



## Artigo original

# Influência da terapia celular mononuclear sobre a degeneração discal em coelhos<sup>☆</sup>



Rodrigo Caldonazzo Fávaro, André de Oliveira Arruda, Luiz Roberto Gomes Vialle e Emiliano Neves Vialle\*

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Hospital Universitário Cajuru, Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Curitiba, PR, Brasil

### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

#### Histórico do artigo:

Recebido em 9 de fevereiro de 2016

Aceito em 18 de março de 2016

On-line em 22 de junho de 2016

#### Palavras-chave:

Colágeno

Disco intervertebral

Terapia celular

Histologia

Coelho

### R E S U M O

**Objetivo:** Avaliar a influência da injeção de células-tronco mononucleares autólogas sobre as alterações histológicas do colágeno no ânulo fibroso do disco intervertebral após lesão experimental.

**Métodos:** Foram submetidos 32 coelhos New Zealand a punção do discos intervertebrais lombares seguida de injeção intradiscal de células mononucleares provenientes da crista ilíaca versus injeção de solução salina nos seguintes períodos tempo: dois meses após a lesão (CT2M e SS2M), duas semanas (CT2S e SS2S), imediatamente após a lesão (CTCP e SSCP) e sem induzir a degeneração (CTSP e SSSP). Após dois meses da terapia celular, os animais foram submetidos a eutanásia e as alterações do colágeno nos discos intervertebrais foram avaliadas histologicamente.

**Resultados:** Houve diferença estatisticamente significativa na CEAF entre os grupos CT2S e SS2S ( $p = 0,018$ ). Essa diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (56,7%) comparado com o CT2S (13,28%).

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

© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Influence of mononuclear cell therapy on disc degeneration in rabbits

#### A B S T R A C T

**Objective:** The objective of this research was to evaluate the influence of autologous mononuclear stem cells injections on histological changes of collagen in the fibrous annulus of the intervertebral disc after experimental injury.

#### Keywords:

Collagen

Intervertebral disc

<sup>☆</sup> Trabalho desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Hospital Universitário Cajuru, Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Curitiba, PR, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [evialle@hotmail.com](mailto:evialle@hotmail.com) (E.N. Vialle).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2016.03.007>

0102-3616/© 2016 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cell and tissue-based therapy  
Histology  
Rabbit

**Methods:** 32 New Zealand rabbits were submitted to intervertebral disc puncture, followed by intradiscal injection of mononuclear cells from the iliac crest *versus* saline injection in the following time periods: two months after the injury (SC2M and SS2M), two weeks (SC2W and SS2W) immediately after injury (SCCP and SSCP), and without inducing degeneration (SCSP and SSSP). Two months after cell therapy, the animals were euthanized and collagen changes in the intervertebral discs were histologically evaluated.

**Results:** There were significant differences in ELAF between SS2W and SS2S groups ( $p=0.018$ ). This difference was due to an increase in type I collagen in SS2W group (56.7%) compared to SC2S (13.28%).

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

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

## Introdução

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

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

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

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

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

## Material e métodos

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

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

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

Após o procedimento anestésico padrão (10-12) os coelhos foram posicionados em decúbito lateral direito e submetidos a uma lombotomia com exposição da coluna lombar por via retroperitoneal (fig. 1), expôs-se a superfície anterior de 5 DIVs lombares consecutivos (L2-L3 a L6-L7). Os três discos experimentais foram puncionados com agulha 40X12 mm (18 G 1 1/2), em uma profundidade de 5 mm, que permaneceu no interior do DIV por 5 segundos (fig. 2).



**Figura 1 – Preparo cirúrgico.** Os coelhos anestesiados eram posicionados em decúbito lateral direito e abordados em acesso posterolateral retroperitoneal.

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

Grupo	Células-tronco			
	CT2M	CT2S	CTCP	CTSP
Coelhos (n = 14)	4	3	4	3
Discos intervenção (n = 37)	12	9	7	9
Discos controle (n = 60)	16	14	16	14

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



**Figura 2 – Preparo da agulha para executar a punção. Delimitamos os 5 mm finais de uma de 40 x 12 mm (18 G 1/2) a partir de seu bisel e a dobramos no formato de S com o intuito de padronizar a profundidade das punções.**

O processo de isolamento e obtenção das células tronco (CT) mononucleares foi feito por meio da punção-aspiração da medula óssea da crista ilíaca e faz parte do protocolo já desenvolvido e consolidado nessa instituição de ensino.<sup>16</sup>

Após coleta e isolamento das células, elas foram introduzidas no DIV do animal com a mesma técnica cirúrgica anteriormente descrita. O material foi colocado no limite superior do DIV previamente perfurado, com, no entanto, agulha de menor calibre 13X4,5 (26 G 1/2). Foram feitos exatamente os mesmos procedimentos nos animais que receberam apenas solução salina (SS) isotônica, injetou-se a quantidade idêntica ao do volume celular, obedeceu-se às mesmas condições citadas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

As imagens foram processadas pelo software Image Pro Plus® V.4.50 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), que permite quantificar os pontos verdes (colágeno tipo III) e vermelhos da lamina (colágeno do tipo I) e estratificá-los com suas respectivas percentagens (fig. 4).

## Resultados

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

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

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

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

SS2M, injeção de solução salina após 2 meses da punção; SS2S, injeção de solução salina após 2 semanas da punção; SSCP, injeção de solução salina no mesmo momento da punção; SSSP, injeção de solução salina sem punção.

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

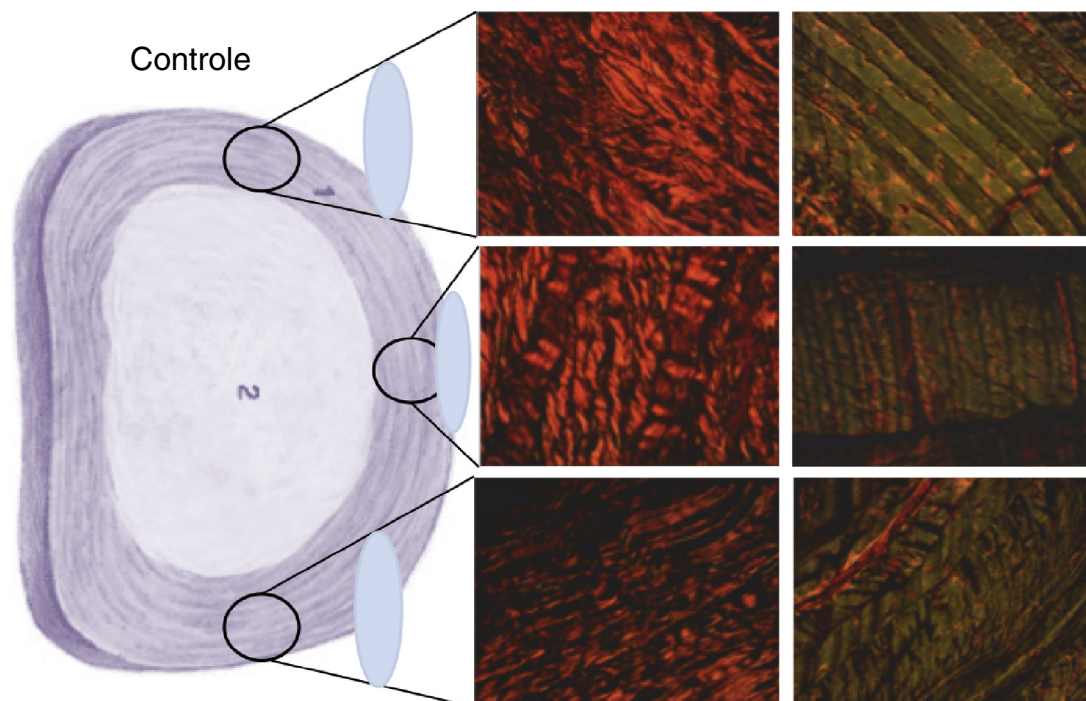
Quando comparamos a CIAF dos grupos injetados com CT com o dos injetados com SS notamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (tabela 3).

Quando comparamos a CEAF dos grupos injetados com CT com o dos injetados com SS notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,018$ ). Essa diferença decorreu de um aumento do colágeno do tipo I no grupo SS2S (56,7%) comparado com o CT2S (13,28%). Os valores de colágeno do tipo I e III e as comparações dos grupos são demonstrados na tabela 4 e figura 5.

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

## Discussão

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



**Figura 3 – Ferramenta DinoCapture.**

Ilustração esquemática dos seis campos fotografados em um disco controle. Dois campos ângulo lateral direito do disco, um da porção externa e um da porção interna do ânulo; dois campos ângulo lateral esquerdo do disco, um da porção externa e um da porção interna do ânulo; dois campos centro da porção convexa do disco do disco, um da porção externa e um da porção interna do ânulo. Nota-se a preponderância do verde na camada externa do ânulo fibroso (CEAF) que denota o colágeno do tipo III e do vermelho na camada interna do ânulo fibroso (CIAF) que indica o colágeno do tipo 1.

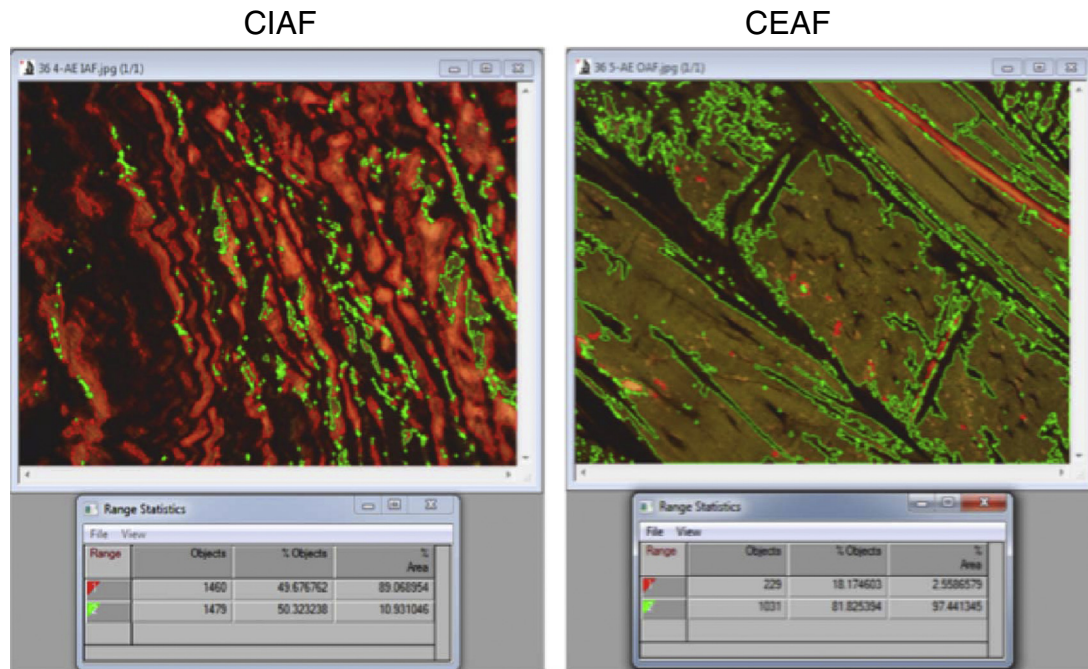


Figura 4 – Ferramenta Image Pro Plus.

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

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

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

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

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

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

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

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

<sup>a</sup> Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; p < 0,05.

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

Variável	Col	Grupo	N	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p <sup>a</sup>
CEAF	I	CT2M	12	25,85	1,24	68,87	19,58	0,201
		SS2M	9	39,2	13,1	82,8	21,0	
	III	CT2M	12	74,15	31,13	98,76	19,58	0,201
		SS2M	9	60,8	17,2	86,9	21,0	
	I	CT2S	9	13,28	2,72	20,99	6,55	0,018
		SS2S	6	56,7	8,7	98,7	32,8	
	III	CT2S	9	86,72	79,01	97,28	6,55	0,018
		SS2S	6	43,3	1,3	91,3	32,8	
	I	CTCP	7	14,91	6,38	29,11	8,16	0,063
		SSCP	12	9,1	1,6	21,9	6,9	
	III	CTCP	7	85,09	70,89	93,62	8,16	0,063
		SSCP	12	90,9	78,1	98,5	6,9	
	I	CTSP	9	12,05	2,29	36,52	10,54	0,773
		SSSP	8	15,0	3,1	60,6	19,7	
	III	CTSP	9	87,95	63,48	97,71	10,54	0,773
		SSSP	8	85,0	39,4	96,9	19,7	

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

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

<sup>a</sup> Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ .

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

Variável	Col	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p <sup>a</sup>
Ânulo fibroso como um todo	I	CT2M	12	49,61	2,16	78,59	22,21	0,155
		SS2M	9	62,3	27,8	88,9	16,1	
	III	CT2M	12	50,39	21,41	97,84	22,21	0,155
		SS2M	9	37,7	11,1	72,2	16,1	
	I	CT2S	9	53,32	47,90	59,15	3,62	0,025
		SS2S	6	76,1	48,2	97,4	17,5	
	III	CT2S	9	46,68	40,85	52,10	3,62	0,025
		SS2S	6	23,9	2,6	51,8	17,5	
	I	CTCP	7	55,76	51,10	64,33	4,57	0,151
		SSCP	12	53,0	48,6	60,7	3,5	
	III	CTCP	7	44,24	35,67	48,90	4,57	0,151
		SSCP	12	47,0	39,3	51,4	3,5	
	I	CTSP	9	51,61	43,83	64,43	6,59	0,534
		SSSP	8	54,9	45,5	79,5	11,1	
	III	CTSP	9	48,39	35,57	56,17	6,59	0,564
		SSSP	8	45,1	20,5	54,5	11,1	

Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT2S e SS2S ( $p=0,025$ ).

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

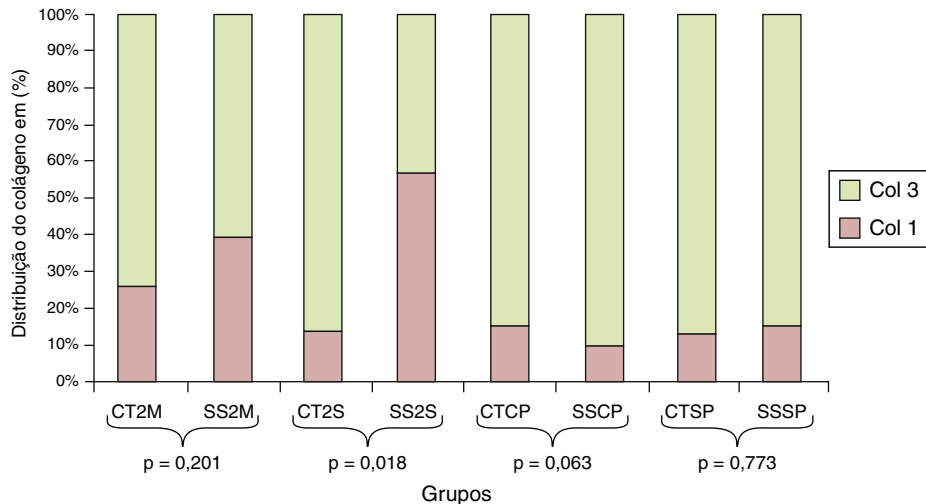
<sup>a</sup> Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ .

área datam do fim dos anos 1990.<sup>1,21</sup> Essa avaliação tem como principal vantagem a sua especificidade, no entanto, em nosso meio, ainda é um método caro. Em nosso estudo, o *sirius red* mostrou-se um método simples e barato para avaliar o colágeno do tipo I e III.

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

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

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



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

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

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

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

A injeção de CTM e células mononucleares precursoras mesenquimais tipicamente é segura, ainda que tenha um potencial para formação de osteófitos periféricos, o que sugere a importância de um carreador adequado e seguro quando injetamos células nessa região.<sup>25</sup> Nesse sentido, o carreador pode permitir a célula receber cargas axiais, importante para estimular a síntese de matriz extracelular e induzir a diferenciação das CTM sem outro estímulo exógeno.<sup>26</sup> Diferentes carreadores têm sido usados na literatura como alguns hidrogéis<sup>26,27</sup> e a cola de fibrina.<sup>28</sup> Apesar de esses estudos defenderem o uso de um carreador celular na aplicação das células tronco, a literatura é controversa nesse quesito. Outros estudos usam apenas soro fisiológico<sup>29</sup> ou, até mesmo, nenhum carreador.<sup>22</sup> Em nosso estudo usamos o meio de cultura MEMD com 20% de soro bovino fetal, método que também têm sido usado com sucesso na literatura.<sup>30</sup>

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

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

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

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

Ao comparar os grupos injetados sem a punção, o CTSP demonstrou 51,61 do tipo I e 48,39% do tipo III. Enquanto o SSSP demonstrou 54,9% do tipo I e 45,10% do tipo III. Entre esses grupos notamos que não houve grande diferença, como era esperado, uma vez que eles não foram induzidos à degeneração pela punção. Na análise estatística não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esses dados indicam que as CTM não alteram a estrutura do colágeno em discos injetados sem degeneração discal.

