

FABIO ANTONIO VIEIRA

**RESPOSTA METABÓLICA DAS CÉLULAS DO
NÚCLEO PULPOSO BOVINO EM DIFERENTES
COMBINAÇÕES DE PRESSÃO HIDROSTÁTICA E
OSMÓTICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2020

FABIO ANTONIO VIEIRA

**RESPOSTA METABÓLICA DAS CÉLULAS DO
NÚCLEO PULPOSO BOVINO EM DIFERENTES
COMBINAÇÕES DE PRESSÃO HIDROSTÁTICA E
OSMÓTICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira
Co-orientadores: Prof. Dr. Eduardo Barros Puertas
Prof. Dr. Alfredo Gagnani Filho
Co-orientadores Internacionais: Dr. James D. Kang
Shuichi Mizuno

São Paulo
2020

Vieira, Fabio Antonio

Resposta Metabólica Das Células Do Núcleo Pulposo Bovino Em Diferentes Combinações De Pressão Hidrostática E Osmótica/ Fabio Antonio Vieira--São Paulo, 2020.

XV, 83f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: The metabolic turnover of the bovine nucleus pulposus cells in different combinations of hydrostatic and osmotic pressure.

Palavras-chave: 1. Núcleo Pulposo 2. Pressão Hidrostática 3. Pressão Osmótica. 4. Medicina Regenerativa 5. Terapia Celular



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIRURGIA TRANSLACIONAL
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Coordenadora: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

Vice Cordenador: Prof. Dr. Alfredo Gagnani Filho

ORIENTADOR: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

CO-ORIENTADORES: Prof. Dr. Eduardo Barros Puertas

Prof. Dr. Alfredo Gagnani Filho

CO-ORIENTADORES INTERNACIONAIS: Dr. James D. Kang

Shichi Mizuno

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Rosalia Thereza De
Oliveira Gabriel, e ao meu pai,
Antonio Vieira Sobrinho (in
memoriam),

Por sempre me guiarem na direção
correta e me darem força para poder
conquistar meus objetivos.

À minha noiva, Carolina Pereira
Mendes,

Pelo amor, paciência e carinho em
todos os momentos.

Aos meus irmãos,
que sempre me apoiaram e serviram
de base para o meu caráter

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Prof^ª. Dra. **Lydia Masako Ferreira**, Professora Titular Livre-Docente do Departamento de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela seriedade que encara a pesquisa e pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao co-orientador, Prof. Dr. **Eduardo Barros Puertas**, Professor Titular Livre-Docente do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, por todos os ensinamentos, conselhos e pela paciência e amizade em todos os momentos.

Ao co-orientador, Prof. Dr. **Alfredo Gragnani Filho**, Professor Associado Livre-Docente do Departamento de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela colaboração inestimável, pelas proveitosas discussões e pelo apoio constante na elaboração dessa tese.

Ao Prof. Dr. **James D. Kang**, Professor Titular e Chefe do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da “Harvard University” e ao Prof. Dr. **Shuichi Mizuno**, Professor Associado do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da “Harvard University”, pelo acolhimento, pelas idéias e estruturação deste estudo.

Ao Dr. **Renato Hiroshi Salvioni Ueta**, Chefe do Grupo de Patologias da Coluna Vertebral do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelo constante apoio desde o início dessa jornada, pela grande amizade e confiança construída.

Ao Prof. Dr. **Luiz Felipe Morlin Ambra**, Membro do Grupo de Joelho & Artroscopia do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela apresentação junto aos colaboradores internacionais, fundamental para o início desse trabalho.

A **Roseli Nazaré Pereira Paschoa**, Secretária da Pós-Graduação do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelos conselhos e pela presteza admirável em administrar as inúmeras questões burocráticas.

À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Ensino Superior, pelo apoio financeiro como bolsista de doutorado sanduíche.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS.....	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT.....	XV
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO.....	7
3 LITERATURA.....	9
4 MÉTODO.....	21
4.1 Desenho do estudo	22
4.2 Isolamento das células do NP	22
4.3 Preparação da membrana semipermeável.....	23
4.4 Divisão dos grupos.....	24
4.5 Viabilidade celular.....	26
4.6 Avaliação da expressão gênica.....	27
4.7 Avaliação imunohistológica.....	29
4.8 Análise de dados.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Viabilidade celular.....	32
5.2 Expressão gênica em resposta aos regimes de PO e PH.....	32
5.3 Imunohistologia.....	38
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO	57
8 REFERÊNCIAS	59

NORMAS ADOTADAS.....	77
ANEXO.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Remoção do núcleo pulposo no disco intervertebral bovino com auxílio de lâminas cirúrgicas	23
Figura 2 – Preparação da membrana semipermeável	24
Figura 3 – Distribuição dos grupos conforme protocolos de pressão hidrostática e osmótica	25
Figura 4 – Câmara resistente a pressão acoplada ao biorreator	26
Figura 5 – Fluorescência para identificação da viabilidade das células do núcleo pulposo no 18º dia	32
Figura 6 – Quantidade relativa da expressão gênica de moléculas anabólicas do núcleo pulposo	33
Figura 7 – Quantidade relativa da expressão gênica de moléculas catabólicas do núcleo pulposo	35
Figura 8 – Quantidade relativa da expressão gênica de moléculas fenotípicas do núcleo pulposo	37
Figura 9 – Imunohistologia do sulfato de queratina (KS).....	39
Figura 10 – Imunohistologia do colágeno tipo II (COL-2)	40
Figura 11 – Imunohistologia do colágeno tipo I (COL-1)	41
Figura 12 - Imunohistologia da metaloproteinase-13 (MMP-13)	42
Figura 13 – Imunohistologia do antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA)	43

Figura 14 – Efeito dos protocolos de PH e PO no metabolismo das células do NP bovino após 18 dias (6 repetições)..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

°	Grau
%	Por cento
AF	Ânulo fibroso
ANOVA	Análise de variância de medidas repetidas
Atm	Atmosfera
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
cm	Centímetro
DIV	Disco intervertebral
EPM	Escola Paulista de Medicina
et al.	E outros
EUA	Estados Unidos da América
Hz	Hertz
Inc	<i>Incorporation</i> (corporação)
kg	Quilograma
kPa	Quilopascal
L4	Quarta vértebra lombar
L5	Quinta vértebra lombar
MA	Massachusetts
MEC	Matriz extracelular
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinases de matriz
mOsm	Milosmol
MPa	Megapascal

N	Newton
NP	Núcleo pulposo
p	Probabilidade de significância
PA	Pressão atmosférica
PG	Proteoglicanos
pH	Potencial hidrogeniônico
PH	Pressão hidrostática
PI	Pressão intradiscal
PO	Pressão osmótica
PT	Placa terminal
R ²	coeficiente de determinação
s-GAG	Glicosaminoglicanos sulfatados
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USA	<i>United States of America</i>
vs.	Versus

RESUMO

Introdução: Dor lombar apresenta uma alta prevalência na população mundial e é responsável por um dos maiores gastos com saúde pública no mundo, sendo uma das suas principais causas a degeneração do disco intervertebral (DIV). Os tratamentos atuais não são capazes de restaurar as funções normais do DIV, uma vez que sua degeneração é um processo irreversível. Por esse motivo, existe um crescente interesse em terapias regenerativas para o núcleo pulposo (NP). **Objetivo:** Avaliar a resposta metabólica das células do núcleo pulposo em diferentes combinações de pressão hidrostática (PH) e osmótica (PO). **Método:** Células do NP foram extraídas dos DIV de bovinos e cultivadas em um biorreator utilizando-se uma membrana semipermeável em 6 diferentes regimes de PH e PO por 18 dias. Grupo 1: pressão atmosférica (PA) em um meio com PO baixa; Grupo 2: PA em um meio com PO alta; Grupo 3: PH cíclica por dois dias em um meio com alta PO seguido de uma PH constante na mesma PO; Grupo 4: PH cíclica por dois dias em um meio com alta PO seguido de uma PH constante em um meio com baixa PO; Grupo 5: PH constante em um meio com alta PO; Grupo 6: PH cíclica em um meio com alta PO. Durante o experimento foi avaliada a expressão gênica e imunohistoquímica de moléculas anabólicas, catabólicas e de características fenotípicas. **Resultado:** O Grupo 3 apresentou um aumento significativo da expressão gênica de moléculas anabólicas e uma redução de moléculas catabólicas, preservando a síntese de substâncias que caracterizam a célula e mantendo seu fenótipo. Os resultados da imunohistoquímica foram consistentes com esses achados. **Conclusão:** A repetição dos regimes cíclicos e constantes de PH em um meio hiperosmolar aumenta a resposta metabólica anabólica e mantém o fenótipo das células do

NP bovino, enquanto suprime as respostas catabólicas com o tempo, com consequente acúmulo de MEC.

ABSTRACT

Background: Low back pain has a high prevalence in the world population and it generate a significant economic burden on the health care system, one of its main causes is the degeneration of intervertebral disc. Current first-line treatment approaches are not able to restore normal intervertebral disc function since the degeneration is an irreversible process. For this reason, there is a growing interest in regenerative therapies for the nucleus pulposus (NP). **Purpose:** To analyze the metabolic turnover of the NP cells in different combinations of hydrostatic pressure (HP) and osmotic pressure (OP). **Methods:** NP cells were harvested from bovine intervertebral disc (IVD) and seeded within a semipermeable membrane pouch. The pouches were placed in a bioreactor under six different combinations of HP and OP for 18 days. Group 1: Atmospheric pressure (AP) in low osmotic pressure (LOP); Group 2 : AP in a high osmotic pressure (HOP); Group 3: cyclic HP for two days in HOP followed by constant HP for 1 day in HOP; Group 4: cyclic HP in HOP for 2 days followed by constant HP in LOP for 1 day; Group 5: constant HP in HOP; Group 6: cyclic HP in HOP. During the experiment it was evaluated regenerative and anabolic turnover, degenerative and catabolic turnover, and the characteristics of NP cells via relevant gene expression and immunohistology. **Results:** Group 3 increased significantly anabolic gene expression, suppressed catabolic genes and sustained cellular characteristic genes. Immunohistological staining was consistent with gene expression. **Conclusion:** A repetitive regimen of cyclic and constant HP in HOP increased upregulation of anabolic/regenerative and phenotypic molecules in NP, while suppressing catabolic/degenerative molecules with time forming NP extracellular matrix.

1 INTRODUÇÃO

Dor lombar é responsável por um dos maiores gastos com saúde pública no mundo (BOSWELL *et al.*, 2007). Aproximadamente 60 a 80 % da população mundial vai apresentar essa queixa durante a vida (SHEKELLE, MARKOVICH, LOUIE, 1995; DEGENAIS, CARO, HALDEMAN, 2008), correspondendo à segunda maior procura ao serviço de pronto atendimento e à quinta maior causa de internação hospitalar (GUO *et al.*, 1999; HOY *et al.*, 2010). Uma grande parcela dos casos de dor lombar pode ser atribuída a degeneração do disco intervertebral (DIV), afetando diretamente a qualidade de vida e trabalho desses pacientes (JUNIPER, LE, MLADSI, 2009).

O DIV é uma estrutura interposta entre os corpos vertebrais, que tem como principal função absorver e transmitir as cargas compressivas, enquanto permite o movimento poliaxial da coluna (OXLAND, 2016). O DIV é constituído pelo núcleo pulposo (NP), massa semifluida de material gelatinoso, composta por 70-90% de água, que está contido pelo ânulo fibroso (AF), formado por 12 lamelas concêntricas de fibras de colágeno. O NP e AF são separados do corpo vertebral por uma fina camada de cartilagem hialina chamada de placa terminal (PT) (CS-SZABO *et al.*, 2002). Os discos são as maiores estruturas avasculares no corpo e dependem de difusão a partir de uma rede de vasos sanguíneos nas PT para a sua nutrição (WONG *et al.*, 2019).

O NP é composto por uma complexa matriz extracelular (MEC) no qual residem as células (RISBUD & SHAPIRO, 2014). No embrião, essas células são derivadas da notocorda; porém, após o nascimento, existe uma gradativa substituição por pequenas células arredondadas semelhantes a condrócitos (PAZZAGLIA, SALISBURY, BYERS, 1989; SIVE *et al.*, 2002; SCAAL, 2016). A densidade celular do NP no adulto é baixa, correspondendo a menos de 1% do volume total (LIEBSCHER *et al.*, 2011),

sendo estas células expostas a um ambiente hostil, com um baixo pH, hipóxia, baixa concentração de nutrientes, alta pressão osmolar (PO) e pressão hidrostática (PH).

A homeostase no DIV é governada pela interação entre as células do NP com a MEC, composta primariamente por colágeno tipo II, ácido hialurônico e proteoglicanos (PG) ricos em glicosaminoglicanos sulfatados (s-GAG), como o agrecano (ANDERSON, 2005; WUERTZ, URBAN, KLASSEN, 2007). Uma alta concentração de cargas negativas nos s-GAG permite que o NP atraia íons de sódio e água, resultando em uma elevada concentração osmolar comparada aos tecidos adjacentes (JOHNSON, SHAPIRO, RISBUD, 2014; SILAGI, SHAPIRO, RISBUD, 2018). Durante o processo de degeneração do DIV, existe uma troca de colágeno tipo II pelo colágeno tipo I e uma mudança na estrutura dos s-GAG (ROUGHLEY, ALINI, ANTONIOU, 2002; GRUBER *et al.*, 2011). Este fenômeno leva a formação de moléculas de agrecano com uma menor quantidade de sulfato de condroitina, resultando em uma menor hidratação, osmolaridade e consequente sobrecarga do AF (WALKER & ANDERSON, 2004; ADAMS & ROUGHLEY, 2006).

A degeneração do DIV é um processo irreversível devido à baixa celularidade e potencial regenerativo do NP (ALVIN, QURESHI, KLINEBERG, 2014; RISBUD & SHAPIRO, 2014). Atualmente, a primeira linha de tratamento é direcionada ao controle da dor com analgésico e fisioterapia. Pacientes em estágio avançado e dor refratária ao tratamento clínico são tratados cirurgicamente através de discectomia, artrodese ou artroplastia (SNIDER *et al.*, 1999; MAKHNI *et al.*, 2016). Contudo, essas intervenções não conseguem restaurar as funções normais do DIV, reduzindo a flexibilidade da coluna e potencialmente acelerando o processo

degenerativo nos DIV adjacentes (ALENTADO *et al.*, 2016; SENTELER *et al.*, 2017). Por esse motivo, existe um crescente interesse em terapias regenerativas para o NP. A terapia celular tem o potencial de regenerar o DIV, restaurando as suas propriedades biomecânica e bioquímica através da síntese de um novo NP, proporcionando o alívio da dor (THORPE, LI, YAO, 2016; SAKAI & SCHOL, 2017; SMITH *et al.*, 2018). Porém, a translação de um meio de cultura *in vitro* para o ambiente *in vivo* tem se mostrado difícil, as células transplantadas em muitos casos não conseguem manter as características fenotípicas pré-implante (DE BARI, DELL'ACCIO, LUYTEN, 2004; DICKHUT *et al.*, 2009; VINARDELL *et al.*, 2012; PRIYADARSHANI, LI, YAO, 2016). O desenvolvimento de uma estratégia pré-cultura que permita uma produção de MEC adequada *in vitro* e que se perpetue para o transplante *in vivo* é crítica para translação clínica.

Para o desenvolvimento de terapias celulares no tratamento da degeneração do DIV é importante entender o mecanismo que mantém a homeostase no NP nos diferentes movimentos da coluna durante o dia (TYRRELL, REILLY, TROUP, 1985; HASCHTMANN, STOYANOV, FERGUSON, 2006; CHAN *et al.*, 2011). As estratégias mais atuais utilizam o implante terapêutico de células, que são capazes de produzir MEC típica dentro do espaço criado no DIV, após remoção do NP degenerado, levando, em última análise, à regeneração do NP (DETIGER *et al.*, 2016; ROSENZWEIG *et al.*, 2018). Um importante elemento desta estratégia é que as células implantadas são expostas a um estresse compressivo dinâmico: PH e pressão intradiscal (PI) (SATO, KIKUCHI, YONEZAWA, 1999; WILKE, NEEF, CAIMI, 1999). Essas forças sofrem variações durante o dia dependendo da atividade e posição da coluna, magnitudes fisiológicas de PH variam entre 0,2-3 MPa (WILKE *et al.*, 2003). Não existe um consenso de

qual melhor protocolo de PH deve ser utilizado para uma máxima síntese de MEC *in vitro*. Em geral é aceito que cargas entre 0,1- 1 MPa, aplicadas em uma frequência de 0,1-1 Hz, apresentam uma resposta anabólica nas células do NP (CHAN, FERGUSON, GANTENBEIN-RITTER, 2011; GAO *et al.*, 2018; SHAH & CHAHINE, 2018), enquanto cargas hiperfisiológicas entre 3-10 MPa, aplicadas em uma frequência maior que 1 Hz, apresentam resposta catabólica com aumento de metaloproteinases de matriz (MMP) e consequente destruição da MEC (CHAN, FERGUSON, GANTENBEIN-RITTER, 2011; LI *et al.*, 2017).

