação

Eu,

informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

, fui

ANEXOS

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP)



udede Federal de São Paulo Encole Pauliste de Medice Comitê de Ébica em Pesquesa Holgikal São Paulo

São Paulo, 22 de agosto de 2012 CEP Nº 0208/12 CONEP Nº:

#### limo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): LUCIANO MILLER REIS RODRIGUES

Disciplina/Departamento: Biologia Molecular/Bioquímica

Título do estudo: Estudos moleculares da degeneração do disco intervertebral

Prezado(a) Pesquisador(a),

Cumprindo as atribuições do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP, comunicamos que o projeto de pesquisa foi analisado em reunião e o parecer já está disponível na secretaria do CEP.

FAVOR MENCIONAR O NÚMERO DE REGISTRO DO PROJETO PARA RETIRAR O PARECER (CEP Nº... canto superior direito desta carta)

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Página 1 de 1

Rua Botucatu, 572 - 1o andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil