

MEDICINA REGENERATIVA

REGENERATIVE MEDICINE

EDSON CERQUEIRA GARCIA DE FREITAS & MARCELO JORGE LAGE

RESUMO

A terapia celular, ainda experimental, tem melhorado sobremaneira as degenerações de cartilagens, discos vertebrais e músculos, tendões e ossos. Neste trabalho, focaremos nossa experiência na terapia celular aplicada à regeneração do disco vertebral. Os tópicos que serão abordados são: 1) doença degenerativa de discos intervertebrais; 2) células-tronco e terapia celular; 3) terapia celular em doença degenerativa de discos intervertebrais; 4) avaliação clínica, antropométrica, exames complementares e questionário de auto-avaliação do paciente; 5) coleta, isolamento e expansão de células tronco mesenquimais; 6) controle de qualidade das células tronco mesenquimais; 7) preparo do plasma rico em plaquetas; 8) ressonância nuclear magnética com mapeamento em T2.

DESCRITORES: Medicina regenerativa; células tronco; degeneração discal intervertebral.

ABSTRACT

Cell therapy, still experimental, has greatly improved the degenerations of cartilages, vertebral discs, muscles, tendons and bones. In this work, we will focus on our experience in cell therapy applied to the regeneration of the vertebral disc. The topics that will be addressed are: 1) degenerative disease of intervertebral discs; 2) stem cells and cell therapy; 3) cell therapy in degenerative disease of intervertebral discs; 4) clinical, anthropometric evaluation, complementary exams and self-assessment questionnaire; 5) collection, isolation and expansion of mesenchymal stem cells; 6) quality control of mesenchymal stem cells; 7) preparation of platelet rich plasma; 8) magnetic resonance imaging with T2 mapping.

KEY WORDS: Regenerative medicine; stem cell; intervertebral disc degeneration.

INTRODUÇÃO

Não é novidade para ninguém que os avanços da medicina têm trazido inúmeros benefícios para a população mundial. Basta verificarmos a nova expectativa de vida: ela mais do que dobrou em menos de um século. A descoberta de drogas mais específicas, antibióticos mais potentes, técnicas cirúrgicas menos agressivas, materiais biocompatíveis que substituem partes do corpo e um número de inovações e soluções científicas que pesquisam doenças que há pouco tempo matavam em meses, são hoje controladas e curadas com o simples uso de um tratamento específico.

Todavia, essas medicações tem promovido uma série de situações paralelas como, por exemplo: efeitos colaterais das drogas, colocação de próteses ou materiais com prazo de validade, re-operações com uma série de complicações e insucessos.

Até agora o nosso objetivo era tratar, mas não se conseguia regenerar a região acometida e assim, segmentos do nosso corpo se desgastavam com o passar dos anos.

Com o aumento da nova expectativa de vida, ela (a vida) continua, muitas vezes à custa de muitos sacrifícios, pois as doenças degenerativas vão nos corroendo e nos freando diante dos anos.

A Medicina Regenerativa vem tentando trazer soluções exatamente para tratar, reparar biologicamente as estruturas degeneradas. Claro que esse reparo ou regeneração não tem o objetivo de provocar um renascimento setorial de maneira plena nos órgãos ou tecidos acometidos. Mas, refazer certa parte e assim, viabilizar o funcionamento mínimo dessa estrutura, restaurando esta vida lacunar. Mesmo que em pequenas partes, mas o suficiente para promover a saúde funcional do segmento. Muita coisa em medicina regenerativa ainda está por vir. Os mais diversos centros mundiais de pesquisa de reconhecimento notório, tem se dedicado a esse tema. São muitas pesquisas e artigos científicos sendo produzidos, mas aos poucos já começam a chegar ao nosso meio a oportunidade de iniciar essa terapia revolucionária.

Na ortopedia, temos utilizado três ferramentas, para realizar a medicina regenerativa: 1 - medicações biológicas, anabólicas,

utilizadas para tratamento da osteoporose, e que também promovem o crescimento do tecido ósseo, cartilaginoso e vascular. 2 - terapia por ondas de choque indicada em várias situações, além de promover uma analgesia e melhora da inflamação, também promove a regeneração de novos tecidos. 3 - terapia celular, ainda experimental, que tem melhorado sobremaneira as degenerações de cartilagens, discos vertebrais e músculos, tendões e ossos. Neste trabalho, focaremos nossa experiência na terapia celular aplicada à regeneração do disco vertebral ⁽¹⁻²²⁾.

DOENÇA DEGENERATIVA DE DISCOS INTERVERTEBRAIS

A degeneração discal é um fenômeno fisiológico que faz parte do envelhecimento do corpo humano. Todavia, tem-se observado uma degeneração mais precoce em função dos hábitos da vida moderna e também pela maior expectativa de vida ⁽¹⁾.

Quando a degeneração discal altera de maneira considerável a unidade motora-funcional da coluna vertebral, fenômenos patológicos desenvolvem-se assim como: herniamento discal com ou sem compressão neurológica, degeneração fascetária e instabilidades ⁽²⁾.

A abordagem conservadora para se tratar esta situação, tem-se baseado em condutas paliativas como medicações sintomáticas ou terapias de reabilitação motora diversas. Nos casos de maior incapacidade opta-se pelo tratamento cirúrgico que na maior parte das vezes é composto de técnicas descompressivas, ablativas, fusionantes ou substitutivas. Tais abordagens não privilegiam a resolução do problema intrínseco ao disco vertebral, gerando então possibilidades para terapias alternativas que vislumbram a recuperação celular e assim por consequência, a regeneração de toda a unidade motora-funcional da coluna vertebral ⁽³⁾.

Segundo Hohaus ⁽⁴⁾, três quartos da população têm, tiveram ou terão dor nas costas em alguma fase da vida. A discopatia degenerativa da coluna vertebral é o grande desafio no que tange a ciência nos dias de hoje.

O modelo da medicina atual, utilizado pelos especialistas de coluna, privilegia as soluções biomecânicas em detrimento das biológicas, ou seja, as cirurgias podem sacrificar o disco vertebral de forma parcial ou em sua totalidade ou em casos em que esses procedimentos geram instabilidade no segmento abordado, são indicadas técnicas de substituição por próteses ou fusão através de artrodese que atualmente são consideradas como tratamento padrão. Contudo, estas técnicas geram grandes intervenções com mobilidade importante além de provocar sobrecarga motora nos discos adjacentes que em muitos casos geram degeneração em cascata ^(5, 6).

As mudanças bioquímicas e celulares atribuídas à degene-

ração discal, incluem a diminuição da capacidade da matriz extracelular, assim como o Colágeno II e o Aggrecan. As células discas regulam a produção de Proteoglicam e potencialmente inibem os nervos sensitivos do disco vertebral. Com a redução do conteúdo de Proteoglicam no disco do idoso, a matriz proteica diminui o acoplamento à água, levando à desidratação com incompetência de dissipar as forças da coluna vertebral, propiciando o seguinte quadro ⁽⁴⁾:

- 1 – Degeneração discal, decréscimos da densidade celular
- 2 – Reduções da síntese da matriz extracelular cartilaginosa (Colágeno II e Aggrecan)
- 3 – Diminuições do conteúdo de Proteoglican intra discal
- 4 – Reduções da quantidade de água
- 5 – Diminuições da capacidade de dissipar forças na coluna
- 6 – Instabilidades com hiper mobilidade vertebral.

Técnicas menos invasivas têm sido utilizadas atualmente como a Eletro-termo Terapia Intradiscal (Intradiscal Electro-thermal Therapy – IDET) que é utilizada para tratamento de dor discogênica e/ou hérnia discal contida pequena ⁽³⁶⁾. O IDETTM reduz em 10 a 15% do volume do núcleo pulposo, o que diminui em mais de 90% a pressão intra discal e consequentemente a pressão sobre a raiz nervosa, aliviando a dor do nervo; além disso, faz concomitantemente o "shrink" (retração/contração) de fibras do colágenas e de nociceptores presentes em porção posterior do anel fibroso do disco que sabidamente é a fonte que origina a dor discogênica. Esse procedimento foi desenvolvido nos EUA e teve aprovação do Food and Drug Administration (FDA) em 1998; porém, no Brasil esta técnica começou a ser utilizada a partir de 2004. Em dez anos de experiência pode se estabelecer com mais rigor os critérios de indicação e contra indicação para o procedimento. Atualmente, o IDET continua sendo uma alternativa importante no tratamento da dor discogênica, por ser pouco invasiva e bastante efetiva, sendo que o índice de sucesso chega a 80% em casos bem selecionados ⁽⁷⁾.

CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR

Células-tronco são células indiferenciadas que apresentam capacidade de autoduplicação e de dar origem a células diferenciadas. Melton e Cowan (2004) propuseram uma "working definition" de célula-tronco (CT) como "uma entidade clonal auto-renovável que é pluripotente e pode dar origem a vários tipos de células diferenciadas". Apesar de variações conceituais, há dois aspectos básicos e comuns presentes nas mais diferentes definições de CT: auto-renovação e capacidade de originar células diferenciadas ⁽⁸⁾ (figura 1).

Em função de sua origem, pode-se definir 3 tipos gerais: CT

Fontes de STEM CELLS



Figura 1 – Fontes de células tronco.

oriundas da massa celular interna do blastocisto, denominadas células-tronco embrionárias (CTE); as oriundas da crista gonadal, células-tronco germinativas (CTG) e as células-tronco adultas (CTA), obtidas em diferentes tecidos, incluindo-se as células-tronco hematopoéticas (CTH), obtidas da medula óssea, as células-tronco mesenquimais (CTM) e as células obtidas do cordão umbilical⁽⁹⁾.

As células-tronco mesenquimais são definidas como uma população de células estromais multipotentes não-hematopoéticas, com aspecto fibroblastóide que aderem a superfície do plástico em condições padrões de cultura. Apresentam a capacidade de se auto-renovar e diferenciar-se em osso, cartilagem, músculo, tendão, estroma medular, tecido adiposo. Este tipo celular é caracterizado pela presença dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e ausência (gate de exclusão) dos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II (10).

A tendência atual, que se apreende da literatura, é de assumir, quanto ao potencial de diferenciação, que as CTA são multipotentes, ou seja, podem formar diferentes tipos celulares que constituem um tecido. Dessa forma, o potencial de diferenciação, a plasticidade ou transdiferenciação das CTA, têm sido consideradas de forma mais restrita^(8; 11), sobretudo em relação às proposições enunciadas desde os anos 90⁽¹²⁾ (figura 2).

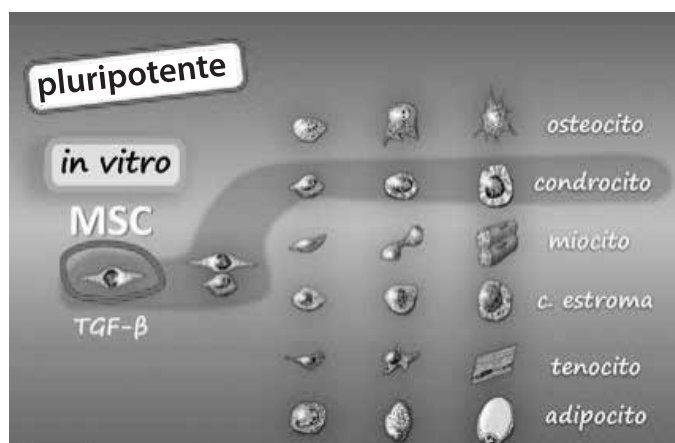


Figura 2 – Capacidade de diferenciação da célula tronco.

A terapia celular poderia ser conceituada de forma ampla e genérica, como o emprego de células para tratamento de doenças. Considerada nesta perspectiva ampla, a terapia celular representa uma antiga prática terapêutica, que teve início com a transfusão de sangue total ou concentrado de plaquetas em diferentes situações clínicas agudas ou crônicas. Os transplantes de células-tronco hematopoéticas (TCTH) foram, pioneiramente, realizados por Till e McCulloch em 1961⁽¹³⁾, durante seus estudos sobre a resposta de ratos com a medula óssea transplantada após lesão provocada por irradiação ionizante. Esse trabalho pioneiro abriu novas perspectivas e sinalizou para a possibilidade de utilização de outros tecidos seguindo o modelo experimental adotado por estes autores. O TCTH, ou transplante de medula óssea, representa, até o momento, a única forma de terapia celular consolidada e incorporada rotineiramente em terapêutica humana.

A utilização das CTMs como terapia celular tem despertado muito interesse, devido a sua habilidade de diferenciar-se em diversas linhagens celulares, e produzir citocinas e fatores de crescimento que estão envolvidos no reparo e regeneração de tecidos danificados. Além disso, medeiam significativamente efeitos imunossupressivos e anti-inflamatórios⁽¹⁴⁾.

Outra vantagem do uso das CTMs, é que estas podem ser isoladas de distintas fontes, sendo as principais a medula óssea e o tecido adiposo⁽¹⁵⁾. As células derivadas do tecido adiposo apresentam uma série de características que as tornam extremamente atraentes: sua quantidade abundante, são colhidas através de um procedimento pouco invasivo, podem diferenciar-se em múltiplas linhagens celulares de maneira reprodutível e regulável, pode ser segura tanto em hospedeiros autólogos ou alogênicos⁽¹⁶⁾.

Por outro lado, a terapia celular com CTA consolida-se progressivamente em termos de potencialidade terapêutica e vem sendo cada vez mais utilizada por diferentes grupos de pesquisadores visando a regeneração de tecidos lesados ou correção funcional de órgãos primariamente acometidos por diferentes patologias. Essa abordagem descortina novas alternativas e esse conjunto de práticas terapêuticas inovadoras tem sido agrupado, por alguns pesquisadores, sob a denominação de medicina regenerativa.

TERAPIA CELULAR EM DOENÇA DEGENERATIVA DE DISCOS INTERVERTEBRAIS

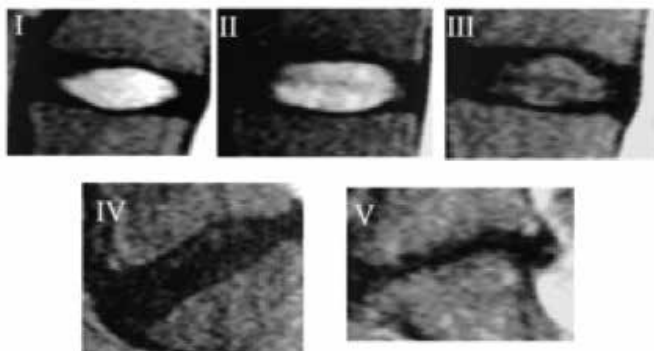
Vários autores vêm utilizando técnicas biológicas e de engenharia tecidual com objetivo de encontrar o melhor protocolo. CORIC, D. et al.⁽¹⁷⁾, utilizaram condrócitos alogênicos em estudo prospectivo, com resultados positivos na avaliação de RMN e com melhoras da sintomatologia após seis meses de evolução. HEE, H. T. et al.⁽¹⁸⁾, utilizam células

mesenquimais de matrizes ósseas em coelhos, demonstrando melhoras histológicas e morfológicas. HUANG, B. et al. ⁽¹⁹⁾, em um estudo em ratos, utilizaram células do núcleo pulposo acopladas a um polímero como enxerto híbrido com resultados satisfatórios também na morfologia e na histologia. SATO, M. et al. ⁽²⁰⁾ e Yi, Q. et al. ⁽²¹⁾, utilizaram técnicas de engenharia tecidual do ânulo fibroso, demonstrando também resultados favoráveis. Todavia, CHUM, H.J. et al. ⁽²²⁾, utilizaram células tronco derivadas de tecido adiposo em coelhos e Hohaus C. ⁽⁴⁾ utilizou células tronco originadas de tecido adiposo em cachorros, obtendo resultados satisfatórios, apresentando boa evolução histo-morfológica.

