

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DAS CÉLULAS-TRONCO E SULFATO DE CONDROITINA IN VIVO NO DISCO INTERVERTEBRAL DEGENERADO: REVISÃO SISTEMÁTICA

REUSING, Mhayara Samile de Oliveira¹

WEBER, Saulo Henrique²

VILLANOVA JR, José Ademar³

RESUMO

A doença do disco intervertebral (DDIV) é responsável pela diminuição da qualidade de vida dos indivíduos afetados, provocando dor e limitações motoras, sensitivas e autônomas. Diversas abordagens terapêuticas são estudadas visando reverter o quadro degenerativo do disco intervertebral (DIV) para restaurar seu aspecto anatomofuncional. Esses estudos geralmente são realizados a partir de lesões induzidas em modelo animal para padronização da lesão. As principais terapias regeneradoras podem ser classificadas em reconstrutivas com a injeção de substâncias da matriz extracelular (MEC) como glicosaminoglicanos (GAG), ou regenerativas, com o uso de células-tronco (CT) capazes de se diferenciar e exercer o papel das células do núcleo pulposo (NP) e ânulo fibroso (AF). Essa revisão sistemática visou comparar os efeitos terapêuticos das CT e do sulfato de condroitina (SC) no tratamento da DDIV in vivo. As bases científicas *Pubmed*, *Scopus* e *Google Scholar* foram acessadas com os termos de busca e operadores Booleanos (“stem cell” and “chondroitin sulfate” and “intervertebral disc”) e os artigos da busca em língua inglesa foram selecionados. Os estudos incluídos fizeram o uso de CT da medula óssea (caprinos), tecido adiposo (ratos), células do NP (coelhos) em aplicação única com quantidade variável de CT intradiscal com carreador de hidrogel composto de SC e grupo controle positivo, realizando-se exames histológicos, de imagem e imuno-histoquímicos. Dada a escassez de literatura e grande número de variáveis atreladas às pesquisas, mais estudos são necessários para comparar os efeitos terapêuticos do uso isolado ou associado das CT e SC no tratamento da DDIV in vivo.

PALAVRAS-CHAVE: Degeneração do disco intervertebral. Proteoglicanos. Glicosaminoglicanos. Terapia celular.

COMPARISON OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF STEM CELLS AND CHONDROITIN SULFATE IN VIVO ON DEGENERATED INTERVERTEBRAL DISC: SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT

Intervertebral disc disease (IVDD) is responsible for reducing the quality of life of affected individuals, causing pain, motor, sensory and autonomous limitations. Several therapeutic approaches are studied in order to reverse the degenerative condition of the intervertebral disc (IVD) to restore its anatomical and functional aspect. These studies are usually carried out from lesions induced in an animal model to standardize the lesion. The main regenerative therapies can be classified as reconstructive, with the injection of extracellular matrix (ECM) substances, such as glycosaminoglycans (GAG), or regenerative, with the use of stem cells (SC) capable of differentiating and playing the role of nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus (AF) cells. This systematic review aimed to compare the therapeutic effects of CT and chondroitin sulfate (SC) in the treatment of IVDD in vivo. The scientific databases Pubmed, Scopus and Google Scholar were accessed with the search terms and Boolean operators (“stem cell” and “chondroitin sulfate” and “intervertebral disc”) and the research articles in English were selected. The included studies used bone marrow CT (goats), adipose tissue (rats), PN cells (rabbits) in a single application with a variable amount of intradiscal CT with a hydrogel carrier composed of SC and a positive control group, performing histological, imaging and immunohistochemical tests. Given the scarcity of literature and the large number of variables linked to research, more studies are needed to compare the therapeutic effects of the isolated or combined use of CT and SC in the treatment of IVDD in vivo.

KEYWORDS: Intervertebral disc degeneration. Proteoglycans. Glycosaminoglycans. Cell therapy.

¹ Discente do Programa de Pós-Graduação da PUCPR. E-mail: mhaysa@live.com

² Docente do programa de Pós-Graduação da PUCPR. E-mail: saulo.weber@pucpr.br

³ Docente do programa de Pós-Graduação da PUCPR. E-mail: jose.villanova@pucpr.br

1. INTRODUÇÃO

O DIV é anatomicamente composto pelo AF com lamelas concêntricas de fibras colágenas circundando o NP com a MEC, ambos com esparsa celularidade (MOHD ISA; TEOH; MOHD NOR; MOKHTAR, 2022). A absorção de choques ocorre pela característica gelatinosa do NP sendo sua função amortecer as cargas e permitir a mobilidade da coluna vertebral (AMELOT; MAZEL, 2018).

Sua composição bioquímica é de extrema importância funcional, uma vez que a cartilagem possui alto teor de PG e colágeno, que conferem resistência e elasticidade ao disco (SILAGI; SHAPIRO; RISBUD, 2018). A MEC do DIV é rica em ácido hialurônico, que ajuda a manter a estrutura do disco e a reter água, possibilitando que ele suporte cargas compressivas (ROUGHLEY, 2004). As células presentes no DIV são os fibroblastos, que sintetizam as fibras de colágeno e PG, e os condrócitos, que são responsáveis pela manutenção e regeneração do tecido cartilaginoso (JIN; LIU; SCOTT; ZHANG *et al.*, 2014).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PROCESSO DE DEGENERAÇÃO NA DDIV

A DDIV pode ocorrer naturalmente com o envelhecimento ou precocemente por fatores como má postura e sobrecarga (ROUGHLEY, 2004). Essa degeneração progressiva leva à doença do DIV, que causa dor e limitação funcional. Os impactos diretos ou indiretos socioeconômicos dessa doença incluem os gastos com tratamentos clínicos ou cirúrgicos e o afastamento do trabalho (ALONSO-GARCÍA; SARRÍA-SANTAMERA, 2020).

A diminuição da pressão osmótica do DIV e a redução da quantidade de PG contribuem para a perda da capacidade do disco em se manter hidratado e para sua instabilidade progressiva, tornando-o mais suscetível a lesões (BEATTIE, 2008). O desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias (catabólicas) e fatores anabólicos dentro dos DIVs é o principal fator agravante da DDIV (MERN; WALSEN; BEIERFUß; THOMÉ, 2021). Esse desequilíbrio culmina com a perda de PG, desorganização estrutural, e desidratação, afetando a capacidade dos DIVs de suportar cargas (MILLWARD-SADLER; COSTELLO; FREEMONT; HOYLAND, 2009). Fatores desencadeantes da DDIV levam ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1b, interleucina-6, interleucina-17 e sulfato de heparina de superfície celular (NAVONE; MARFIA; GIANNONI; BERETTA *et al.*, 2017).

As citocinas pró inflamatórias, por sua vez, aumentam os níveis de expressão de enzimas catabólicas, como desintegrina e metaloproteinase, que substancialmente afetam a reposição da MEC dentro dos DIVs (LYU; CUI; PAN; MC CHEUNG *et al.*, 2021). A diminuição da reposição da MEC reduz a espessura discal e predispõe a fissuras anulares e colapso do espaço intervertebral, podendo progredir para extrusão ou protrusão do DIV (MARTINS; MEDEIROS; WAJCHENBERG; PAREDES-GAMERO *et al.*, 2018; WU; KIM; JANG, 2020). Além da dor por compressão de raízes nervosas da medula espinhal, a invasão de ramos sensitivos induzidos por neutrotrofinas desencadeia o aumento da sensibilidade no processo denominado de dor discogênica (LYU; CUI; PAN; MC CHEUNG *et al.*, 2021; PENG; HAO; HOU; WU *et al.*, 2006).

2.2 TERAPIAS REGENERADORAS DO DIV

Vários estudos in vivo têm demonstrado estratégias com efeitos biológicos promissores para desacelerar a degeneração discal ou restaurar a estrutura anatomofuncional dos DIV (ZHANG; SUN; LI; YANG *et al.*, 2022). As terapias biorregeneradoras incluem transplante de CT, terapia genética, aplicações de fatores bioativos e *bioscaffolds*, ou uma combinação dos mesmos (MASUDA, 2008; TILOTTA; VADALÀ; AMBROSIO; CICIONE *et al.*, 2023).

O princípio dessas terapias é minimizar o desequilíbrio por meio da regulação negativa dos fatores inflamatórios e catabólicos ou positiva dos fatores anticatabólicos e anabólicos, inibindo a degradação da MEC ou promovendo sua síntese dentro dos DIVs, respectivamente (HUGHES; FREEMONT; HUKINS; MCGREGOR *et al.*, 2012). Por exemplo, em vários estudos in vivo, a regulação positiva intradiscal do anabolismo da matriz tem sido tentada usando transplante de células combinado com fatores de crescimento (TGF- β 1, TGF- β 3, IGF, BMP2, BMP4, BMP6, BMP7) (CHEN; ZHANG; ZHANG; ZHOU *et al.*, 2019; HIYAMA; SAKAI; TANAKA; ARAI *et al.*, 2011; MASUDA, 2008). Outros estudos associam o transplante de células e terapia gênica com aplicações de fatores bioativos e *bioscaffolds* (PENG; DU; ZHANG; CHEN *et al.*, 2023). Além disso, CT e condrócitos podem ser colhidos, expandidos in vitro, geneticamente modificados e injetado intradiscalmente para favorecer a regeneração de discos degenerados (KHALID; EKRAM; SALIM; CHAUDHRY *et al.*, 2022). A combinação de ambas as abordagens pode ser mais importante para alcançar resultados aditivos, ou seja, a inibição da degradação de MEC junto com sua restauração (MERN; WALSEN; BEIERFUß; THOMÉ, 2021).

Considerando que a condroitina é o principal dissacarídeo que compõe as GAG da MEC, alguns estudos avaliam o uso da mesma em diferentes associações quanto ao seu potencial restaurador do DIV (BORRELLI; BUCKLEY, 2020; HUANG; ZHUANG; LI; LIU *et al.*, 2011; NAKASHIMA;

MATSUYAMA; TAKAHASHI; SATOH *et al.*, 2009; STUBER; SAJKO; KRISTMANSON, 2011). O objetivo dessa revisão sistemática foi avaliar e comparar os efeitos terapêuticos das CT e do SC no tratamento da degeneração do disco intervertebral in vivo.

3. METODOLOGIA

A presente revisão sistemática foi embasada na metodologia de Prática Baseada em Evidências, que parte do acrônimo PICO para construção da pergunta de pesquisa (SANTOS; PIMENTA; NOBRE, 2007): **P**opulação, **I**ntervenção, **C**ontrole e **O**utcomes" (desfecho). Assim, o foco de pesquisa para “população” foi composto por modelos animais com DDIV, o tratamento de “Intervenção” foi a terapia com CT, o grupo para “controle” foi o controle positivo com SC e o “outcome” foram os resultados do uso isolado ou associado de células-tronco e sulfato de condroitina sobre a espessura do DIV e escores histopatológicos. A partir da pergunta de pesquisa: “A terapia com CT tem efeitos terapêuticos superiores ao uso de SC no tratamento da degeneração do DIV?” foram listados os termos de busca conforme a tabela 1.

Tabela 1 – Termos de busca da estratégia PICO para revisão sistemática e indicadores booleanos.

P		I		C	O
“Intervertebral disc disease”	and	“Embryonic pluripotent stem cell”	and	“Chondroitin sulfate”	Os desfechos foram resultados do uso isolado ou associado de células-tronco e sulfato de condroitina sobre a espessura do DIV e escores histopatológicos.
or		or		or	
“Intervertebral disc degeneration”		“Induced pluripotent stem cell”		or	
or		or		“Glicosaminoglycan”	
“Herniated disc”		“Adult stem cell”			
or		or			
“Ruptured disc”		“Somatic stem cell”			
or		or			
“Annular fissure”		“Embryonic Stem Cell”			
or		or			
“Protrusion”		“Induced pluripotent stem cell”			
or		or			
“Extrusion”		“Mononuclear stem cell”			
or		or			
“Degenerated disc”		“Bone marrow-derived stem cell”			
		or			
		“Mesenchymal stem cell”			

Fonte: Elaborada pelos autores.

As bases de busca utilizadas para essa revisão sistemática foram: Scopus, Pubmed e Google Scholar, sendo que os critérios de exclusão e inclusão estão listados na tabela 2.

Tabela 2 – Critérios de inclusão e exclusão dos artigos da revisão sistemática nas fases de análise de título, resumo e artigo na íntegra.

Critérios de inclusão	Critério de exclusão
Estudos clínicos randomizados	Estudos in vitro
Modelo animal de degeneração do disco intervertebral	Estudos ex vivo
Grupo de tratamento (intervenção) com CT ou SC + CT	Estudos clínicos em seres humanos
Grupo controle positivo com SC	Revisões bibliográficas, teses, dissertações e relatos de caso
	Outro objeto de estudo (intervenção diferente de CT e SC, grupo controle diferente de SC, outra região avaliada como articulações do joelho ou quadril)
	Artigos em idiomas diferentes do Inglês

Fonte: Elaborada pelos autores.

A exclusão por títulos foi realizada aos pares, por dois revisores que adotaram os seguintes critérios para consenso na decisão de exclusão: a) estudos in vitro, b) estudos ex vivo, c) revisões bibliográficas, d) estudos clínicos em seres humanos, e) teses e dissertações, f) relatos de caso. Após exclusão por títulos, os artigos selecionados passaram pela etapa de exclusão por resumo, ampliando-se os critérios de exclusão já listados na etapa de exclusão por título para: a) outro objeto de estudo (intervenção, grupo controle, paciente) e b) artigos em idiomas diferentes do inglês. Foi utilizado a escada de Jadad *et al.*, 1996(JADAD; MOORE; DAWN CARROLL; JENKINSON *et al.*, 1996) através da classificação de Abraham *et al.*, 2004 para determinação da qualidade dos artigos incluídos, em que escores iguais ou inferiores a 3 são classificados como baixa qualidade e escores de 4 ou superiores são de boa qualidade.

4. ANÁLISES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

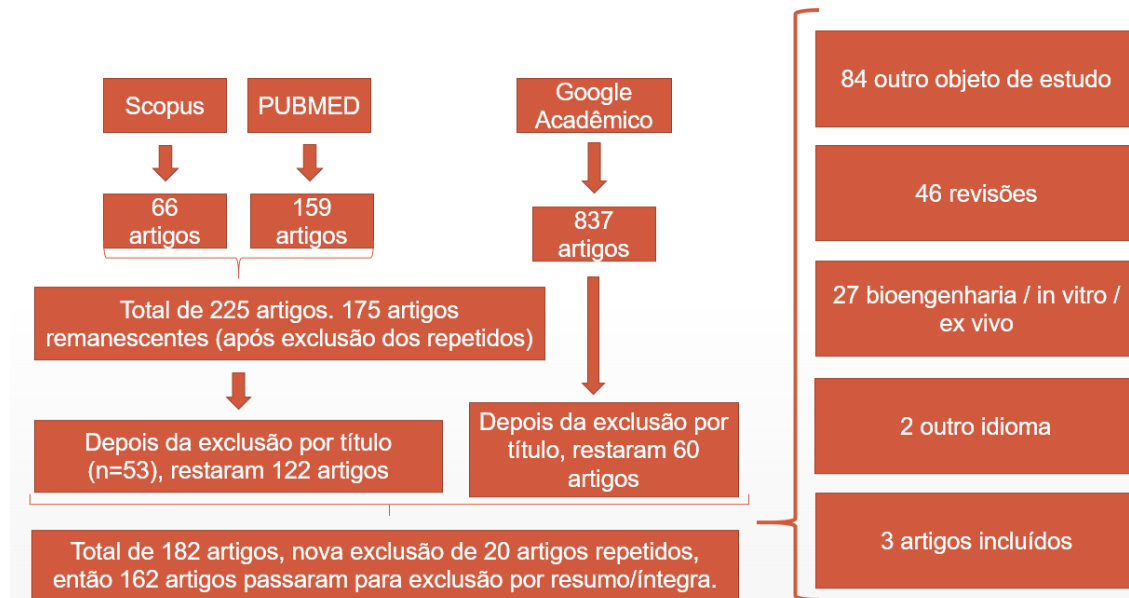
Os resultados obtidos nas buscas primárias nas bases Scopus, Pubmed e Scholar Google foram de 159, 66 e 837 artigos respectivamente.