## Conclusão

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

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

## REFERÊNCIAS

- Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22(24):2781-95.
- Brisby H. Pathology and possible mechanisms of nervous system response to disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:68-71.
- Hughes SP, Freemont AJ, Hukins DW, McGregor AH, Roberts S. The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(10):1298-304.
- Cavalli-Sforza L, Feldman M, Dornbusch S, Chen KH. Cultural evolution. Anthropology and cultural transmission. *Nature*. 1983;304(5922):124.
- Colloca CJ, Keller TS, Moore RJ, Harrison DE, Gunzburg R. Validation of a noninvasive dynamic spinal stiffness assessment methodology in an animal model of intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(18):1900-5.
- Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:21-4.
- Murray CJ, Atkinson C, Bhalla K, Birbeck G, Burstein R, Chou D, et al. The state of US health, 1990-2010: burden of diseases, injuries, and risk factors. *JAMA*. 2013;310(6):591-608.
- An HS, Masuda K. Relevance of in vitro and in vivo models for intervertebral disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:88-94.
- Evans C. Potential biologic therapies for the intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:95-8.
- Vialle EN, Vialle LR, Arruda AO. Histomorphometric analysis of experimental disc degeneration. *Global Spine J*. 2012;2(3):129-36.
- Vialle EN, Vialle LR, Bleggi-Torres LF, Sakamoto KS. Histological evaluation of the effects of methylprednisolone on experimental medullary lesion in rats. *Rev Bras Ortop*. 2007;42(4):101-13.
- Carvalho KA, Cunha RC, Vialle EN, Osiecki R, Moreira GH, Simeoni RB, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45+/CD34-) after cell therapy in acute spinal cord injury: in exercise training and in sedentary rats. *Transplant Proc*. 2008;40(3):847-9.
- Lipson SJ, Muir H. 1980 Volvo award in basic science. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1981;6(3):194-210.
- Masuda K, Aota Y, Muehleman C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):5-14.
- Rousseau MA, Ulrich JA, Bass EC, Rodriguez AG, Liu JJ, Lotz JC. Stab incision for inducing intervertebral disc degeneration in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(1):17-24.
- Guarita-Souza LC, Atahyde K, Carvalho T, Rebelatto C, Hansen P, Furuta M, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Rev Bras Cir*. 2005;20(3):270-8.
- Kim DW, Chun HJ, Lee SK. Percutaneous needle puncture technique to create a rabbit model with traumatic degenerative disk disease. *World Neurosurg*. 2015;84(2):438-45.
- Vialle E, Vialle LR, Arruda ADO, Riet RN, Krieger ABD. Análise radiológica da degeneração discal experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop*. 2009;44(4):313-9.
- Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, Wallach CJ, Robertson DD, Vogt MT, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):15-24.
- Kim KS, Yoon ST, Li J, Park JS, Hutton WC. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):33-7.
- Nerlich AG, Boos N, Wiest I, Aebi M. Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages. *Virchows Arch*. 1998;432(1):67-76.
- Serigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res*. 2010;28(10):1267-75.
- Ghosh P, Moore R, Vernon-Roberts B, Goldschlager T, Pascoe D, Zannettino A, et al. Immunoselected STRO-3+ mesenchymal precursor cells and restoration of the extracellular matrix of degenerate intervertebral discs. *J Neurosurg Spine*. 2012;16(5):479-88.
- Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen Med*. 2010;5(5):701-11.
- Vadalà G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerate intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012;6(5):348-55.



- 
26. Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, Freemont AJ, Hoyland JA. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials*. 2008;29(1):85-93.
  27. Frith JE, Cameron AR, Menzies DJ, Ghosh P, Whitehead DL, Gronthos S, et al. An injectable hydrogel incorporating mesenchymal precursor cells and pentosan polysulphate for intervertebral disc regeneration. *Biomaterials*. 2013;34(37):9430-40.
  28. Allon AA, Aurouer N, Yoo BB, Liebenberg EC, Buser Z, Lotz JC. Structured coculture of stem cells and disc cells prevent disc degeneration in a rat model. *Spine J*. 2010;10(12):1089-97.
  29. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J*. 2008;8(6):888-96.
  30. Ho G, Leung VY, Cheung KM, Chan D. Effect of severity of intervertebral disc injury on mesenchymal stem cell-based regeneration. *Connect Tissue Res*. 2008;49(1):15-21.