Nossa opção pelas células de gordura deve-se aos resultados consistentes já publicados e à facilidade no acesso para coleta. A intervenção consiste na coleta de tecido adiposo por lipo-aspiração, expansão ex-vivo das células-tronco mesenquimais do próprio participante e infusão intra-discal destas células associadas à solução líquida e gelatinosa de plasma rico em plaquetas (PRP) por via percutânea no segmento comprometido. As variáveis geralmente monitoradas são:

- Evolução na escala de avaliação analógica de dor
- Evolução na Classificação do grau de degeneração do disco intervertebral por RNM segundo critérios de Pfirrmann (figura 3).
- Evolução no Índice de Oswestry

MRI Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration



Pfirrmann, Spine 2001

Figura 3 – Classificação do grau de degeneração do disco intervertebral lombar por Ressonância Nuclear Magnética (RNM)

Os critérios de inclusão geralmente encontrados na literatura são:

1. Idade acima de 20 anos e inferior a 60 anos
2. Dor de origem discal, confirmado com o exame clínico e de RMN
3. Degeneração discal Grau 3 de Pfirrmann ⁽²³⁾.
4. Pelo menos 6 meses de sintomatologia, com falha no tratamento conservador neste período.

5. Capaz de entender as necessidades do estudo.

Já os critérios de exclusão são:

1. Gravidez, hérnia discal extrusa, tabagismo
2. Cirurgia prévia no segmento a ser abordado
3. Infecção sistêmica ativa e/ou história prévia de infecção local
4. Doença oncológica ativa ou prévia nos últimos 5 anos.
5. Diabetes mellitus tipo I ou tipo II.
6. Coagulopatias, mesmo que em tratamento
7. Doenças neurológicas centrais ou periféricas
8. Sorologia positiva para Hepatite B, hepatite C, HIV, HTLV ou Chagas.
9. Outras doenças que contra-indiquem a intervenção cirúrgica para coleta de tecido adiposo ou no disco intervertebral.

AVALIAÇÃO CLÍNICA E ANTROPOMÉTRICA

Serão verificados a história clínica, o exame físico completo de todos os participantes e a obtenção de dados de massa corporal (Kg) e a estatura (m) de cada um através de uma balança antropométrica. Além disto, será aplicado ao participante a Escala Visual Analógica da dor (24, 25, 26, 27) (figura 4).



Figura 4 - Escala para avaliação analógica da dor.

EXAMES COMPLEMENTARES:

- RNM de Coluna lombar do segmento comprometido (caso não apresentem o exame realizado há menos de 6 meses da inclusão no estudo);
- Raio-X Tórax, hemograma completo, coagulograma, glicose, uréia, creatinina, urina tipo I, B-HCG (se aplicável), sorologia para HIV, Hepatite B, Hepatite C, HTLV 1 e 2 e Doença de Chagas, tipagem sanguínea, avaliação de risco cirúrgico, incluindo ECG e avaliação cardiológica.

QUESTIONÁRIO DE AUTO-AVALIAÇÃO DO PACIENTE

O uso de questionários com Resultados Relatados pelo Paciente (patient reported outcomes - PRO) para medição de condições como dor, incapacidade e qualidade de vida constitui importante opção para a avaliação da eficácia dos tratamentos em dor lombar. Índice funcional de Oswestry (Oswestry disability index – ODI), uma das escalas mais comumente utilizadas nos estudos de incapacidade em pacientes com dor lombar.

COLETA, ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CTM

A coleta das células-tronco será feita em centro cirúrgico por equipe de cirurgia plástica, sendo o tecido adiposo será obtido por meio de lipoaspiração, conforme descrito por Zuk e colaboradores ⁽²⁸⁾.

Em laboratório especializado o tecido adiposo é processado para isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo segundo método padronizado ⁽²⁹⁾, que consiste em realizar a digestão enzimática do tecido utilizando colagenase em ambiente aquecido a 37°C, sob agitação. Após o isolamento e a lavagem das células de interesse, este material é colocado em cultura para multiplicação das células-tronco mesenquimais.

O meio de cultura que nutre as células isoladas (DMEM contendo 5% a 20% de suplemento com antibiótico e antimicótico) deverá ser trocado a cada 3-4 dias.

Será disponibilizada uma seringa resíduo-zero contendo concentrado de células-tronco mesenquimais para administração intra-discal. O número de células preparadas para injeção será quantificado pelo laboratório antes da liberação para infusão, através de contagem manual em câmara de Neubauer. A dose celular preparada será de 15 milhões ($1,5 \times 10^7$ células) de CTM em suspensão de 1 ml (um mililitro) de soro fisiológico (SF 0,9%) em seringa descartável resíduo-zero ^(3, 4, 30, 31).

CONTROLE DE QUALIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A averiguação do controle de qualidade é realizada mediante ensaios de citometria de fluxo, contagem celular e citogenética, descritos adiante.

1. Citometria de Fluxo e contagem celular

São realizados ensaios para identificar as subpopulações celulares nas garrafas onde foram cultivadas as células-tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo. Os anticorpos monoclonais selecionados para a marcação das células serão dirigidos contra proteínas de superfície características de células-tronco mesenquimais e “gate” de exclusão, conforme referência do guia da sociedade internacional de terapia celular ⁽¹⁰⁾. A viabilidade será realizada por azul de tripan e também por citometria de fluxo através do kit Live/Dead fixable Green Dead (Molecular Probe).

A contagem de células-tronco mesenquimais cultivadas será obtida por avaliação microscópica utilizando metodologia padrão de contagem celular por câmara de Neubauer.

1. Citogenética de células-tronco mesenquimais cultivadas.

As células mesenquimais obtidas, a partir da segunda passagem são avaliadas por bandamento G. Esta análise é utilizada para detectar possíveis alterações numéricas e/ou estruturais nos cromossomos obtidos das diferentes passagens de células-

-tronco. A segunda etapa é dependente da detecção ou não de alterações cromossômicas. Serão utilizadas apenas células cultivadas que apresentem resultados normais após a avaliação de pelo menos 20 metáfases por material fixado (figura 5).

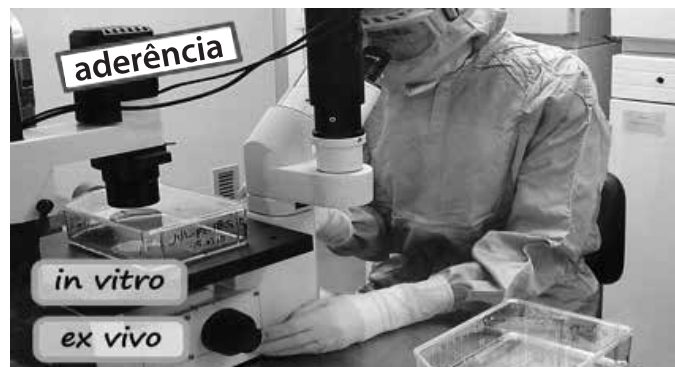


Figura 5 – Preparo das células tronco.

PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Antes do procedimento cirúrgico é realizada a coleta de 40 mL de sangue total do paciente, por meio de punção venosa periférica com o uso de tubos contendo anticoagulante citrato de sódio, carregados a vácuo, estéreis e resistentes à centrifugação. Os tubos contendo o sangue do paciente passam por centrifugação, para a separação dos componentes das séries vermelha, branca e plasma (figura 6).



Figura 6 – Plasma rico em plaquetas já preparado.