Preservar a máxima expressão de MEC nas células do NP durante a cultura é essencial para maximizar a efetividade da terapia celular. Por esse motivo, os biorreatores são utilizados para simular o ambiente físico-químico do NP (MIZUNO, 2011; MABVUURE, HINDOCHA, KHAN, 2012). As células do NP experienciam uma variação da PO conforme mudanças nas cargas através do ciclo diurno (HASCHEMANN, STOYANOV, FERGUSON, 2006; WUERTZ, URBAN, KLASSEN, 2007). Durante o dia, as cargas mecânicas compressivas aumentam a PI levando a um efluxo de água do NP. Por outro lado, durante o repouso em posição supina, existe uma diminuição da PI, ocorrendo um influxo de água para o NP devido a sua maior osmolaridade (AYOTTE, ITO, TEPIC, 2001; VERGROESEN *et al.*, 2016). A PO mantém a hidratação do NP e previne um completo colapso do DIV (VERGROESEN *et al.*, 2018). Estudos preliminares demonstraram que as células do NP apresentam uma máxima síntese de PG em uma PO entre 430-450 mOsm (CHEN *et al.*, 2002; URBAN, 2002). Valores diferentes de PO apresentam uma resposta catabólica nas células do NP.

Um entendimento mais amplo de como as células do NP reagem às interações entre as variações de PH e PO com relação à proliferação celular, expressão gênica e produção de MEC é crucial quando se planeja desenvolver uma terapia celular adequada para o tratamento da degeneração do DIV. Em seu estudo, MIZUNO, KASHIWA, KANG (2019) avaliaram a variação do metabolismo de células do NP de bovinos em resposta a mudanças na PH e PO em 12 diferentes combinações. As células do NP apresentaram um aumento na expressão de moléculas anabólicas em resposta a mudanças cíclicas na PH em um meio de alta PO (450 mOsm). Contudo, pelo curto tempo do experimento, não foi possível observar uma resposta na deposição dessas moléculas na MEC nos cortes histológicos. Para explicar melhor esses resultados, procurou-se reproduzir o anabolismo das células do NP expostas a repetitivas variações na PH e PO por um período mais prolongado. A hipótese deste estudo é que um regime com alternância entre PH cíclica e constante associada a uma PO alta possa simular os movimentos diários da coluna e reproduzir o anabolismo nas células do NP.

2 OBJETIVO

Objetivo

Avaliar a resposta metabólica das células do núcleo pulposo bovino em diferentes combinações de pressão hidrostática e osmótica.

3 LITERATURA

HANDA *et al.* (1997) realizaram um estudo experimental com 28 DIV humanos provenientes de cirurgias ou autópsias para analisar os efeitos da PH na síntese de MEC e na produção de proteínas catabólicas. As células foram divididas em 3 grupos: 1 atm (controle), 3 atm e 30 atm por um período de 2 h/dia. A produção de proteínas anabólicas e catabólicas foram avaliadas através de imunofluorescência. Comparado com o controle, o grupo exposto a uma pressão de 30 atm apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na síntese de PG e um aumento na produção de proteínas catabólicas. Já quando as células foram expostas a 3 atm, houve um aumento na produção de PG. Os autores concluíram que uma PH fisiológica (3 atm) é um estímulo essencial para manter a produção de MEC; por outro lado, PH baixa ou alta pode levar a degeneração do DIV.

SATO, KIKUCHI, YONEZAWA (1999) realizaram um estudo experimental em humanos para medir a PI em indivíduos saudáveis e em pacientes com dor lombar e analisar a influência da degeneração do DIV na sua pressão interna. Foram avaliados 8 pacientes saudáveis e 28 pacientes com dor lombar, para medir a PI utilizou-se um sensor que foi inserido no DIV L4-L5 de forma percutânea com anestesia local e auxílio da fluoroscopia. A pressão foi aferida em diferentes posições e movimentos da coluna. A PI apresentou-se inversamente reduzida ao grau de degeneração encontrada na ressonância magnética (RM). As forças aumentaram conforme algumas posições: prona (91kPa), lateral (151 kPa), em pé (539 kPa) e sentado (624 kPa). Quando realizado o movimento de flexão da coluna em pé, obteve-se o maior aumento da PI (1324 kPa). Os autores concluíram que a PI depende da posição da coluna e em indivíduos com degeneração do DIV é menor que em indivíduos saudáveis.

HUTTON *et al.* (2001) realizaram um estudo experimental em células provenientes do DIV de cães para avaliar se a PH pode diretamente afetar a síntese de colágeno e PG. As células foram cultivadas em alginato por 9 dias dentro de seringas de metal sendo divididas em dois grupos: um grupo foi submetido a PH de 0,35 MPa e o outro grupo mantido em PA (0,1 MPa). A síntese de PG foi inibida quando exposta a PH nas células do NP e AF comparada com a PA. Já a produção de colágeno foi estimulada pela PH nas células do NP e inibida nas células do AF. Houve um aumento na expressão gênica de colágeno e agrecano no NP e uma diminuição no AF. Os autores concluíram que a PH afeta diretamente a síntese de colágeno e PG nas células do DIV.

CHEN *et al.* (2002) realizaram um estudo experimental em células do NP e AF de suínos para avaliar a expressão gênica de proteínas da MEC em diferentes osmolaridades: meio hiposmótico (255 mOsm), isosmótico (293 mOsm) e hiperosmótico (450 mOsm). Em condições hiposmóticas, as células do AF apresentaram aumento na expressão de agrecano e colágeno tipo 2; por outro lado, as células do NP não apresentaram mudança na expressão gênica. O meio hiperosmolar não levou à alteração da expressão gênica de ambas as células do NP e AF. Os autores concluíram que a PO pode regular a síntese de moléculas da MEC a nível transcricional.

CS-SZABO *et al.* (2002) realizaram um estudo experimental com 34 DIVs de humanos provenientes de cirurgias por doenças degenerativas e cirurgias de escoliose. Os discos foram classificados conforme o grau de degeneração utilizando os achados da ressonância magnética. Utilizaram amostras do NP e AF para avaliar a concentração de PG e sua expressão gênica. No AF a concentração de PG estava aumentada nos estágios iniciais de degeneração

do DIV, apresentando diminuição somente em estágios avançados de degeneração. Em contraste, o NP apresentou uma constante diminuição na concentração de PG mesmo em estágios iniciais da degeneração do DIV. Os autores concluíram que as células do NP e AF apresentam diferente resposta ao processo degenerativo, sendo as células do NP mais vulneráveis do que as do AF.

SIVE *et al.* (2002) realizaram um estudo experimental para investigar o fenótipo das células de DIV normais e degenerados, através da análise de moléculas características destas células. Células do DIV de humanos foram obtidas por cirurgia e graduadas conforme o grau de degeneração visto na RM. Foram avaliados os genes Sox9, colágeno tipo 2 e agrecano. Nos discos normais foi encontrado uma grande concentração de Sox9, colágeno tipo 2 e agrecano nas células do NP e uma baixa ou ausente concentração nas células do AF. Nos discos degenerados, as concentrações de Sox9 e colágeno tipo 2 mantiveram-se elevadas nas células do NP e ausentes no AF e a concentração de agrecano ausente no NP e AF. Os autores concluíram que as células do NP saudável apresentam a presença dos três marcadores fenotípicos. Quando degenerado perde a síntese de agrecano, o que pode contribuir com a patogênese da degeneração do DIV.

HASCHTMANN, STOYANOV, FERGUSON (2006) realizaram um estudo experimental com DIV de coelho para avaliar os efeitos da variação da PO por 28 dias na viabilidade celular, produção de MEC e expressão gênica. Os DIV foram divididos em dois grupos: grupo controle, onde os DIV permaneceram em um meio isosmolar (335 mOsm), e grupo teste, onde os DIV eram submetidos a uma troca da osmolaridade, 8 horas em um meio isosmolar e 16 horas em um meio hiperosmolar (485 mOsm). Não houve

diferença estatística entre os grupos em relação a viabilidade celular, concentração de proteoglicanos e DNA. O meio hiperosmótico levou um aumento na expressão de colágeno tipo I, já o colágeno tipo II não respondeu à variação da PO, permanecendo com uma baixa expressão gênica nos dois grupos. Os autores concluíram que um estímulo hiperosmótico em um DIV de coelho inibiu a produção de MEC.

KASRA *et al.* (2006) realizaram um estudo experimental com células provenientes do NP e parte interna do AF de suínos para avaliar a resposta de diferentes frequências de PH na cascata degenerativa. As células foram cultivadas em um substrato de alginato por 3 dias e divididas em 6 grupos conforme a frequência cíclica da PH: controle (sem PH) 1, 3, 5, 8 e 10 Hz (1 MPa). As células foram expostas a PH por 30 min/dia utilizando-se de um biorreator. Para análise dos resultados utilizou-se a incorporação de H-prolina nas moléculas de colágeno e PG. Os resultados demonstraram uma pior incorporação proteica e maior destruição de MEC quando as células foram expostas a uma frequência de 5 Hz.

VAN DIJK, POTIER, ITO (2011) realizaram um estudo experimental para avaliar o efeito da osmolaridade do meio em explantes de NP provenientes de bovinos. Os NP foram cultivados por 21 dias em condições hipo-, iso- ou hiperosmolar. Realizou-se análise bioquímica, viabilidade celular, expressão gênica, histologia comparados com o dia 0 (controle). Quando utilizado polietilenoglicol para aumentar a osmolaridade do meio, os NP mantiveram-se hidratados, mantendo as concentrações de PG e características histológicas semelhantes ao controle. Em meio hipotônico ou isotônico as células perderam suas características iniciais. Os autores concluíram que polietilenoglicol é eficaz para aumentar a PO, mantendo a composição de

MEC do DIV.

WALTER *et al.* (2011) realizaram um estudo experimental com DIV proveniente de bovinos para analisar o efeito da carga axial assimétrica no processo degenerativo. Os DIV foram divididos em dois grupos: controle, as amostras foram submetidas a uma carga uniforme por 7 dias e grupo teste, onde uma carga assimétrica de 15° foi aplicada por 7 dias. A resposta tecidual e celular foi avaliada através da pressão intradiscal, expressão gênica e histologia. A compressão assimétrica induziu a morte celular e a perda de agregado no lado de maior compressão; no lado de menor compressão houve um aumento na expressão de metaloproteinases e interleucinas. Os autores concluíram que uma compressão assimétrica teve um efeito deletério direto, levando a efeitos que podem culminar com a cascata degenerativa.

NEIDLINGER-WILKE MIETSCH, RINKLER (2012) realizaram um estudo experimental com células provenientes de NP de bovinos. As células foram cultivadas em um substrato de alginato por 3 dias em diferentes condições. Foram analisadas diferentes concentrações de glicose (0; 0,5 mM; 5 mM), PO (300 mOsm, 400 mOsm e 500 mOsm), pH (6,5; 6,8 e 7,2), concentrações de oxigênio (1%, 6% e 21%) e PH (0,1 MPa e 2,5 MPa). Foi avaliado a viabilidade celular, expressão gênica e concentração de GAG. Os melhores resultados foram encontrados quando utilizadas condições com baixa concentração de glicose e pH. A concentração de oxigênio teve pouca influência no resultado. PH teve uma função importante de proteção contra os efeitos nocivos de algumas condições. Os autores concluíram que as condições que simulam um processo degenerativo têm um impacto direto na

formação e degradação de MEC, enquanto a adição de PH pode prevenir esse processo.

CHAN *et al.* (2013) realizaram um estudo experimental em DIV bovinos para avaliar diferentes combinações de forças de compressão dinâmicas e torsionais. Os DIV foram divididos em quatro grupos: controle (sem carga), compressão cíclica, torção cíclica e a combinação de compressão e torção (CCT). As forças foram aplicadas por um biorreator por 8 h/dia em um total de 14 dias. No grupo CCT somente 10% das células do NP sobreviveram após 14 dias, nos demais grupos mais de 70% das células do NP sobreviveram por 14 dias. A análise da expressão gênica mostrou um aumento importante na produção de genes de remodelamento da MEC no grupo CCT. Os autores concluíram que as células do NP são sensíveis a cargas complexas e as células do AF apresentam resistência, levando a uma resposta de remodelamento da MEC.

VERGROESEN *et al.* (2014) realizaram um estudo experimental com 15 DIV de caprinos para avaliar a relação da PI e as mudanças das cargas axiais, simulando um regime fisiológico. Os DIV foram removidos com uma camada de 5 mm do corpo vertebral de cada lado e introduzido um transdutor de pressão no NP. Para realizar o teste biomecânico, os DIV foram submetidos a um protocolo de alternância entre uma baixa carga (50N) e uma alta carga (130N) em um total de 4 horas e meia. Cada disco apresentou uma relação linear entre a carga axial e a pressão intradiscal ($R^2 = 0,91$). Durante a fase de alta carga, a altura do disco e a PI diminuíram e durante a fase de baixa carga ambos aumentaram. Os autores concluíram que a PI é influenciada pela carga devido ao movimento dos fluídos que são expelidos quando há grande compressão no DIV.

LI *et al.* (2016) realizaram um estudo experimental com DIVs de porcos para avaliar a magnitude, a frequência e a duração das cargas compressivas utilizando-se um biorreator. Os DIVs foram removidos da coluna lombar, mantendo a cartilagem da placa terminal. Os discos foram randomicamente divididos em diferentes protocolos de magnitude (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,3 MPa), frequência (0,1; 0,5; 1; 3; e 5 Hz) e duração (1, 2, 4 e 8 h/dia). DIVs que não foram submetidos a compressão foram usados como controle. Após 7 dias as amostras foram avaliadas para quantidade de GAG, expressão gênica, imunohistologia e viabilidade celular. Nos protocolos com 1.3 MPa, 5 Hz e 8 horas houve um aumento significativo de apoptose, expressão de genes catabólicos e diminuição da produção de GAGs. Nos demais protocolos houve uma resposta anabólica. Os autores concluíram que uma alta magnitude, frequência ou duração da compressão não são úteis para manter o DIV saudável.

WANG *et al.* (2017) realizaram um estudo experimental com células do NP provenientes de ratos para investigar o papel da molécula de N-Caderina na manutenção do fenótipo, síntese de MEC e viabilidade das células do NP expostas a cargas compressivas de alta intensidade. As células foram divididas em dois grupos: controle e grupo teste, onde foi usado um recombinante viral para aumentar a expressão de N-Caderina. As células foram cultivadas em matriz óssea descalcificada. Depois de dois dias de cultura, as células de cada grupo foram subdivididas em 3 protocolos: sem compressão, compressão com deformação de 2% e compressão com deformação de 20%, 4 horas por dia durante 5 dias. As células que foram expostas a compressão de 20% apresentaram uma diminuição significativa na expressão de N-Caderina e aumento da apoptose celular. Quando foram

analisadas as células submetidas ao recombinante viral, a expressão aumentada de N-Caderina atenuou os efeitos da compressão de 20% na biologia celular das células do NP. Os autores concluíram que a N-caderina ajuda a restaurar a viabilidade celular, a produção de MEC e o fenótipo celular.

KROUWELS *et al.* (2018) realizaram um estudo experimental com células do NP de humanos para analisar o efeito da osmolaridade, utilizando diferentes osmólitos (cloreto de sódio, uréia e sucrose) na expressão gênica e produção de MEC. As células foram obtidas de 5 cadáveres e expostas a diferentes meios de cultura: 340, 400, 450 e 500 mOsm por 28 dias. Foram avaliadas a expressão gênica de moléculas da MEC, imunohistologia e produção de GAG e colágeno tipo II. A expressão de colágeno tipo II e agrecano aumentou em meios com alta PO que utilizaram cloreto de sódio e sucrose. Porém a produção de proteínas da MEC, avaliada pela imunohistologia, não apresentou variação conforme a mudança de osmolaridade. A expressão de genes catabólicos diminuiu conforme aumento da osmolaridade. Os autores concluíram que apesar da expressão dos genes anabólicos da MEC estarem aumentados em meios com alta PO, não houve aumento na produção de proteínas da MEC. O aumento da PO não é o suficiente por si só para criar um modelo *in vitro* de regeneração do NP.

SHAH & CHAHINE (2018) realizaram um estudo experimental com células do NP de bovinos para avaliar a resposta de diferentes densidades de células expostas a PH cíclica em magnitudes fisiológicas. As células foram encapsuladas em alginato e expostas a uma PH por 2 h/dia durante 7 dias. Os autores dividiram o experimento em dois estudos. No estudo 1 foram

comparadas duas densidades celulares, 1 M/ml e 4 M/ml, utilizando-se 0 ou 0,1 MPa de PH. No estudo 2 foram comparadas diferentes PH (0; 0,1 ou 0,6) em uma concentração celular de 1 M/ml. No estudo 1, a densidade de 1 M/ml apresentou uma maior concentração de ATP, GAG e colágeno comparada a densidade de 4 M/ml ($p < 0,05$). Ainda no estudo 1, a adição de PH levou ao aumento da expressão de agrecano, colágeno tipo I, queratina tipo 19, N-caderina. No estudo 2, a expressão de agrecano aumentou conforme o aumento da PH. Os autores concluíram que a densidade celular é um fator que influencia na resposta das células do NP quando expostas a PH. Uma baixa densidade celular apresenta uma melhor atividade metabólica, produção de MEC e expressão fenotípica.

VERGROESEN *et al.* (2018) realizaram um estudo experimental com 12 DIV de caprinos para avaliar o efeito isolado da redução da PO nas propriedades biomecânicas do DIV. Os discos foram obtidos através de um corte 4 mm no corpo vertebral de tal forma que as placas vertebrais estavam presentes na peça anatômica. Os DIV foram divididos em 3 grupos conforme a concentração osmolar do meio: 285, 790 e 1300 mOsm. Uma carga fisiológica foi aplicada por 6 dias, durante 8 horas uma carga baixa de 40-60 N foi aplicada para simular o período do repouso noturno e durante 16 horas uma carga de 80-180 N foi aplicada para simular atividade diurna. Essas cargas geram uma média de PI de 0,45 e 1,05 MPa, respectivamente. Foi registrada a taxa de deformação e a recuperação diária, além da resistência a compressão e concentração de água e PG. Após 6 dias a concentração de água encontrou-se menor nas peças que foram expostas a uma alta PO, já a concentração de PG não apresentou variação conforme a PO. A deformidade axial e taxa de recuperação também apresentou uma correlação direta com a PO. Os autores concluíram que o gradiente osmótico gerado pelos PGs só

consegue explicar em parte as mudanças biomecânicas geradas pelo processo degenerativo. A permeabilidade do tecido pode ser um fator determinante no comportamento biomecânico.

XU *et al.* (2018) realizaram um estudo experimental com células provenientes de NP de ratos para avaliar a diferença entre os efeitos de uma compressão estática e dinâmica e o papel da molécula de N-caderina. Um vetor recombinante viral foi usado para silenciar a expressão de N-caderina em metade das células. As células foram colocadas em um biorreator por 10 dias e divididas em três grupos: grupo controle (sem compressão), grupo compressão estática (aplicado 10% de deformação por um período de 6h/dia) e grupo compressão dinâmica (10% de deformação em uma frequência de 1 Hz por 6h/dia). Foram avaliados a expressão gênica de moléculas da MEC e o fenótipo celular. A compressão dinâmica manteve uma maior expressão de marcadores celulares específicos das células do NP e de moléculas da MEC. Quando utilizado o recombinante viral para silenciar a expressão de N-Caderina, houve uma diminuição na expressão desses genes. Os autores concluíram que a compressão dinâmica aumenta a síntese de MEC e que a molécula de N-caderina está envolvida na regulação desse processo.

MIZUNO, KASHIWA, KANG (2019) realizaram um estudo experimental com células provenientes do NP de bovinos. Os autores avaliaram a resposta das células em diferentes combinações de PH e PO por 7 dias. Um total de 12 combinações foram avaliadas através da expressão gênica e imunohistologia. Uma combinação de PH cíclica (0,5 MPa e 0,5 Hz) em um meio com alta PO (450 mOsm) apresentou os melhores resultados com um aumento na expressão de moléculas anabólicas (agrecano e colágeno tipo II). Quando utilizada alta PO nos estudos imunohistoquímicos, observou-se a

formação de grandes espaços vazios na MEC. Os autores concluíram que a cultura em um meio com PH e alta PO tem um significativo impacto na produção da MEC.

MOUSER *et al.* (2019) realizaram um estudo experimental com células do NP de bovinos para avaliar o impacto da diminuição da osmolaridade na cascata inflamatória e início do processo degenerativo. Para variar a osmolaridade do meio foi utilizado polietilenoglicol em diferentes concentrações (0-30%). As células foram colocadas em um AF artificial que permite a manutenção da sua pressão interna, sendo cultivadas por 21 dias. Foram avaliadas as concentrações de água, GAG e colágeno tipo II, além da expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias. Amostras que permaneceram em um meio hipotônico apresentaram aumento da expressão de interleucina-8 e prostaglandina 2. Amostras que não foram colocadas dentro do AF artificial apresentaram uma resposta inflamatória mediada por Interleucina-6. Os autores concluíram que a degeneração do disco intervertebral (AF íntegro) e a hérnia de disco (AF roto) são mediadas por diferentes processos inflamatórios

4 MÉTODO

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo primário, intervencional, pesquisa experimental *in vitro*, analítico e autocontrolado. Este estudo foi realizado no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em colaboração internacional com a Universidade de Harvard, EUA, com (Bolsa de estudo CAPES, 88881.189091/2018-01). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Ortopédica (*Orthopaedic Research Faculty*) localizado no Hospital Brigham and Women, situado em Boston, no estado de Massachusetts, nos EUA, no período entre 01/08/2018 a 31/07/2019. O estudo seguiu os preceitos ético-legais da instituição, sendo autorizado pelo responsável do laboratório, Shuichi Mizuno, antes do início dos experimentos (Anexo 1) e aprovado pelo Comitê de Ética da UNIFESP sob número do parecer: CEUA 4876030418 (Anexo 2).

4.2 Isolamento das células do NP

Foram utilizadas caudas bovinas de animais entre 2 a 3 anos, provenientes de um abatedouro com certificado local (Research 87 Inc., Boylston, MA). Os NP foram extraídos do DIV usando lâminas cirúrgicas (#15 e #22, Bard-Parkers, Aspen Surgical, Caledonia, MI) (figura 1) e enzimaticamente digeridos em colagenase estéril 0,15% (CLS-1, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) dissolvida em meio Ham's F12 (Life Technologies, Carlsbad, CA) a 37°C sobre rotação constante durante 18 horas. Após digestão, as células do NP foram enxaguadas duas vezes com solução fosfato-salina (D-PBS, Life Technologies) e implantadas em placas de cultura com 6 poços, revestidas com agarose 1,5% (Falcon, Franklin

Lakes, NJ), e incubadas com Dulbecco's Minimal Eagle Medium (DMEM)/Ham's F - 12 (1:1) com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Life Technologies) em uma temperatura de 37°C e 5% CO₂ em ar por 48 horas. Após as primeiras 24 horas de incubação foram removidos debris (matriz não digerida) com uma pipeta em visão microscópica. Esse método permite a coleta de uma grande quantidade de células do NP sem necessidade de filtros.



Figura 1 – Remoção do núcleo pulposo no disco intervertebral bovino com auxílio de lâminas cirúrgicas.

4.3 Preparação da membrana semipermeável

Foram utilizados pequenos tubos com membranas semipermeáveis de fluoreto de polivinilideno com 30mm de comprimento, área de 1,2 mm² e uma massa molecular de corte de 500 kDa (Repligen, Rancho Dominguez, CA) (Figura 2). Cada tubo foi imerso em álcool etílico 100 % por 30 minutos e após colocados na autoclave em uma temperatura 121°C por 15 minutos (MIZUNO & OGAWA, 2011; MIZUNO, KASHIWA, KANG, 2019). O

número de células em suspensão após as 48 horas de incubação foi determinado de acordo com a concentração de DNA encontrada. Foram injetadas 10^5 células de NP em cada tubo utilizando uma pipeta e selada cada uma das duas extremidades com um grampo metálico formando um compartimento fechado (figura 1A e 1B).

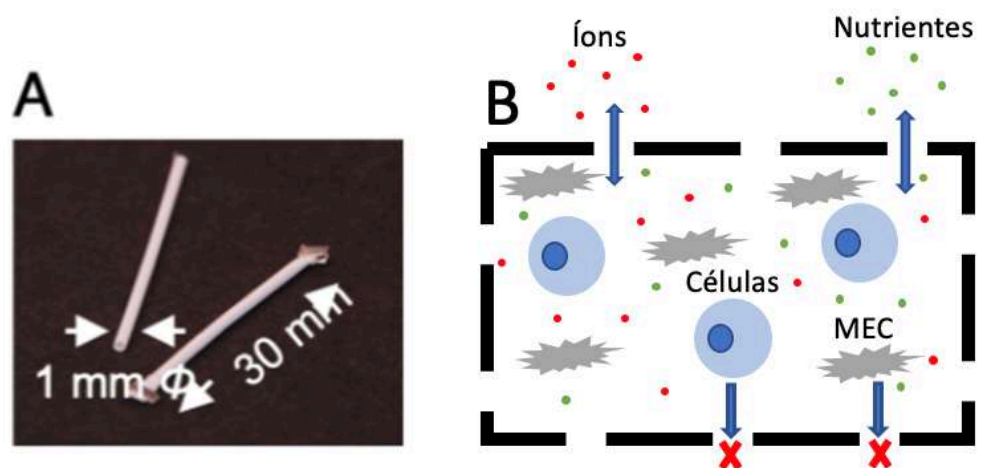


Figura 2 – Preparação da membrana semipermeável. A) Tubos de fluoreto de polivinilideno (30 mm de comprimento, área de $1,2 \text{ mm}^2$). B) Membrana semipermeável, permite a passagem de pequenas moléculas e nutrientes (<500 KD).

4.4 Divisão dos grupos

As amostras foram distribuídas em 6 grupos (figura 3). Grupo 1: pressão atmosférica (PA) em um meio com PO baixa (320 mOsm/kg H₂O) por 18 dias; Grupo 2: PA em um meio com PO alta (450 mOsm/kg) por 18 dias; Grupo 3: PH cíclica entre 0,2 – 0,7 MPa, 0,5 Hz por dois dias em um meio com alta PO seguido de uma PH constante de 0,3 MPa na mesma PO,

repetido por 6 vezes durante 18 dias; Grupo 4: PH cíclica entre 0,2 – 0,7 MPa, 0,5 Hz por dois dias em um meio com alta PO seguido de uma PH constante de 0,3 MPa em um meio de baixa PO, repetido por 6 vezes durante 18 dias; Grupo 5: PH constante de 0,3 MPa em um meio com alta PO por 18 dias; Grupo 6: PH cíclica entre 0,2 – 0,7 MPa, 0,5 Hz em um meio com alta PO por 18 dias.

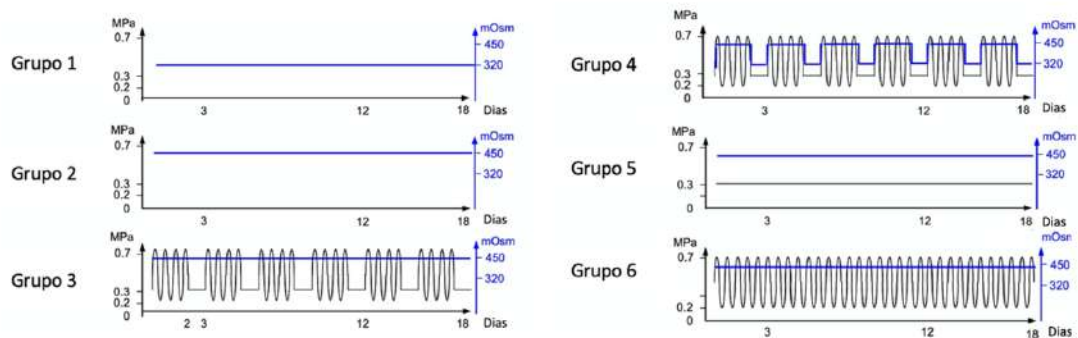


Figura 3 – Distribuição dos grupos conforme protocolos de pressão hidrostática e osmótica.

Para os grupos que utilizaram PH (Grupos 3, 4, 5 e 6), as amostras foram colocadas em uma câmara resistente a pressão, que foi instalada em um biorreator (TEP-2, PURPOSE, Shizuoka, Japan), que mantém uma circulação constante do meio de cultura em uma velocidade de 0,1 ml/min, com 3% de O₂ e 5% de CO₂, simulando as condições internas do DIV (figura 4). Para os grupos que utilizam PA (Grupos 1 e 2), as amostras foram colocadas em uma cesta de metal submersa em um recipiente com 100 ml de meio de cultura sobre um agitador a 5 rotações/segundo para manter uma taxa de transferência de nutrientes constante através da membrana semipermeável.

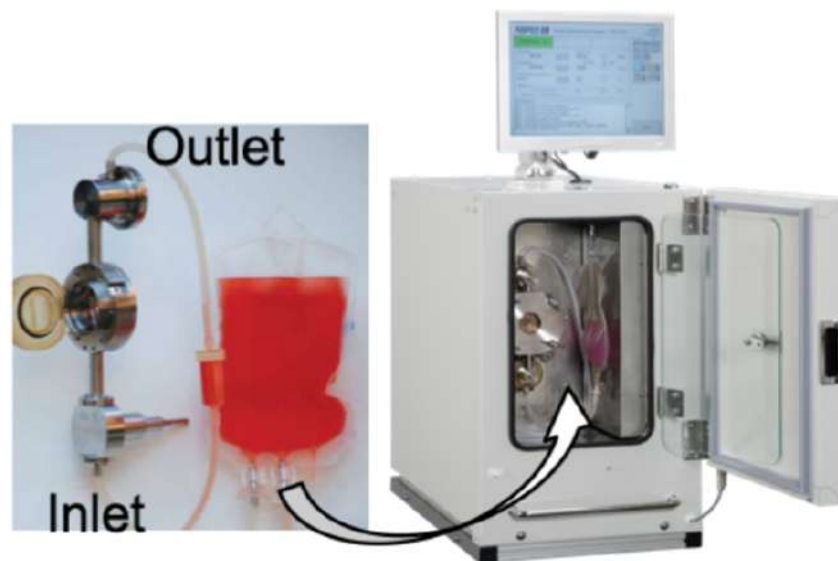


Figura 4 – Câmara resistente a pressão acoplada ao biorreator.

4.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se um indicador de fluorescência (LIVE/DEAD® Assay kit, Life Technologies) (PAPADOPOULOS *et al.*, 1994). As amostras foram enxaguadas com D-PBS e então incubadas em 1 μM de calceína para detectar as células vivas ou 2 μM de homodímero de etídeo para detectar as células mortas, por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, as células foram enxaguadas 3 vezes em D-PBS por 10 minutos e processadas para capturar a imagem. As células foram identificadas utilizando microscópio invertido com fluorescência (TMD, Nikon, Melville, NY). Para as células vivas, utilizou-se um filtro de iluminação verde (B2A) e, para as células mortas, um filtro de iluminação vermelho (G2A). As imagens foram capturadas com uma câmera ND 80 (Nikon).

4.6 Avaliação da expressão gênica

Para quantificar a expressão gênica, as células foram extraídas dos tubos de cada grupo utilizando uma solução tampão RLT contendo 1% de β -mercaptoetanol nos dias 3, 12 e 18. O RNA foi extraído das células do NP utilizando *RNeasy kit* (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A exata quantidade de RNA obtido em cada amostra foi determinada utilizando um espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) mantendo as amostras em uma temperatura de -80°C até a realização da transcrição reversa. As amostras de RNA foram amplificadas com a transcriptase reversa (*high-capacity cDNA reverse transcription kit*, Life Technology) e misturadas com os *primers* (TaqMan®, Life Technology), seguida pela análise quantitativa por qPCR (QuantStudio™, Applied Biosystems, Foster City, CA). Foi utilizado o software *Expression Suite* v 1.0.4 para converter os dados. Os *primers* escolhidos foram:

- *ACAN* (Bt03212189_m1): codifica a proteína do núcleo proteoglicano (agrecano) responsável por ligar as cadeias de sulfato de condroitina (HASCALL & HEINEGARD, 1974).
- *CSGALNACT1* (Bt03272948_m1): codifica uma enzima que alonga as cadeias de sulfato de condroitina nos proteoglicanos (ISHIMARU et al., 2014; SAKAI et al., 2007; SATO et al., 2011).
- *HAS2* (Bt03212694_g1): codifica uma enzima que sintetiza ácido hialurônico, que se liga a proteína do núcleo proteoglicano, gerando uma deposição mais estável de MEC ao redor das células do NP (ROUGHLEY et al., 2011; VIGETTI et al., 2012).

- *COL2A1* (Bt03251837_mH): codifica o colágeno tipo II, um típico marcador do anabolismo e do fenótipo das células do NP (HAYES, BENJAMIN, RALPHS, 2001).
- *COL1A1* (Bt03225358_g1): codifica o colágeno tipo I que pode estar relacionado com a formação de tecido fibrótico (NAQVI & BUCKLEY, 2015; YUAN et al., 2018).
- *MMP13* (Bt03214051_m1): codifica uma metaloproteinase de matriz que é envolvida na quebra do colágeno na MEC (LE MAITRE, FREEMONT, HOYLAND, 2004).
- *CTGF* (Bt03212492_m1): codifica uma proteína que aumenta o risco de formar tecido fibrótico (ALI et al., 2008) e de promover angiogênese (JAMES et al., 2019; TRAN, SHAPIRO, RISBUD, 2013).
- *PCNA* (Bt03211154_g1): codifica uma proteína encontrada no núcleo que é uma marcadora da proliferação das células do NP (DIETRICH, 1993).
- *CDH2* (Bt042918958_m1): codifica uma proteína que auxilia a manutenção do fenótipo normal das células do NP (HWANG et al., 2016; RISBUD et al., 2015).
- *ITGAV* (Bt04299013_g1): codifica a integrina V, uma molécula de adesão que medeia a proliferação celular e estabiliza as células na MEC (GILCHRIST et al., 2007; LE MAITRE et al., 2009; NETTLES, RICHARDSON, SETTON, 2014).
- *GAPDH*: (Bt03210919_g1): gene referência para normalização da expressão gênica (SEOL et al., 2011).