O plasma então passa por uma segunda centrifugação, após isso são obtidos o plasma pobre em plaquetas e o plasma rico em plaquetas, que será ativado com gluconato de cálcio 10% para aplicação no paciente. O plasma pobre em plaquetas será ativado com gluconato de cálcio 10% para ativação plaquetária e início do processo de coagulação formando o gel de plaquetas, rico em fatores de crescimento e com propriedades adesivas, hemostáticas e cicatrizantes, esse gel será utilizado na ferida cirúrgica. O processo de centrifugação deve ser totalmente estéril e preciso para obtenção de altas concentrações de plaquetas viáveis e não lesionadas, a fim de evitar a secreção dos fatores de cresci-

mento antes da infiltração do concentrado de plaquetas na área cirúrgica ^(32, 33, 34).

A abordagem é realizada em ambiente cirúrgico, anestesia local e sedação, com técnica minimamente invasiva. A suspensão de CTM em SF 0,9% será acrescida de 1 ml de PRP líquido no momento da aplicação. Ao término da aplicação, o PRP geleificado será aplicado no orifício aberto no disco para acesso ao espaço intra-discal a fim de promover a vedação do mesmo (figura 7).



Figura 7 – Aplicação de células tronco e plasma rico em plaquetas no disco vertebral guiada por radioscopia.

RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA COM MAPEAMENTO EM T2

Outro jeito de avaliar a aplicação discal das células tronco é utilizar o mapeamento em T2 na RNM, pois pode mostrar a regeneração do núcleo, o aumento da densidade e a hidratação discal de forma mais fidedigna.

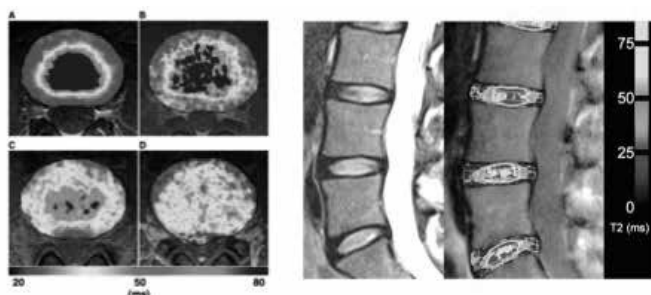


Figura 8 – Mapeamento em T2 na RNM.

CONCLUSÃO

As condutas clássicas para abordagem das patologias do disco vertebral, dentre elas medicações sintomáticas, reabilitação motora ou cirurgias diversas, não conseguem reverter biologicamente a degeneração das discopatias vertebrais.

Esta pesquisa visa reforçar esta conduta para alguns tipos de situação específica, onde o paciente apresenta melhoras clínicas mais duradouras.

Nenhuma conduta terapêutica, inclusive a defendida nesta pesquisa, tem a possibilidade de resolver definitivamente a degeneração da coluna vertebral.

Continuamos apostando na prevenção como melhor opção para resolvermos graves problemas, de custos trabalhistas absurdos e de incapacitação de grande parte da população.