4.7 Avaliação imunohistológica

As células foram extraídas dos tubos de cada grupo nos dias 3, 12 e 18 utilizando-se solução D-PBS. As amostras foram fixadas com 2% de paraformaldeído/0,1 M solução tampão de ácido cacodílico (pH 7,4) mantidas em uma temperatura de 4°C por 48 horas. As amostras foram colocadas em parafina e cortadas em espessuras de 7 µm, sendo incubadas com os seguintes primeiros anticorpos:

- Sulfato de queratina (KS, 1:500, Seikagaku America, East Falmouth, MA): utilizado para avaliar a qualidade da deposição da rede de PGs, componente típico da MEC, ao redor das células do NP.
- Colágeno tipo I (COL-1, 1:100, Abcam, Cambridge, MA): utilizado para analisar a formação de fibrose na MEC.
- Colágeno tipo II (COL-2, 1:50, Abcam, Cambridge, MA): utilizado para avaliar a qualidade da MEC cartilaginosa do NP.
- Metaloproteinase-13 (MMP-13, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA): utilizada para avaliar áreas de degeneração na MEC.
- Antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA, 1:50, NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK): utilizado para identificar a proliferação celular e avaliar quantitativamente os núcleos corados.

Logo após, as amostras foram enxaguadas 3 vezes e incubadas com o segundo anticorpo biotinizado de acordo com as instruções do fabricante (Vectastain™ ABC kit, Vector Laboratory, Burlingame, CA). A coloração

foi obtida com 3,38-diaminobenzidina (DAB kit, Vector Laboratory). Como corante de contraste foi utilizado hematoxilina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) para COL-2 e KS, e *Contrast RED* (KPL, Laboratories, Gaithersburg, MD) para COL-1, MMP-13, e PCNA.

4.8 Análise estatística

A quantidade relativa (QR) da expressão de cada gene foi calculada de acordo com a diferença entre a média de cada condição e o Grupo 1 no dia 3, ao qual foi dado o valor de 1,0. A QR foi analisada usando-se o teste de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni para comparação de todas as condições, considerando-se uma diferença estatística para $p < 0,05$ (SPSS, version 21; IBM, Armonk, NY). O mesmo experimento foi conduzido 5 vezes em tempos diferentes e os *outliers* foram eliminados utilizando o teste de Shapiro-Wilk.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular

A viabilidade das células de NP foi determinada utilizando-se fluorescência; as células vivas estão identificadas em verde e as células mortas em vermelho (figura 5). Os Grupos 1 e 2 apresentaram maior concentração de células mortas ao final do experimento.

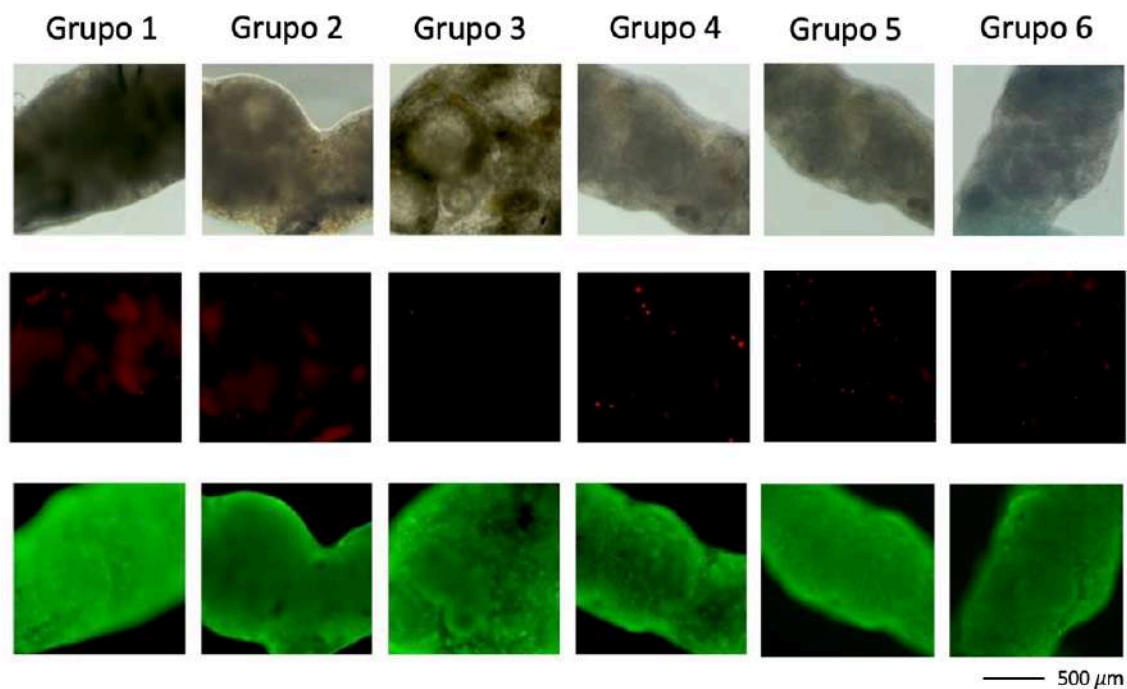


Figura 5 – Fluorescência para identificação da viabilidade das células do núcleo pulposo no 18º dia. Células mortas em vermelho e células vivas em verde.

5.2 Expressão gênica em resposta aos regimes de PO e PH

Foram quantificadas as expressões gênicas de moléculas anabólicas *ACAN*, *CSGALNACT1*, *HAS2* e *COL2A1* nas células de NP expostas a vários regimes de combinações de PO e PH (figura 6). As células de NP bovino mantiveram um nível constante de expressão de *ACAN* por 18 dias no Grupo

1. Por outro lado, no Grupo 2, a expressão de *ACAN* foi transitoriamente aumentada até o dia 12 e após declinou até o dia 18. No Grupo 3, as células do NP apresentaram um constante aumento na expressão de *ACAN* com o tempo, alcançando no dia 18 um valor significativamente maior que todos os demais grupos ($p < 0,05$). No Grupo 4, houve um discreto aumento de 42% na expressão de *ACAN* entre os dias 3 e 18. Nos Grupos 5 e 6, a expressão de *ACAN* aumentou 109 e 144%, respectivamente, entre os dias 3 e 12 e depois manteve-se relativamente estável até o dia 18 (Figura 6A).

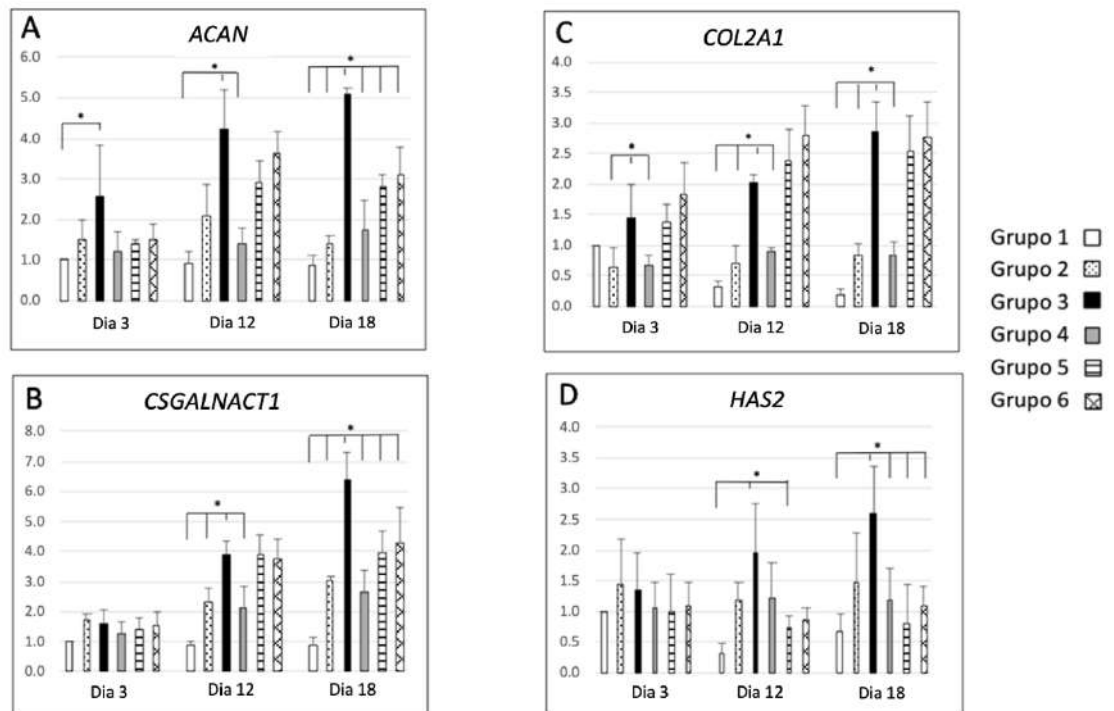


Figura 6 – Quantidade relativa da expressão gênica de moléculas anabólicas do núcleo pulposo (*: $p < 0,05$). A) Agrecano (*ACAN*). B) N-cetilgalactosaminiltransferase (*CSGALNACT1*). C) Colágeno tipo II (*COL2A1*). D) Ácido hialurônico (*HAS2*).

A expressão de *CSGALNACT1* manteve-se estável em valores baixos durante os 18 dias no Grupo 1. No Grupo 2, *CSGALNACT1* apresentou um aumento constante durante todo o experimento, atingindo um valor no dia 18 79% maior que no dia 3. O Grupo 3 apresentou um grande aumento de 293% na expressão de *CSGALNACT1* com o tempo, atingindo no dia 18 um valor significativamente maior que todos os demais grupos ($p < 0,05$). O Grupo 4 apresentou um constante aumento da expressão de *CSGALNACT1*, atingindo um valor 105% maior no dia 18 comparado ao dia 3. Nos Grupos 5 e 6, *CSGALNACT1* apresentou um padrão de expressão similar, um grande aumento da expressão entre os dias 3 e 18, e após manteve-se estável até o dia 18 (Figura 6B).

A expressão de *COL2A1* apresentou uma grande diminuição no Grupo 1, atingindo um valor 5 vezes menor entre os dias 3 e 18. Nos Grupos 2 e 4 houve um discreto aumento na expressão de *COL2A1* durante o experimento, atingindo valores 30 e 26% maiores que o inicial. O Grupo 3 apresentou um constante aumento na expressão de *COL2A1* com o tempo, chegando a um valor significativamente maior que os Grupos 1, 2, 3 e 4. Os Grupos 5 e 6 apresentaram comportamento similar, com um grande aumento da expressão de *COL2A1* entre os dias 3 e 12 e após mantiveram-se estáveis até o dia 18.

No grupo 1, a expressão de *HAS2* apresentou uma grande diminuição entre os dias 3 e 12, seguido de um discreto aumento até o dia 18. O grupo 3 foi o único grupo que apresentou um aumento constante na expressão de *HAS2* durante todo o experimento, atingindo um valor significativamente maior que os grupos 1, 4, 5, e 6 no dia 18 ($p < 0,05$). Nos demais grupos, a expressão de *HAS2* foi relativamente constante durante todo o experimento. (Figura 6D).

Para avaliar a expressão gênica dos elementos catabólicos foram escolhidos os genes: *COL1A1*, *MMP13* e *CTGF* (figura 7). A expressão de *COL1A1* apresentou um grande aumento de 690% com o tempo no Grupo 1, atingindo um valor estatisticamente maior que os demais grupos no dia 18 ($p < 0,05$). Nos Grupos 2, 3 e 4, a expressão de *COL1A1* manteve-se estável durante os 18 dias, com valores similares ao inicial. Nos Grupos 5 e 6 a expressão de *COL1A1* aumentou até o dia 12, seguida de uma discreta redução no dia 18 (Figura 7A).

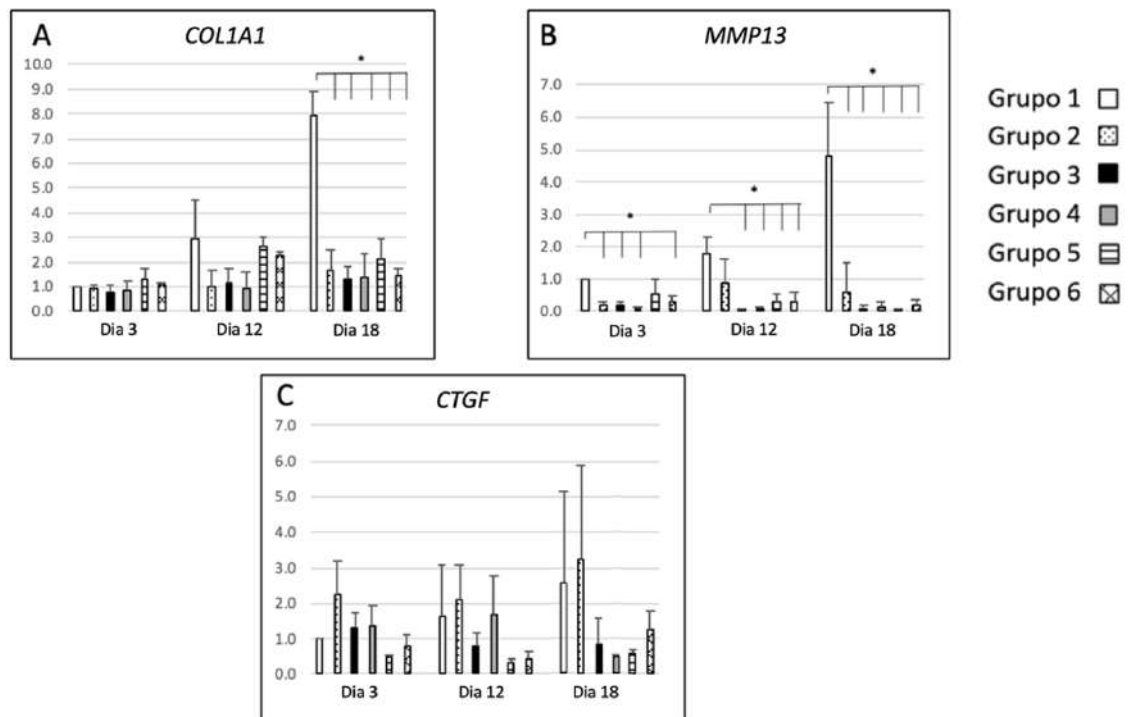


Figura 7 – Quantidade relativa da expressão gênica de moléculas catabólicas do núcleo pulposo (*: $p < 0,05$). A) Colágeno tipo I (*COL1A1*). B) Matriz metaloproteinase 13 (*MMP13*). C) Fator de crescimento do tecido conjuntivo (*CTGF*).

As células do NP apresentaram um grande aumento de 390% na expressão de *MMP13* no Grupo 1, que chegou a um valor significativamente maior que os demais grupos no dia 18 ($p < 0,05$). No Grupo 2 houve um discreto aumento da expressão de *MMP13* no dia 12, que logo regrediu no dia 18. Nos outros grupos houve uma constante baixa expressão de *MMP13* durante todo o experimento (Figura 7B).

A expressão de *CTGF* apresentou um constante aumento nos Grupos 1 e 2, atingindo os maiores valores de expressão após 18 dias. O Grupo 3 apresentou uma queda da expressão de *CTGF* entre os dias 3 e 12, mantendo-se estável até o dia 18. O Grupo 4 apresentou um aumento inicial na expressão de *CTGF* entre os dias 3 e 12, seguido de uma grande queda até o dia 18. O Grupo 5 manteve uma constante baixa expressão de *CTGF* durante todo o experimento. O Grupo 6 apresentou uma queda inicial entre os dias 3 e 12, seguida de um aumento na expressão de *CTGF* entre os dias 12 e 18 (Figura 7C).

Foram avaliadas também a expressão gênica de algumas moléculas características das células do NP, *PCNA*, *ITGA5* e *CDH2*, conferindo assim a manutenção do fenótipo dessas células durante o experimento (figura 8). No Grupo 1 e 5, a expressão de *PCNA* apresentou uma redução de 50% entre os dias 3 e 18. No Grupo 3, *PCNA* apresentou a maior expressão gênica, atingindo um valor significativamente maior que os grupos 1 e 5 no dia 18 ($p < 0,05$). A expressão de *PCNA* no Grupo 4 manteve-se estável durante todo experimento, atingindo um valor semelhante ao inicial. Nos grupos 2 e 6 houve um discreto aumento de 41 e 53% respectivamente na expressão de *PCNA* entre os dias 3 e 18 (Figura 8A).

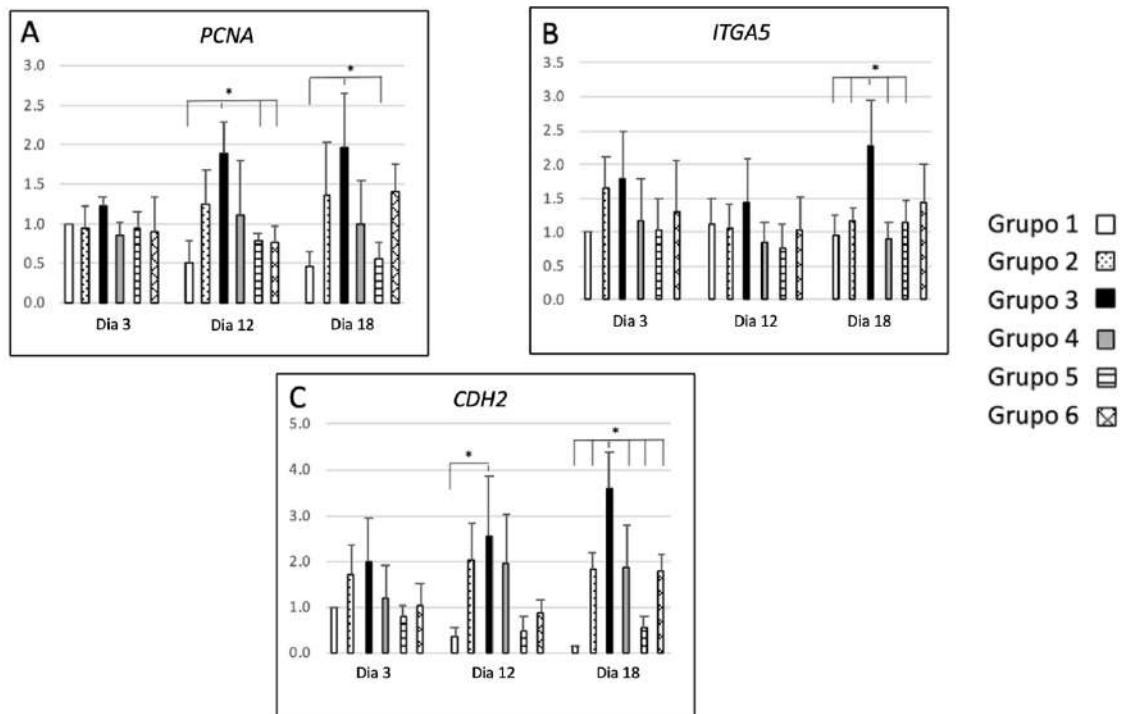


Figura 8 – Quantidade relativa da expressão gênica de moléculas fenotípicas do núcleo pulposo (*: $p < 0,05$). A) Antígeno nuclear de célula proliferativa (*PCNA*). B) Integrina alfa 5 (*ITGA5*). C) Caderina (*CDH2*).

A expressão de *ITGA5* apresentou-se constante no grupo 1 durante os 18 dias do experimento. Nos Grupos 2, 4, 5 e 6, a expressão de *ITGA5* apresentou um comportamento semelhante, com uma diminuição inicial entre os dias 3 e 12, seguida de um leve aumento entre os dias 12 e 18. O Grupo 3 apresentou os maiores valores de expressão de *ITGA5* durante todo o experimento, atingindo um valor no dia 18 estatisticamente superior aos Grupos 1, 2, 4 e 5 ($p < 0,05$) (Figura 8B).

A expressão de *CDH2* apresentou uma grande diminuição entre os dias 3 e 18 no Grupo 1, atingindo um valor 7 vezes menor ao inicial. No Grupo 2 houve uma constante expressão de *CDH2* durante os 18 dias. O

Grupo 3 apresentou um aumento da expressão durante os 18 dias, atingindo um valor estatisticamente maior que os demais grupos ($p < 0,05$). O Grupo 4 apresentou um aumento inicial de 67% na expressão de *CDH2* entre os dias 3 e 12, mantendo-se estável até o dia 18. Nos Grupos 5 e 6 a expressão de *CDH2* apresentou uma diminuição entre os dias 3 e 12, seguido de um aumento entre os dias 12 e 18 (Figura 8C).

5.3 Imunohistologia

Foi realizado o estudo imunohistológico para comparação do comportamento da expressão gênica com a qualidade de deposição da MEC, localização de enzimas degenerativas e de proliferação celular.

Na imunohistologia do sulfato de queratina, os Grupos 1 e 2, que não foram submetidos ao protocolo de PH, não apresentaram uma densa deposição de KS; após 18 dias do experimento observou-se grandes áreas em branco, onde não há formação de MEC. Por outro lado, no Grupo 3 observou-se uma intensa deposição de KS, que aumentou conforme os dias, atingindo no dia 18 uma produção densa e homogênea de MEC. Já os Grupos 4, 5 e 6 apresentaram um gradual aumento na deposição de KS, mas mesmo após 18 dias apresentaram áreas em branco, onde não houve deposição de MEC (Figura 9).

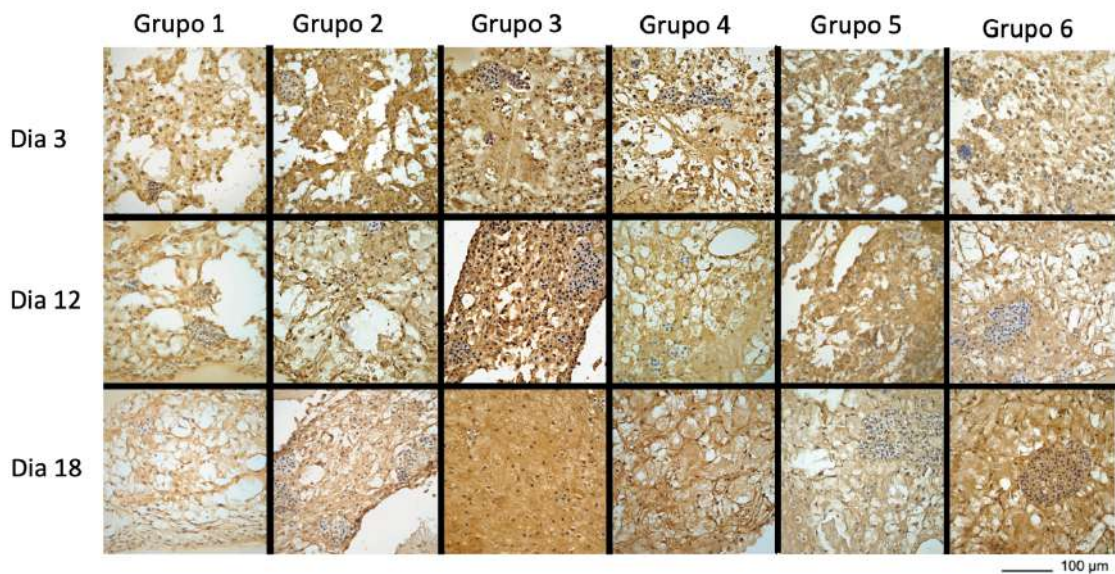


Figura 9 – Imunohistologia do sulfato de queratina (KS). O acúmulo de proteoglicanos está demonstrado pela confluência de tons em marrom. Áreas brancas correspondem a espaços vazios sem formação de MEC.

Para análise imunohistológica do colágeno tipo 2, observou-se que no Grupo 1 houve uma gradual diminuição na deposição de COL-2 após 18 dias, apresentando grandes áreas de espaços vazios. Já nos grupos 2, 4, 5 e 6 observou-se um constante aumento da produção de COL-2 com o tempo; porém no dia 18 existiam grandes áreas em branco, sem depósito de MEC, nos Grupos 2 e 4, e pequenas áreas em branco nos Grupos 5 e 6. Por outro lado, no Grupo 3, após 18 dias, houve uma intensa e homogênea deposição de COL-2 na MEC (Figura 10).

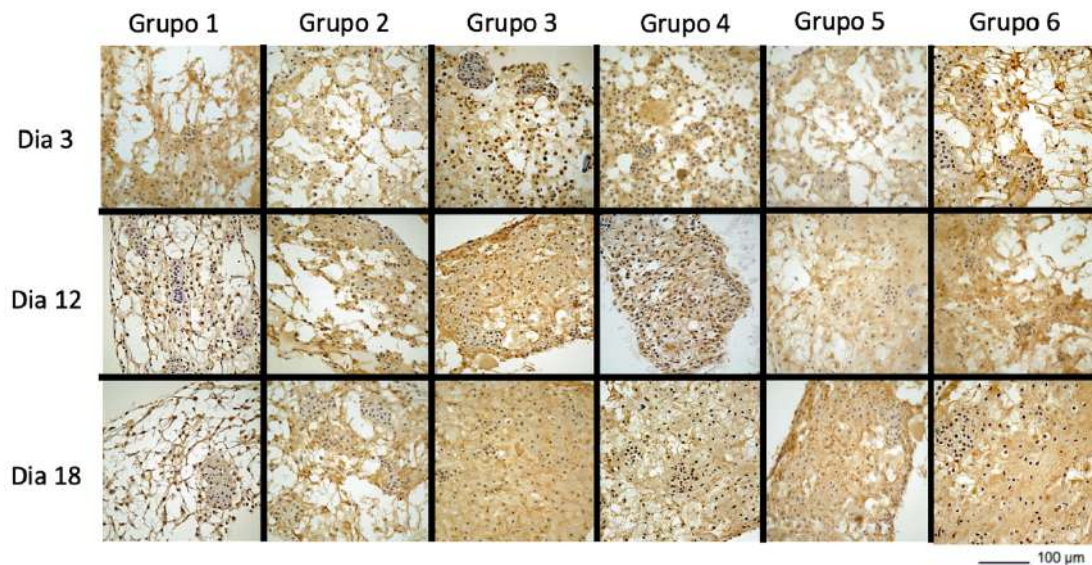


Figura 10 – Imunohistologia do colágeno tipo II (COL-2). O acúmulo de colágeno tipo II é demonstrado em marrom. Áreas brancas correspondem a espaços vazios sem formação de MEC.

Na imunohistologia do colágeno tipo 1 observou-se que no Grupo 1 a deposição de COL-1 aumentou expressivamente com o tempo, atingindo no dia 18 uma densa área de deposição na MEC. Já os demais grupos apresentaram uma pequena deposição de COL-1 durante todo o experimento, apresentando grandes áreas em branco, sem deposição na MEC, após 18 dias (Figura 11).

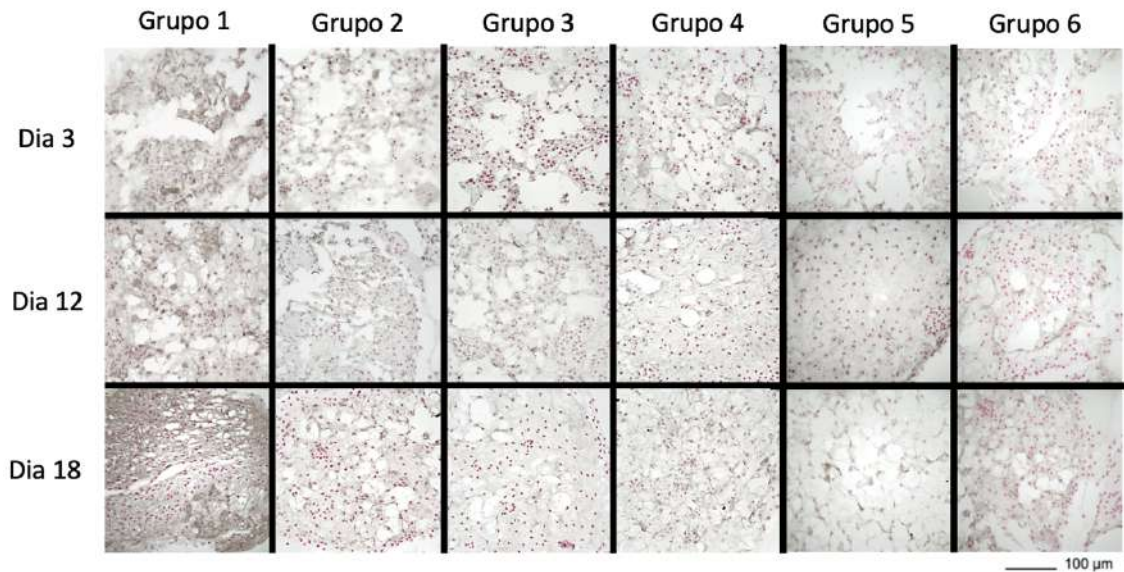


Figura 11 – Imunohistologia do colágeno tipo I (COL-1). O acúmulo de colágeno tipo I é demonstrado em preto.

Para análise imunohistológica da metaloproteinase 13 observou-se que no Grupo 1 houve um constante aumento na deposição de MMP-13 com o tempo. No dia 18, as amostras apresentavam grandes áreas com coloração positiva. O grupo 2 apresentou uma discreta deposição de MMP-13 ao redor das células, mais bem observada nos dias 12 e 18. Já nos grupos que utilizaram o protocolo de PH (Grupos 3, 4, 5 e 6), não houve coloração detectável durante os 18 dias do experimento (Figura 12).

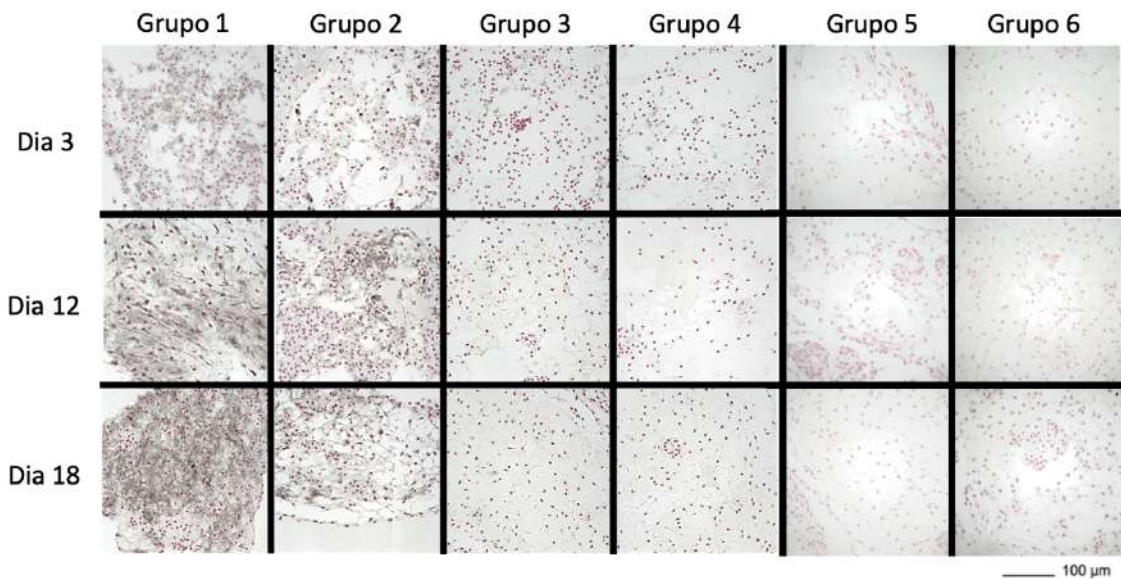


Figura 12 - Imunohistologia da metaloproteinase-13 (MMP-13). O acúmulo de metaloproteinase é demonstrado em preto.

Na imunohistologia do antígeno nuclear de célula proliferante observou-se que nos Grupos 1 e 5 houve uma pequena parcela dos núcleos corados positivamente (núcleo preto) para PCNA durante todo o experimento. Nos Grupos 2, 4 e 6 houve uma quantia intermediária de núcleos corados para PCNA, observando uma semelhante quantidade entre núcleos corados em rosa e preto. Por outro lado, no Grupo 3 observamos uma expressiva maioria de núcleos corados positivamente em preto para PCNA durante todo o experimento (Figura 13).

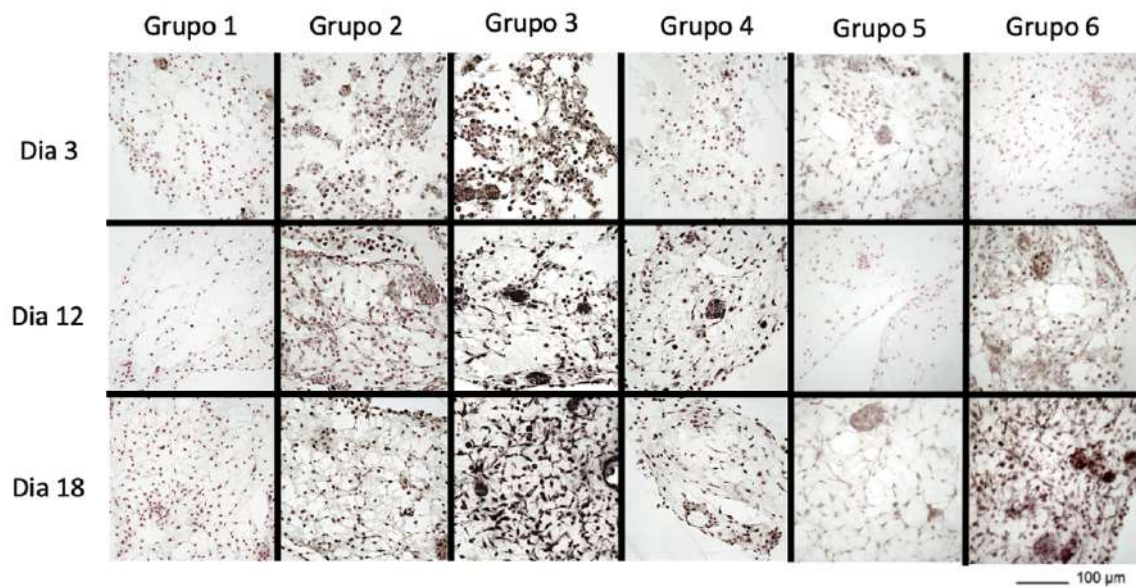


Figura 13 – Imunohistologia do antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA). Os núcleos das células em proliferação apresentam coloração preta.