REFERÊNCIAS

- TAHER, F. et al. Lumbar Degenerative Disc Disease: Current and Future Concepts of Diagnosis and Management. Hindawi Publishing Corporation Advances in Orthopedics. Article ID 970752, 7 pages (2012).
- OEHME, D. et al. Cell-Based Therapies Used to Treat Lumbar Degenerative Disc Disease: A Systematic Review of Animal Studies and Human Clinical Trials. Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International. Article ID 946031, 16 pages (2015).
- Pang, X. et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Chronic Discogenic Low Back Pain. Pain Physician; 17:E525-E530 (2014).
- HOHAUS, C. et al. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. *Spine*, Vol. 17 Suppl 4, pp. 492-503 (2008).
- ASSIETTI, R. et al. Treatment of discogenic low back pain with Intradiscal Electrothermal Therapy (IDET): 24 months follow-up in 50 consecutive patients. *Acta Neurochir Suppl.* 108:103-5 (2006).
- APPLEBY, D. et al. Meta-analysis of the efficacy and safety of intradiscal electrothermal therapy (IDET). *Pain Med.* 7(4):308-16. Review (2006).
- Fairbank, J. C. T. et al. The Oswestry Disability Index. *Spine: Volume 25 - Issue 22 - pp 2940-2953* (2000).
- COWAN, C. A. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med.* v. 350, n. 13, p. 1353-1356 (2004).
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, v. 292, n. 5819, p. 154-156 (1981).
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315-317 (2006).
- WAGERS, A. J. & WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v. 116, n. 5, p. 639-648 (2004).
- HOLDEN, C. & VOGEL, G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? *Science*, v. 296, n. 5576, p. 2126-2129 (2002).
- TILL, J. E. & MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, v. 14, p. 213-222 (1961).
- AGGARWAL, S. & PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, v. 105, n. 4, p. 1815-1822 (2005).
- BARRY, F. P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, v. 69, n. 3, p. 250-256 (2003).
- MIZUNO, N. et al. Humoral factors released from human periodontal ligament cells influence calcification and proliferation in human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*, v. 79, n. 12, p. 2361-2370 (2008).
- CORIC, D. et al. Prospective study of disc repair with allogeneic chondrocytes presented at the 2012 Joint Spine Section Meeting. *J Neurosurg Spine*, Vol. 18, pp. 85-95 (2013).
- HEE, H. T. et al. Effects of implantation of bone marrow mesenchymal stem cells, disc distraction and combined therapy on reversing degeneration of the intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Br*, Vol. 92, pp. 726-736 (2010).
- HUANG, B. et al. Regeneration of the intervertebral disc with nucleus pulposus cell-seeded collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer constructs in a rabbit disc degeneration model. *Spine (Phila Pa 1976)*, Vol. 36, pp. 2252-2259 (2011).
- SATO, M. et al. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method. *Spine (Phila Pa 1976)*, Vol. 28, pp. 548-553 (2003).
- YI, Q. et al. Research development of tissue-engineering in intervertebral disc anulus fibrosus. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, Vol. 28, pp. 627-631 (2011).
- CHUN, H. et al. Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs. 3-4, 2012, *World Neurosurg*, Vol. 78, pp. 364-371.
- PFIRRMANN, C. W. et al. Magnetic resonance classification of lumbar

- intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, Vol. 26, pp. 1873-1878 (2001).
24. TAMANINI, J. T. N. et al. Validação para o português do "International Consultation on Incontinence Questionnaire - ShortForm" (ICIQ-SF). *Rev. Saúde Pública* vol.38 no.3 São Paulo June 2004.
 25. WARE J. E. Jr et al. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*. Jun;30(6):473-83 (1992).
 26. HJERMSTAD, M. J. et al. European Palliative Care Research Collaborative (EPCRC). Studies comparing Numerical Rating Scales, Verbal Rating Scales, and Visual Analogue Scales for assessment of pain intensity in adults: a systematic literature review. *J Pain Symptom Manage*. Jun;41(6):1073-93. doi: 10.1016 / j.jpainsymman.2010.08.016 (2011)
 27. HAWKER, G. A. et al. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis Care & Research* 63: S240-S252 (2011).
 28. ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.
 29. GÜVEN, S. et al. Validation of an automated procedure to isolate human adipose tissue-derived cells by using the Sepax® technology. *Tissue Eng Part C Methods*, Vol. 18, pp. 575-582 (2012).
 30. TSUMURAYA, T. et al. Human mesenchymal stem/stromal cells suppress spinal inflammation in mice with contribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Journal of Neuroinflammation* 12:35 (2015).
 31. MARFIA, G. et al. Potential use of human adipose mesenchymal stromal cells for intervertebral disc regeneration: a preliminary study on biglycan-deficient murine model of chronic disc degeneration. *Arthritis Research & Therapy* 16:457 (2014).
 32. ADLER, S. C. et al. Enhancing wound healing with growth factors. *Facial Plast Surg Clin N Am* 10 129-146 (2002).
 33. KLEIN, C. P. et al. Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 509-513, out./dez. (2011).
 34. MAGALON, J. et al. Characterization and Comparison of 5 Platelet-Rich Plasma Preparations in a Single-Donor Model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol 30, No 5 (May): pp 629-638 (2014).
 35. FREITAS, E. C. G. A (R). Evolução do Disco. *Revista da Associação Médica Fluminense* Ano VII-nº27- jan/fev (2007).