6 DISCUSSÃO

Com este estudo planejou-se recriar os estresses físico-químicos aos quais as células do NP são expostas devido às mudanças de cargas envolvidas durante o dia, para simular atividades em posição ortostática e o descanso em posição supina. Para avaliar os efeitos desses estresses no metabolismo das células do NP, foram comparadas diversas combinações entre protocolos de PH e osmolaridade do meio de cultura. A magnitude, frequência e duração das PH e PO seguiram os seguintes raciocínios.

6.1 Fundamentação para escolha da PO

A capacidade de manter um equilíbrio osmótico e o controle do volume é fundamental para preservação da função celular. O volume da célula depende do movimento da água através da sua membrana devido ao gradiente osmótico gerado por diferenças das concentrações intra e extracelulares de solutos (SIVAN *et al.*, 2006). O aumento na osmolaridade extracelular leva a uma retração celular enquanto a diminuição leva a um edema celular (HOFFMANN, LAMBERT, PEDERSEN, 2009). PGs (agrecano) são essenciais para manter a hidratação e PO do DIV (URBAN & ROBERTS, 2003). Agrecano apresenta cadeias de s-GAG com uma alta carga negativa, o que permite uma ligação com moléculas de água (JOHNSON, SHAPIRO, RISBUD, 2014; SIVAN, WACHTEL, ROUGHLEY, 2014). Com isso, o NP gera uma alta PO, absorvendo água e, conseqüentemente, gerando uma alta PI e uma capacidade de absorver a carga transmitida pela coluna (URBAN & ROBERTS, 2003; ERWIN & HOOD, 2014). Se a carga aplicada for maior que a PO, água é difundida para o meio extracelular, o que aumenta a PO; quando em repouso, a água é atraída novamente para o NP, resultando em um equilíbrio osmótico (McMILLAN, GARBUTT, ADAMS, 1996; SIVAN *et al.*, 2006). Na falta

de cargas externas, a PH é mantida através do AF e PT, o que restringe a expansão do NP (NEWELL *et al.*, 2017). Estudos *in vivo* demonstraram que o volume de água cai 15% em DIV lombares de humanos submetidos a uma carga de 1500 N por 6 h comparados ao controle em ortostase (McMILLAN, GARBUTT, ADAMS, 1996). Em contraste com cargas de alta intensidade ou estáticas, as cargas cíclicas diárias de moderada intensidade são benéficas para a hidratação do DIV e, conseqüentemente, mantêm homeostase (BELAVY *et al.*, 2016).

A degeneração causada pelo envelhecimento leva a perda de agreganos e diminuição da PO e conseqüente falha na habilidade do DIV de responder a estímulos mecânicos (LE MAITRE, FREEMONT, HOYLAND, 2004; MOLINOS *et al.*, 2015). Em DIV saudável a PO pode variar entre 430 – 496 mOsm/L (ISHIHARA *et al.*, 1997; VAN DIJK, POTIER, ITO, 2011), valores que são fisiológicos para as células do NP, porém altos comparados aos demais tecidos do corpo (BROCKER, THOMPSON, VASILIOU, 2012). A PO do DIV pode cair para 300 mOsm/L em discos degenerados devido a perda de PGs e formação de fibrose (WUERTZ, URBAN, KLASSEN, 2007). Quando as células do NP são cultivadas em um meio de cultura padrão (baixa osmolaridade) é difícil evitar que esse tecido sofra uma expansão devido a grande diferença entre a PO do tecido e do meio (FENG *et al.*, 2009; VAN DIJK, POTIER, ITO, 2013).

Uma alteração no gradiente osmótico entre o DIV e os fluidos ao redor altera significativamente as propriedades biomecânicas e pode simular um comportamento degenerativo do DIV (VERGROESEN *et al.*, 2016). Em estudos recentes, células do NP mostraram um aumento na expressão gênica de moléculas da MEC após 7 dias em ambiente hiperosmolar (430 - 450 mOsm/L) (JOHNSON, SHAPIRO, RISBUD, 2014; MIZUNO, KASHIWA, KANG, 2019). Foi hipotetizado que os grupos com hiperosmolaridade

simulariam condições normais do NP, onde a PO é maior que nos fluidos fisiológicos (320 mOsm/L). Assim, terapias regenerativas focadas em restaurar o gradiente osmolar do DIV podem levar a um aumento na hidratação tecidual e altura do DIV.

6.2 Fundamentação para escolha da magnitude e frequência da PH

Um grande número de estudos investigou os efeitos da PH e das forças compressivas na variação do metabolismo das células do NP utilizando-se de culturas com monocamada, culturas 3D com gel (NEIDLINGER-WILKE *et al.*, 2014), cultura da peça anatômica (GANTENBEIN *et al.*, 2006) e em modelos animais (ALINI *et al.*, 2008). O tecido do NP está sob constante estresse compressivo, devido a várias posições e movimentos que a coluna tem durante o dia (WILKE, NEEF, CAIMI, 1999). Como o NP é abundantemente hidratado, é presumido que essa força compressiva seja primariamente pura PH (URBAN & MCMULLIN, 1988), que pode ser representada pela PI do DIV. (SATO, KIKUCHI, YONEZAWA, 1999; WILKE, NEEF, CAIMI, 1999; WALTER *et al.*, 2011). Por esse motivo, focou-se no efeito da PH pura nas células do NP.

As células de NP bovino foram escolhidas neste estudo devido às propriedades físico-químicas dos DIV das caudas bovinas serem muito similares em diversos aspectos com o DIV humano. O arco de movimento da cauda bovina é similar a coluna lombar humana (ALINI *et al.*, 2008; DEMERS, ANTONIOU, MWALE, 2004). Além do mais, PI na coluna lombar de humanos em decúbito é estimada entre 0,1-0,3 MPa (WILKE, NEEF, CAIMI, 1999), muito semelhante a PI na cauda bovina estimada em 0,25 MPa (OSHIMA *et al.*, 1993).

A movimentação dinâmica da coluna é fundamental para manter o metabolismo constante em uma estrutura avascular como o DIV (NEIDLINGER-WILKE *et al.*, 2014). As magnitudes de PH que agem no DIV podem variar dependendo do posicionamento e cargas que passam pela coluna (GANTENBEIN *et al.*, 2006; NEIDLINGER-WILKE *et al.*, 2014). Valores fisiológicos podem variar entre 0,2 – 3 MPa, sendo o valor de 0,2 MPa uma constante independente da postura e posição da coluna, sendo gerada pela ação da musculatura (SATO, KIKUCHI, YONEZAWA, 1999; ALINI *et al.*, 2008). Ocasionalmente, o DIV pode ser exposto a PH maiores que 3 MPa, o que leva a um processo degenerativo local, gerando aumento da produção de enzimas catabólicas (MMPs) e diminuindo a produção de MEC (KASRA *et al.*, 2006; ALINI *et al.*, 2008). Quando as células do NP são cultivadas em valores fisiológicos de PH (0,3 – 1 MPa), apresentam um aumento da expressão e síntese de PGs na MEC (HANDA *et al.*, 1997; HUTTON *et al.*, 1999; ISHIHARA *et al.*, 1996; HUTTON *et al.*, 2001; LE MAITRE *et al.*, 2008; MIZUNO, KASHIWA, KANG, 2019). Baseado nas magnitudes fisiológicas e estudos prévios foi estabelecido o regime *in vitro* adotado neste experimento.

6.3 Fundamentação para duração dos ciclos de PH

A duração de um regime de estresse e o tempo total de duração de repetidos regimes *in-vitro* podem ser definidos para investigar o metabolismo das células do NP (GANTENBEIN *et al.*, 2006). Alguns estudos utilizaram protocolos com PH por apenas algumas horas por dia seguido de um longo período em pressão atmosférica, repetido diariamente por vários dias (GANTENBEIN *et al.*, 2006; KASRA *et al.*, 2006). Estes estudos não conseguiram recriar um ambiente que simulasse as condições

internas do NP. MIZUNO, KASHIWA, KANG (2019) estipularam que uma duração de PH de no mínimo 3 dias seria necessário para determinar possíveis diferenças na expressão gênica entre o controle (PA) e os grupos com PH. Porém, em seu estudo, devido ao curto tempo do experimento e à utilização de uma única variação nos regimes de estresse, não foi possível identificar a correlação do aumento da expressão gênica com a deposição de MEC. Por esse motivo, foi adotado um protocolo com a repetição da variação dos estresses em um total de seis vezes por um período de 18 dias, sendo avaliada a expressão gênica e imunohistologia em três pontos temporais distintos.

6.4 Resposta anabólica (regenerativa)

Houve um aumento na expressão e síntese de moléculas constituintes da cartilagem (*ACAN*, *CSGALNACTI* E *HAS2*) com o tempo no Grupo 3. *ACAN* e *CSGALNACTI* também estiveram aumentados nos Grupos 5 e 6; contudo, *HAS2* não apresentou variação nestes grupos. Quando não existe uma produção adequada de ácido hialurônico, os PGs não conseguem se estabilizar e se acumular ao redor das células devido a falta de sítios de ligação (HASCALL & HEINEGARD, 1974). A imunohistologia com anticorpo KS revelou um intenso depósito entre as células do NP, com ausência de espaços vazios na MEC no Grupo 3. Por esse motivo, a alternância entre regimes de PH cíclica e PH constante tem um importante papel na formação da MEC do NP. SAGGESE *et al.* (2020) realizaram um protocolo com alternância entre PH constante por 8 horas e cíclica por 16 horas; devido ao curto tempo do experimento (24 horas) os autores não encontraram um aumento significativo na expressão de *ACAN* quando comparado ao controle (PA). SHAH & CHAHINE (2018) observaram um

aumento na expressão de *ACAN* após as células do NP bovino serem expostas a um protocolo com PH cíclica (0-0,6 MPa) 2 horas por dia, durante 7 dias. Porém esse aumento na expressão gênica não foi acompanhado por um aumento significativo na produção de GAGs.

Nos grupos submetidos a um protocolo de PH em um meio hiperosmolar (Grupos 3, 5 e 6) houve um aumento na expressão de *COL2A1* com o tempo, comparado aos grupos que não foram expostos a PH (Grupos 1 e 2) e ao grupo onde houve variação da PO (Grupo 4). Sem PH, a expressão de *COL2A1* manteve-se constante no Grupo 2 (hiperosmolar) e diminuiu no Grupo 1 (hiposmolar). Assim, um meio hiperosmolar pode ser utilizado para simular a PO no NP e pode, simultaneamente com a PH, estimular um efeito anabólico nas células do NP. A imunohistologia com anticorpos COL-2, confirmou essa hipótese, havendo uma maior deposição de colágeno tipo 2 no Grupo 3. CHEN *et al.* (2002) não encontraram uma relação direta entre a osmolaridade do meio de cultura e o aumento da expressão de *COL2A1*. Foram analisadas células porcinas por um período 24 horas, tanto o meio hiperosmolar quanto o hiposmolar mantiveram valores de expressão semelhantes. Por outro lado, WUERTZ, URBAN, KLASSEN (2007) avaliaram por 5 dias a resposta das células do NP bovino e de humanos em diferentes PO em grupos com e sem PH. Foi identificado um aumento na expressão de *COL2A1* conforme aumentava-se a osmolaridade do meio e que o efeito da PH é menos profundo e parcialmente dependente da osmolaridade. Os autores concluíram que a osmolaridade tem um papel fundamental para a síntese de MEC no NP.

6.5 Resposta Catabólica (Degenerativa)

Durante os 18 dias de cultura, a expressão de *COL1A1* esteve significativamente aumentada no Grupo 1 comparada com os outros grupos. Apesar do colágeno tipo 1 ser uma molécula constituinte da MEC, o seu excesso pode levar a formação de tecido fibrótico, levando a desidratação do NP (NAQVI & BUCKLEY, 2015; YUAN *et al.*, 2018) e consequente prejuízo da função biomecânica. O aumento da expressão gênica foi confirmado com a imunohistologia, que apresentou uma intensa coloração no Grupo 1. Assim, a combinação de um meio com baixa PO e sem utilização de protocolos de PH mostrou-se patológico com a formação de tecido fibrótico. Este resultado está de acordo com o estudo de HASCHTMANN, STOYANOV, FERGUSON (2006) que observaram um aumento na expressão de *COL1A1* em DIV bovinos expostos a um meio com baixa osmolaridade quando comparado com um meio com alta osmolaridade por 21 dias, porém todo o experimento foi conduzido em PA, não foi analisado a importância da PH neste processo.

MMP13 foi escolhido para estimar o efeito catabólico nas células do NP. A utilização de qualquer um dos protocolos de PH levou a uma diminuição significativa na expressão e síntese de *MMP13* comparada ao Grupo 1. Em estudos prévios, *MMP13* mostrou ser capaz de destruir MEC e estimular processos de neoangiogênese (NAQVI & BUCKLEY, 2015; YUAN *et al.*, 2018). Foi possível observar um potencial sinérgico entre PH e um meio hiperosmolar, inibindo a produção de metaloproteinases nos cortes imunohistológicos e consequente degeneração do NP. Assim como este estudo, KROUWELLS *et al.* (2018) observaram uma diminuição na produção de metaloproteinases em meios com uma maior PO comparado aos meios com uma menor PO em DIV de coelhos após 28 dias. SHAH & CHAHINE (2018), em seu estudo com células do NP bovino por 7 dias, observaram um aumento na expressão de *MMP13* no grupo que não foi

submetido a PH; porém, devido ao curto tempo do experimento, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

CTGF é um marcador indireto da formação de fibrose e degeneração do NP (ALI *et al.*, 2008; TRAN, SHAPIRO, RISBUD, 2013; JAMES *et al.*, 2019). Nos Grupos 1 e 2, *CTGF* apresentou um aumento durante os 18 dias comparado aos demais grupos. Este achado indica que a ausência de PH pode predispor processos degenerativos no disco. Além disso, foi possível observar que alternância da osmolaridade entre o Grupo 1 (hiposmolar) e Grupo 2 (hiperosmolar) não influenciou no resultado negativo da não utilização de PH. Este foi o primeiro estudo que avaliou a expressão de *CTGF* com relação a variações de PO e PH, sendo observado que este gene pode ser influenciado pela ação da PH e que células cultivadas em meios com PA podem evoluir com formação de fibrose na sua MEC.

6.6 Característica celular

Para determinar e compreender melhor o processo de homeostase e regeneração tecidual é importante compreender o efeito da PH e PO no estímulo da proliferação celular do NP. Neste estudo, o Grupo 3 apresentou um aumento significativo da expressão gênica de *PCNA* e *ITGAV* após 18 dias, o qual foi acompanhado por uma maior contagem de núcleos positivos na imunohistologia de *PCNA*. Por esse motivo, a alternância entre regimes de PH cíclica e PH constante em um meio hiperosmolar tem um importante papel no estímulo da proliferação celular do NP. MIZUNO, KASHIWA, KANG (2019) avaliaram diferentes combinações de PO e PH por 7 dias em células do NP bovino e observaram que a expressão de *PCNA* apresentou os maiores valores quando submetidos a protocolos com variação de PH em um meio hiperosmolar, porém em seu estudo não foi possível observar uma

maior porcentagem de núcleos corados nos cortes imunohistológicos de PCNA.

A perda do fenótipo nas células do NP foi amplamente descrita nos processos degenerativos que envolvem o DIV. Alterações desse fenótipo podem levar a disfunções biológicas que culminaram na cascata degenerativa (ZHOU *et al.*, 2018). *CDH2* foi utilizado como um marcador para monitorar a manutenção das características fenotípicas das células do NP em respostas as mudanças de PH e PO. O Grupo 3 apresentou um simultâneo aumento na expressão de *CDH2* e na síntese de MEC, ambas peças chaves para a manutenção do fenótipo normal das células do NP. Apesar de estudos prévios demonstrarem que a expressão de *CDH2* aumenta com PH cíclica e diminui com PH constante (WANG *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018), este estudo demonstrou que a alternância entre regimes cíclico e constante levou a um significativo aumento quando comparado com HP puramente cíclica ou constante.

6.7 Efeito da repetição dos regimes de PH no metabolismo das células do NP

Este estudo avaliou o efeito da repetição da alternância entre regimes de PH cíclica (0,2 - 0,7 MPa) seguido de PH constante (0,3 MPa) em um meio hiperosmolar durante 18 dias. Baseado nas fundamentações descritas anteriormente, foi demonstrado que esse protocolo pode recriar as condições que a coluna é exposta durante as atividades diárias e o repouso noturno, gerando uma resposta anabólica nas células do NP bovino. Uma análise da literatura mostra que em sua grande maioria os estudos com protocolos de PH utilizaram somente PH cíclica ou constante (CHAN, FERGUSON, GANTENBEIN-RITTER, 2011; SHAH & CHAHINE, 2018). Neste estudo

observou-se que alternância entre regimes de PH cíclica e PH constante mostrou-se superior aos protocolos onde não houve essa alternância (Grupo 5 e 6). Foi observado também que a repetição dessa alternância é essencial para a criação de um ambiente favorável para deposição da MEC. Estudos prévios que analisaram protocolos com apenas uma alternância entre PH cíclica e constante não foram capazes de obter resultados consistentes devido ao curto tempo do experimento (MIZUNO, KASHIWA, KANG, 2019; SAGGESE *et al.*, 2020). Comparando-se as amostras obtidas após uma (3º dia), quatro (12º dia) e seis (18º dia) repetições observou-se um constante e gradual aumento na expressão gênica e na deposição de moléculas anabólicas (Figuras 9-14).

	Anabólico/Regenerativo				Catabólico/Degenerativo			Fenótipo/Proliferativo		
	<i>Acan</i>	<i>Csgaln act1</i>	<i>Has2</i>	<i>Col2a1</i>	<i>Col1a1</i>	<i>Mmp13</i>	<i>Ctgf</i>	<i>Pcna</i>	<i>Itga5</i>	<i>Cdh2</i>
Grupo 1	→	→	↓	↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↓	→	↓↓
Grupo 2	↑	↑	↑	→	↑	→	↑↑	↑	→	↑
Grupo 3	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	→	↓↓	↓	↑↑	↑↑	↑↑↑
Grupo 4	↑	↑	→	→	→	↓↓	↓	→	→	↑
Grupo 5	↑↑	↑↑	→	↑↑↑	↑	↓↓	↓	↓	→	↓
Grupo 6	↑↑	↑↑	→	↑↑↑	→	↓↓	→	↑	↑	↑

Figura 14 – Efeito dos protocolos de PH e PO no metabolismo das células do NP bovino após 18 dias (6 repetições).

6.8 Efeito da variação da PO

No Grupo 4, foi avaliado os efeitos da PH em um meio onde há variação da PO, similar ao que ocorre no NP degenerado (MOUSER *et al.*,

2019). O NP sadio contém uma carga negativa gerada pela alta concentração de PGs, criando um meio hiperosmolar comparado aos demais tecidos. A movimentação diária leva a forças de compressão e distração na coluna, causando um movimento entre o fluido intradiscal e intersticial, assim como uma variação no volume do DIV (MAVROGONATOU & KLETAS, 2010). Apesar dessa mudança no volume, no NP sadio a mudança na osmolaridade tende a ser mínima, pois a mudança de volume é causada por fluxo de solutos. Dessa forma, a alternância entre PO dentro do NP é considerada patológica.

Com esse regime de alternância entre a PO é esperado que o volume das células varie durante o experimento (HOFFMANN, LAMBERT, PEDERSEN, 2009; O'CONNELL, NEWMAN, CARAPEZZA, 2014). Com isso, as amostras do Grupo 4 apresentaram uma diminuição significativa na expressão de *ACAN*, *CSGALNACT1* e *COL2A1* comparado ao Grupo 3, onde não houve uma variação de PO. Assim que o AF apresenta uma rotura (hérnia de disco), é improvável que o NP consiga manter uma PO constante e por consequência não consiga gerar uma resposta regenerativa local por si só, deixando assim aberta a oportunidade para o desenvolvimento de uma terapia biológica adequada.

6.9 Limitações e Perspectivas

Este estudo é uma investigação descritiva e alguns mecanismos moleculares subjacentes, como os caminhos de sinalização intracelular, não foram investigados, o que pode ser considerado uma limitação. Além disso, a PH gerada pelo biorreator pode não refletir perfeitamente o estresse mecânico que cada célula do NP é submetida *in vivo*. E por fim, devido à dificuldade em desenvolver um dispositivo que possa efetivamente aplicar

compressão dinâmica no DIV no animal, não é possível comparar esses resultados com estudos *in vivo*.

A base que este estudo estabelece nos permitirá avançar para futuros estudos sobre a terapia celular. NP é uma estrutura avascular, portanto o estímulo mecânico tem um papel importante na nutrição e troca de substâncias com o meio externo. A chave para o desenvolvimento de uma terapia regenerativa é encontrar o estímulo mecânico apropriado que consiga acumular MEC. Este estímulo deve primeiramente assegurar a aquisição de nutrientes para atingir os requisitos do metabolismo celular. Em seguida, deve simular os movimentos aos quais o DIV é exposto para que a engenharia tecidual consiga alcançar uma construção funcional. Além disso, o estímulo bioquímico também tem um papel fundamental no crescimento e regeneração do NP. Assim, somente com um total sinergismo entre os estímulos mecânicos e bioquímicos será possível encontrar uma condição de cultura apropriada para o desenvolvimento da terapia celular.

O diagnóstico e o tratamento clínico da doença degenerativa do DIV será cada vez mais individualizada e menos agressivo, o que requer o desenvolvimento de uma terapia celular eficaz *in vitro*. Biorreatores vem sendo utilizados para o desenvolvimento da engenharia tecidual e seu uso será gradativamente estendido do laboratório para a produção comercial, tornando a terapia celular uma opção para o tratamento da doença degenerativa no futuro. Devido à complexidade do processo regenerativo do NP, a combinação da utilização de *scaffolds* biológicos associados com a utilização de células troncos e um protocolo adequado de PH e PO em um biorreator poderá ser a solução para o tratamento da degeneração do DIV.

7 CONCLUSÃO

A repetição dos regimes cíclicos e constantes de PH em um meio hiperosmolar aumenta a resposta metabólica anabólica e mantém o fenótipo das células do NP bovino, enquanto suprime as respostas catabólicas com o tempo, com conseqüente acúmulo de MEC.

8 REFERÊNCIAS

Adams MA, Roughley PJ. What is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(18):2151-61.

Alentado VJ, Lubelski D, Healy AT, Orr RD, Steinmetz MP, Benzel EC. Predisposing characteristics of adjacent segment disease after lumbar fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016;41(14):1167-72.

Ali R, Le Maitre CL, Richardson SM, Hoyland JA, Freemont AJ. Connective tissue growth factor expression in human intervertebral disc: implications for angiogenesis in intervertebral disc degeneration. *Biotech Histochem*. 2008;83(5):239-45.

Alini M, Eisenstein SM, Ito K, Little C, Kettler AA, Masuda K, Melrose J, Ralphs J, Stokes I, Wilke HJ. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur Spine J*. 2008;17(1):2-19.

Alvin MD, Qureshi S, Klineberg E. Cervical degenerative disease: systematic review of economic analyses. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014;39(22):S53-64.

Anderson DG, Tannoury C. Molecular pathogenic factors in symptomatic disc degeneration. *Spine J*. 2005;5(6):260S-6S.

Ayotte DC, Ito K, Tepic S. Direction-dependent resistance to flow in the endplate of the intervertebral disc: an ex vivo study. *J Orthop Res*. 2001;19(6):1073-7.

Belavy DL, Albracht K, Bruggemann GP, Vergroesen PP, van Dieen JH. Can exercise positively influence the intervertebral disc? *Sports Med.* 2016;46(4):473-85.

Boswell MV, Trescot AM, Datta S, Girodano J, Manchikanti L. Interventional techniques: Evidence-based practice guidelines in the management of chronic spinal pain. *Pain Physician.* 2007;10(1):7-11.

Brocker C, Thompson DC, Vasiliou V. The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease. *Biomol Concepts.* 2012;3(4):345-64.

Chan SCW, Ferguson SJ, Gantenbein-Ritter B. The effects of dynamic loading on the intervertebral disc. *Eur Spine J.* 2011;20(11):1796-812.

Chan SCW, Walser J, Kappeli P, Shamsollahi MJ, Ferguson SJ, Gantenbein-Ritter B. Region specific response of intervertebral disc cells to complex dynamic loading: an organ culture study using a dynamic torsion-compression bioreactor. *PLoS One.* 2013;8 (8):e72489.

Chen J, Baer AE, Paik PY, Yan W, Setton LA. Matrix protein gene expression in intervertebral disc cells subjected to altered osmolarity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(4):932-8.

Cs-Szabo G, Ragasa-San JD, Turumella V, Masuda K, Thonar EJ, An HS. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27(20):2212-9.

De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum.* 2004;50 (1):142-50.

Degenais S, Caro J, Haldeman S. A Systematic Review of Low Back Pain Cost of Illness Studies in the United States and Internationally. *Spine J.* 2008;8 (1):8-20.

Demers CN, Antoniou J, Mwale F. Value and limitations of using the bovine tail as a model for the human lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004;29(24):2793-9.

Detiger SEL, Bakker JY, Emanuel KS, Schmitz M, Vergroesen PPA, van der Veen AJ, Mazel C, Smit TH. Translational challenges for the development of a novel nucleus pulposus substitute: Experimental results from biomechanical and in vivo studies. *J Biomater Appl.* 2016;30(7):983-94.

Dickhut A, Pelttari K, Janicki P, Wagner W, Eckstein V, Egermann M, Richter W. Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage. *J Cell Physiol.* 2009;219(1):219-26.

Dietrich DR. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) a novel endogenous marker for cell proliferation. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23(1):77-109.

- Erwin WM, Hood KE. The cellular and molecular biology of the intervertebral disc: a clinician's primer. *J Can Chiropr Assoc.* 2014;58(3):246-57.
- Feng G, Wan Y, Shen FH, Li X. Nucleus pulposus explant culture model. *J Orthop.* 2009;27(6):814-9.
- Gantenbein B, Grunhagen T, Lee CR, van Donkelaar CC, Alini M, Ito K. An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(23):2665-73
- Gao G, Li H, Huang Y, Yin J, Jiang Y, Xu N, Zhou D, Nong L, Ren K. Periodic Mechanical Stress Induces Extracellular Matrix Expression and Migration of Rat Nucleus Pulposus Cells Through Src-GIT1-ERK1/2 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(4):1510-21.
- Gilchrist CL, Chen J, Richardson WJ, Loeser RF, Setton LA. Functional integrin subunits regulating cell-matrix interactions in the intervertebral disc. *J Orthop Res.* 2007;25(6):829-40.
- Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, Bethea S, Zinchenko N, Hanley EN Jr. Variations in aggrecan localization and gene expression patterns characterize increasing stages of human intervertebral disk degeneration. *Exp Mol Pathol.* 2011;91(2):534-9.
- Guo HR, Tanaka S, Halperin WE, Cameron LL. Back pain prevalence in US industry and estimates of lost workdays. *Am J Public Health.* 1999;89(7):1029-35.

- Handa T, Ishihara H, Ohshima H, Osada R, Tsuji H, Obata K. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22(10):1085-91.
- Hascall VC, Heinegard D. Aggregation of cartilage proteoglycan : Oligosaccharide competitors of the proteoglycan-hyaluronic acid interaction. *J Biol Chem*. 1974;249(13):4242-9.
- Haschtmann D, Stoyanov JV, Ferguson SJ. Influence of diurnal hyperosmotic loading on the metabolism and matrix gene expression of a whole-organ intervertebral disc model. *J Orthop Res*. 2006;24(10):1957-66.
- Hayes AJ, Benjamin M, Ralphs JR. Extracellular matrix in development of the intervertebral disc. *Matrix Biol*. 2001;20(2):107-21.
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*. 2009;89 (1):193-277.
- Hoy D, March L, Brooks P, Woolf A, Blyth F, Vos T, Buchbinder R. Measuring the Global Burden of Low Back Pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24 (2):155-65
- Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, Hyon S, Toribatake Y, Tomita K, Hair GA. The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(15):1507-15.

Hutton WC, Elmer WA, Bryce LM, Kozłowska EE, Boden SD, Kozłowski M. Do the intervertebral disc cells respond to different levels of hydrostatic pressure? *Clin Biomech.* 2001;16(9):728-34.

Hwang PY, Jing L, Chen J, Lim FL, Tang R, Choi H, Cheung KM, Risbud MV, Gersbach CA, Guilak F, Leung VY, Setton LA. N-cadherin is key to expression of the nucleus pulposus cell phenotype under selective substrate culture conditions. *Sci Rep.* 2016;6(1):28038.

Ishimaru D, Sugiura N, Akiyama H, Watanabe H, Matsumoto K. Alternations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(2):250-8.

Ishihara H, McNally DS, Urban JP, Hall AC. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in different regions of the intervertebral disk. *J Appl Physiol.* 1996;80(3):839-46.

Ishihara H, Warensjo K, Roberts S, Urban J. Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: the role of extracellular osmolality. *Am J Physiol.* 1997;272 (5):C1499-506.

James G, Klyne DM, Millecamps M, Stone LS, Hodges PW. Physical activity attenuates fibrotic alterations to the multifidus muscle associated with intervertebral disc degeneration. *Eur Spine J.* 2019;]28(5):893-904.

Johnson ZI, Shapiro IM, Risbud MV. Extracellular osmolarity regulates matrix homeostasis in the intervertebral disc and articular cartilage: Evolving role of TonEBP. *Matrix Biol.* 2014;40:10-6.

Juniper M, Le TK, Mladsı D. The epidemiology, economic burden, and pharmacological treatment of chronic low back pain in France, Germany, Italy, Spain and the UK: a literature-based review. *Expert Opin. Pharmacother.* 2009;10 (16)2581-92.

Kasra M, Merryman WD, Loveless KN, Goel VK, Martin JD, Buckwalter JA. Frequency response of pig intervertebral disc cells subjected to dynamic hydrostatic pressure. *J Orthop Res.* 2006;24(10):1967-73.

Krouwells A, Popov-Celeketı J, Plomp SGM, Dhert WJA, Oner FC, Bank RA, Creemers LB. No Effects of Hyperosmolar Culture Medium on Tissue Regeneration by Human Degenerated Nucleus Pulposus Cells Despite Upregulation Extracellular Matrix Genes. *Spine (Phila Pa 1976).* 2018;43(5):307-15.

Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degeneration human intervertebral disc. *J Pathol.* 2004;204(1):47-54.

Le Maitre CL, Frain J, Fotheringham AP, Freemont AJ, Hoyland JA. Human cells derived from degenerate intervertebral discs respond differently to those derived from nondegenerate intervertebral discs following application of dynamic hydrostatic pressure. *Biorheology.* 2008;45(5):563-75.

Le Maitre CL, Frain J, Millward-Sadler J, Fotheringham AP, Freemont AJ, Hoyland JA. Altered integrin mechanotransduction in human nucleus pulposus cells derived from degenerated discs. *Arthritis Rheum.* 2009;60(2):460-9.

Li P, Gan Y, Wang H, Zhang C, Wang L, Xu Y, Song L, Li S, Ou Y, Zhou Q. Dynamic compression effects on immature nucleus pulposus: a study using a novel intelligent and mechanically active bioreactor. *Int J Med Sci.* 2016;13(3):225-34.

Li P, Hou G, Zhang R, Gan Y, Xu Y, Song L, Zhou Q. High-magnitude compression accelerates the premature senescence of nucleus pulposus cells via the p38 MAPK-ROS pathway. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):209-13.

Liebscher T, Haefeli M, Wuertz K, Nerlich AG, Boos N. Age-related variation in cell density of human lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011;36(2):153-9.

Mabvuure N, Hindocha S, Khan WS. The role of bioreactors in cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012;7(4):287-92.

Makhni MC, Caldwell JE, Saifi C, Fischer CR, Lehman RA, Lenke LG, Lee FY. Tissue engineering advances in spine surgery. *Regen Med.* 2016;11(2):211-22.

Mavrogonatou E, Kletsas D. Effect of varying osmotic conditions on the response of bovine nucleus pulposus cells to growth factors and the activation of the ERK and Akt pathway. *J Orthop Res.* 2010;28(10):1276-82.

McMillan D, Garbutt G, Adams M. Effect of sustained loading on the water content of intervertebral discs: implications for disc metabolism. *Ann Rheum Dis.* 1996;55(12):880-7.

- Mizuno S. Novel method of chondrocyte culture using a semipermeable membrane pouch with hydrostatic pressure. *Cell Transpl.* 2011;20(2):767-74
- Mizuno S, Ogawa R. Using changes in hydrostatic and osmotic pressure to manipulate metabolic function in chondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;300(6):C1234-45.
- Mizuno S, Kashiwa K, Kang JD. Molecular and histological characteristics of bovine caudal nucleus pulposus by combined changes in hydrostatic and osmotic pressures in vitro. *J Orthop Res.* 2019;37(2):466-76.
- Molinos M, Almeida CR, Caldeira J, Cunha C, Goncalves RM, Barbosa MA. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration. *J R Soc Interface.* 2015;12(104):20141191.
- Mouser VHM, Arkesteijn ITM, van Dijk BGM, Wuertz K, Ito K. Hypotonicity differentially affects inflammatory marker production by nucleus pulposus tissue in simulated disc degeneration versus herniation. *J Orthop Res.* 2019;37(5):1110-6.
- Naqvi SM, Buckley CT. Extracellular matrix production by nucleus pulposus and bone marrow stem cells in response to altered oxygen and glucose microenvironments. *J Anat.* 2015;227(6):757-66.
- Neidlinger-Wilke C, Mietsch A, Rinkler C. Interactions of environmental conditions and mechanical loads have influence on matrix turnover by nucleus pulposus cells. *J Orthop Res.* 2012;30 (1):112-21.

Neidlinger-Wilke C, Galbusera F, Pratsinis H, Mavrogonatou E, Mietsch A, Kletsas D, Wilke H. Mechanical loading of the intervertebral disc: from the macroscopic to the cellular level. *Eur Spine J.* 2014;23(3):S333-43.

Nettles DL, Richardson WJ, Setton LA. Integrin expression in cells of the intervertebral disc. *J Anat.* 2004;204(6):515-20.

Newell N, Little JP, Christou A, Adams MA, Adam CJ, Masouros SD. Biomechanics of the human intervertebral disc: a review of testing techniques and results. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2017; 69: 420-434.

O'Connell GD, Newman IB, Carapezza MA. Effect of long-term osmotic loading culture on matrix synthesis from intervertebral disc cells. *Biores Open Access.* 2014 Oct 1;3(5):242-9.

Oshima H, Ishihara H, Urban JPG, Tsuji H. The use of coccygeal disks to study intervertebral disc metabolism. *J Orthop Res.* 1993;11(3):332-8.

Oxland TR. Fundamental biomechanics of the spine— What we have learned in the past 25 years and future directions. *J Biomech.* 2016;49(6):817-32.

Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. An improved fluoresce assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1994;177(1-2):101-11.

Pazzaglia UE, Salisbury JR, Byers PD. Development and involution of the notochord in the human spine. *J R Soc Med.* 1989;82(7):413-5.

Priyadarshani P, Li Y, Yao L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24 (2):206-12.

Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(1):44-56.

Risbud MV, Schoepflin ZR, Mwale F, Kandel RA, Grad S, Iatridis JC, Sakai D, Hoyland JA. Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual meeting. *J Orthop Res*. 2015;33(3):283-93.

Rosenzweig DH, Fairag R, Mathieu AP, Li L, Eglin D, Este MD, Steffen T, Weber MH, Ouellet JA, Haglund L. Thermo reversible hyaluronan-hydrogel and autologous nucleus pulposus cell delivery regenerates human intervertebral discs and ex vivo, physiological organ culture model. *Eur Cell Mater*. 2018;36:200-17.

Roughley PJ, Alini M, Antoniou J. The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(6):869-74.

Roughley PJ, Lamplugh L, Lee ER, Matsumoto K, Yamaguchi Y. The role of hyaluronan produced by Has2 gene expression in development of the spine. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36(14):E914-20.

Saggese T, Thambyah A, Wade K, McGlashan SR. Differential Response of Bovine Mature Nucleus Pulposus and Notochordal Cells to Hydrostatic Pressure and Glucose Restriction. *Cartilage*. 2020;11(2):221-233.

Sakai D, Schol J. Cell therapy for intervertebral disc repair: Clinical perspective. *J Orthop Translat.* 2017;9:8-18.

Sakai K, Kimata K, Sato T, Gotoh M, Narimatsu H, Shinomiya K, Watanabe H. Chondroitin sulfate N-Acetylgalactosaminyltransferase-1 plays a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. *J Biol Chem.* 2007;282(6):4152-61.

Sato K, Kikuchi S, Yonezawa T. In vivo intradiscal pressure measurement in healthy individuals and in patients with ongoing back problems. *Spine (Phila Pa 1976).* 1999;24(23):2468-74.

Sato T, Ikehara Y, Ogawa H, Hirano T, Kiyohara K, Hagiwara K, Togayachi A, Ema M, Takahashi S, Kimata K, Watanabe H, Narimatsu H. Chondroitin sulfate NAcetylgalactosaminyltransferase 1 is necessary for normal endochondral ossification and aggrecan metabolism. *J Biol Chem.* 2011;286(7):5803-12.

Scaal M. Early development of the vertebral column. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;49:83-91.

Senteler M, Weisse B, Rothenfluh DA, Farshad MT, Snedeker JG. Fusion angle affects intervertebral adjacent spinal segment joint forces-model-based analysis of patient specific alignment. *J Orthop Res* 2017;35:131-9.

Seol D, Choe H, Zheng H, Jang K, Ramakrishnan PS, Lim TH, Martin JA. Selection of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in organ culture of the rat and rabbit intervertebral disc. *BMC Res Notes* 2011;4:162-3.

Shah BS, Chahine NO. Dynamic Hydrostatic Pressure Regulates Nucleus Pulposus Phenotypic Expression and Metabolism in a Cell Density-Dependent Manner. *J Biomech Eng.* 2018;1(2):140-1.

Shekelle PG, Markovich M, Louie R. An epidemiologic study of episodes of back pain care. *Spine (Phila Pa 1976).* 1995;20(15):1668-73.

Silagi ES, Shapiro IM, Risbud MV. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: Dysregulation and the pathogenesis of disc degeneration. *Matrix Biol.* 2018;71(72):368-79.

Sivan SS, Neidlinger-Wilke C, Würtz K, Maroudas A, Urban JP. Diurnal fluid expression and activity of intervertebral disc cells. *Biorheology.* 2006;43(4):283-91.

Sivan SS, Wachtel E, Roughley P. Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(10):3181-9.

Sive JI, Baird P, Jeziorsk M, Warkins A, Hoyland JA, Freemont AJ. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol Pathol.* 2002;55(2):91-7.

Smith LJ, Silverman L, Sakai D, Le Maitre CL, Mauck RL, Malhotra NR, Lotz JC, Buckley CT. Advancing cell therapies for intervertebral disc regeneration from the lab to the clinic: Recommendation of the ORS spine section. *JOR Spine.* 2018;1(4):e1036.

- Snider RK, Krumwiede NK, Snider LJ, Jurist JM, Lew RA, Katz JN. Factors affecting lumbar spinal fusion. *J Spinal Disord.* 1999;12(2):107-14.
- Thorpe PP, Li Y, Yao L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(2):206-12.
- Tran CM, Shapiro IM, Risbud MV. Molecular regulation of CCN2 in the intervertebral disc: lessons learned from other connective tissues. *Matrix Biol.* 2013;32(6):298-306.
- Tyrrell AR, Reilly T, Troup JDG. Circadian variation in stature and the effects of spinal loading. *Spine (Phila Pa 1976).* 1985;10(2):161-4.
- Urban JPG, McMullin JF. Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: Influence of age, spinal level, composition, and degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 1988;13(2):179-87.
- Urban JP. The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(1):858-64.
- Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(3):120-30.
- van Dijk BG, Potier E, Ito K. Culturing bovine nucleus pulposus explants by balancing medium osmolarity. *Tissue Eng Part C.* 2011;17 (11):1089-96.
- van Dijk BG, Potier E, Ito K. Long-term culture of bovine nucleus pulposus explants in a native environment. *Spine J.* 2013;13(4):454-63.

Vergroesen PP, van der Veen AJ, van Royen BJ, Kingma I, Smit TH. Intradiscal pressure depends on recent loading and correlates with disc height and compressive stiffness. *Eur Spine J.* 2014;23 (11):2359-68.

Vergroesen PP, van der Veen AJ, Emanuel KS. The poroelastic behaviour of the intervertebral disc: a new perspective on diurnal fluid flow. *J Biomech.* 2016;49(6):857-63.

Vergroesen PP, Emanuel KS, Peeters M, Kingma I, Smit TH. Are axial intervertebral disc biomechanics determined by osmosis? *J Biomech.* 2018;70:4-9.

Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, Karousou E, Viola M, Bartolini B, Hascall VC, Tammi M, De Luca G, Passi A. Role of UDP-N-Acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis. *J Biol Chem.* 2012;287(42):35544-55.

Vinardell T, Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Eng Part A.* 2012;18 (11-12):1161-70.

Walker MH, Anderson DG. Molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2004;4(6):158S-66S.

Walter BA, Korecki CL, Purmessur D, Roughley PJ, Michalek AJ, Iatridis JC. Complex loading affects intervertebral disc mechanics and biology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(8):1011-8.

Wang Z, Leng J, Zhao Y, Yu D, Xu F, Song Q, Qu Z, Zhuang X, Liu Y. N-Cadherin Maintains the Healthy Biology of Nucleus Pulposus Cells under High-Magnitude Compression. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(6):2327-37.

Wilke HJ, Neef P, Caimi M. New in vivo measurement of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(8):755-62.

Wilke HJ, Rohlmann A, Neller S, Graichen F, Claes L, Bergmann G. A Novel Approach to Determine Trunk Muscle Forces During Flexion and Extension: A Comparison of Data From an In Vitro Experiment and In Vivo Measurements. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(23):2585-93.

Wong J, Sampson SL, Bell-Briones H, Ouyang A, Lazar AA, Lotz JC, Fields AJ. Nutrient supply and nucleus pulposus cell function: effects of the transport properties of the cartilage endplate and potential implications for intradiscal biologic therapy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27(6):956-64.

Wuertz K, Urban JP, Klasen J. Influence of extracellular osmolarity and mechanical stimulation on gene expression of intervertebral disc cells. *J Orthop Res*. 2007;25(11):1513-22.

Xu Y, Yao H, Li P, Xu W, Zhang J, Lv L, Teng H, Guo Z, Zhao H, Hou G. Dynamic compression promotes the matrix synthesis of nucleus pulposus cells through up-regulating NCDH expression in a perfusion bioreactor culture. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(2):482-91.

Yuan M, Pai PJ, Liu X, Lam H, Chan BP. Proteomic analysis of nucleus pulposus cell derived extracellular matrix niche and its effect on phenotypic alteration of dermal fibroblasts. *Sci Rep.* 2018;8(1):1512.

Zhou H, Shi J, Zhang C, Li P. Static compression down-regulates N-cadherin expression and facilitates loss of cell phenotype of nucleus pulposus cells in a disc perfusion culture. *Biosci Rep.* 2018;38(1):20151551.

NORMAS ADOTADAS

Ferreira LM. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. São Paulo: Ed RED Publicações; 2017. 118p.

Terminologia anatômica internacional. Federative Committee on Anatomical Terminology. Tradução da comissão de terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. Barueri: Manole; 2001. 248p.

Ledur PF. Guia prático da nova ortografia: as mudanças do Acordo Ortográfico. 7ed. Porto Alegre: AGE, 2009. 976p.

ANEXO



Shuichi Mizuno, Ph.D.
Assistant Professor
Orthopedic Surgery
mizuno@partners.org

75 Francis Street
Boston, MA 02467
Ph: 617-732-5263
Fax: 617-735-0679

May 01, 2019

To Whom It May Concern:

In our experiment we are going to purchase fresh bovine tails from a local USDA - certified slaughterhouse. Therefore it is not required approval of our Institutional Review Board and Institutional Animal Care.

Shuichi Mizuno , Ph.D.
Fabio Antonio Vieira MD

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Shuichi Mizuno'.



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E OSMOLAR NA RESPOSTA METABÓLICA DAS CÉLULAS DO NÚCLEO PULPOSO IN VITRO.", protocolada sob o CEUA nº 4876030418 (ID 008653), sob a responsabilidade de **Fábio Antonio Vieira e equipe; Lydia Masako Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 06/06/2019.

We certify that the proposal "Changes in combined hydrostatic and osmotic pressures alter metabolic turnover in nucleus pulposus cells in vitro", utilizing 0 Bovines (), protocol number CEUA 4876030418 (ID 008653), under the responsibility of **Fábio Antonio Vieira and team; Lydia Masako Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 06/06/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2019](#) a [10/2019](#)

Área: [Medicina Translacional/medicina](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 semanas](#)

N: [0](#)

Linhagem: [Padrão do laboratório](#)

Peso: [200 a 300 kg](#)

Local do experimento: Laboratório do Hospital Brigham and Women/ Harvard

São Paulo, 02 de setembro de 2020

Prof. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo



Orthopaedic Research

60 Fenwood Road
BTM 5016
Boston, MA 02115

March 17, 2017

Dear Dr. Vieira,

We are pleased to invite you to come to the Department of Orthopaedic Surgery, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, as a visiting Ph.D. student/research fellow. We will start your research training on January 1, 2018, for a maximum of two years. From your record, your background and accomplishments are outstanding, and your English level is appropriate for training at BWH.

All your expenses, including travel and living expenses are documented to be supported by scholarship and private funds. You are required to maintain medical insurance while you are with us. You will come to our institution under a J1-visa. Our institution will not charge you tuition and/or registration fee for research studies.

As planned, you will be hosted by James Kang, MD and Shuichi Mizuno, PhD. You will receive training in research methods, statistical analyses, and scientific writing. We have focused on effects of changes in physicochemical stresses (osmotic and hydrostatic pressure, and shear stress) on nucleus pulposus cells. We propose that your research training will concern the effects of these stresses on degeneration and homeostasis in intervertebral discs. This project will advance the field of intervertebral disc mechanobiology by optimizing *in vitro* physicochemical stress conditions to recapitulate *in vivo* physical movement. A thorough understanding of how these stress variables affect matrix homeostasis will fill a large gap that exists in the field of intervertebral disc biology and ultimately help in the development of biological strategies for treating intervertebral disc degeneration.

In order to introduce you to our laboratory, methods, and equipment, we plan that you will be initially trained by participating in ongoing projects; this is estimated to last for a few weeks. If your data are used in manuscripts, you will be a co-author or first author, depending upon your contribution and role in writing the first draft of a manuscript. We will help to schedule your work so that you can maximize your learning, productivity, and publications. Our department will provide you with the necessary research environment. You are invited to attend Ground Rounds in Orthopaedics, Orthopaedic Translational Research Seminar, and Spine Conferences.

We look forward to meeting you and are sure that this will be a profitable and productive visit.

Sincerely,

James D. Kang, MD
Chairman, Department of Orthopaedic Surgery
Brigham and Women's Hospital
Thornhill Family Professor, Harvard Medical School

Shuichi Mizuno, PhD
Scientist, Department of Orthopaedic Surgery
Brigham and Women's Hospital
Assistant Professor, Harvard Medical School



Dear Fabio Vieira:

Congratulations! On behalf of the ORS Scientific Program Committee I am happy to inform you your abstract has been chosen to be presented at the ORS 2020 Annual Meeting as a POSTER presentation. Details regarding your presentation are noted below:

POSTER SESSION #: PS2-090
 POSTER CATEGORY: Spine - Injury and Healing
 POSTER #: 1815
 POSTER TITLE: Reproducing Homeostasis In Nucleus Pulposus By Mimicking Diurnal Spinal Motion In Vitro
 AUTHORS: Fabio Antonio Vieira; James D. Kang; Lydia M. Ferreira; Shuichi M. Mizuno

IMPORTANT NEXT STEPS

Edit Your Abstracts

Authors can make corrections to their abstract using the online system

<https://www.abstractsonline.com/dashboard/login.asp?ald=415&targetMKey={DA1513FF-5D43-4396-AD81-FB1749EAA478}&targetMod=submit> through **November 13, 2019**. After this date, no further edits can be made.

Book Your Hotel Accommodations

The ORS works hard to ensure that we offer you the best hotel rates in Phoenix, at properties that are a short walking distance to the convention center and provide you with the comforts of home. Book your room today at <https://www.ors.org/2020-hotels-travel/>

Register for the Meeting

As agreed in your abstract submission, as a Poster Presenter you are required to register for, pay the registration fee, and attend the ORS 2020 Annual Meeting. Register today to take advantage of the lowest registration rates at <https://www.ors.org/2020-am-reg/>

POSTER SESSION INFORMATION

Poster Session 1 (PS1): Posters displayed Saturday and Sunday -

You are required to be at your poster during the designated times noted below:

EVEN # Posters will present on Saturday, February 8, 10:15 AM – 11:15 AM;

ODD # Posters will present on Sunday, February 9, 10:15 AM – 11:15 AM

A Poster Reception will be held on Saturday, February 8, 5:30 PM – 7:00 PM

Poster Session 2 (PS2): Posters displayed Monday and Tuesday.

You are required to be at your poster during the designated times noted below:

EVEN # Posters will present on Monday, February 10, 10:15 AM – 11:15 AM;

ODD # Posters will present on Tuesday, February 11, 9:00 AM – 10:00 AM

A Poster Reception will be held on Monday, February 10, 5:30 PM – 7:00 PM

POSTER FORMAT: Poster size for the ORS 2020 Annual Meeting is 45"x 45".

Posters must reflect the material summarized in your submitted abstract. Information for poster presenters - including poster set-up, dismantle, etc. is available on the ORS 2020 Annual Meeting website at <https://www.ors.org/2020-poster-presenter-speaker-moderator-info/>.

POSTER PRINTING SERVICE

ORS will offer a Poster Printing Service through a third-party, Learner's Digest International (LDI). POSTER presenting (presenting authors) will receive an e-mail in December from LDI with information on the ORS Poster Printing Services. Poster presenters wanting to take advantage of this service will be able to pick up their poster upon arrival to the Phoenix Convention Center and do not have to travel with their poster.

Please confirm your receipt of this notification by clicking the link below.

If you have any questions, please contact us at orsabstracts@ors.org or 847-823-5770.

We look forward to seeing you in Phoenix!

Sincerely,

William Mihalko, MD, PhD
 Chair, Scientific Program Committee
 Orthopaedic Research Society

And

Matt Zuleg
 Manager, Annual Meeting Scientific Program