Dos artigos advindos da busca do Scopus e Pubmed (total 225) restaram 175 artigos após exclusão automática dos títulos repetidos. Os artigos da busca do Scholar Google (total 837), devido ao formato da ferramenta de busca e exportação, passaram diretamente por exclusão por título, restando 60 artigos, adicionados à biblioteca para exportação em formato de lista. Esses artigos foram então adicionados à lista dos artigos selecionados das demais bases, totalizando 235 artigos e, então, nova exclusão dos repetidos (n=21) foi realizada, restando 214 artigos para etapa de exclusão por resumo.

Dos 214 artigos restantes após exclusão por título das três bases de busca, restaram 162 artigos para exclusão por resumo ou acesso na íntegra. Apenas três estudos atenderam aos critérios de

inclusão e exclusão para a ficha de extração de dados. O processo de busca e exclusão dos artigos por título e resumo está resumido no fluxograma da figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de etapas de seleção e exclusão dos artigos para a revisão sistemática.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Os aspectos metodológicos como a divisão dos grupos de estudo e respectivas intervenções, avaliações realizadas e os resultados significativos obtidos em cada estudo foram considerados para resultados e discussão dos artigos incluídos nessa revisão. Os resultados obtidos após extração dos aspectos relevantes dos artigos selecionados para essa revisão sistemática estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 – Dados do delineamento dos estudos e resultados obtidos das referências incluídas na revisão sistemática da comparação dos efeitos terapêuticos das células-tronco e sulfato de condroitina in vivo no disco intervertebral de degenerado.

Referência	Delineamento do estudo		Avaliações realizadas	Intervenção (CT)	Controle (SC)	Tempo de avaliação	Resultados significativos:
	Modelo Animal	Grupos					
(ZHOU; WANG; FANG; TAO <i>et al.</i> , 2018).	Ratos: Sprague Dawley, DDIV induzida por punção cirúrgica.	Duas semanas após a intervenção cirúrgica de indução da lesão, divisão dos 80 animais em cinco grupos: 1) Controle: sem procedimentos e tratamentos 2) Degeneração: apenas procedimento + injeção com Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) 3) Colágeno e sulfato de condroitina (CSC): lesão induzida e injeção discal de 0.02% genipina cross-linked CCS 4) CT derivadas do tecido adiposo (CT-DA): lesão induzida e injeção de CTDA 5) Ambas as intervenções: (CSC+CT-DA): lesão induzida e injeção de ambos os tratamentos	Radiografia, ressonância magnética (espessura do DIV), análises histopatológicas (classificação por escores da lesão), detecção bioquímica de DNA (celularidade), detecção de colágeno (hidroxiprolina) e proteoglicano (PG).	Origem: células tronco derivadas do tecido adiposo de Ratos Sprague Dawley (Cyagen Biosciences) Aplicação única, duas semanas após a lesão. Quantidade injetada: 2x10⁶	Aplicação única de 3mg/mL colágeno tipo II 8.1 mg/mL Sulfato de condroitina, 1X soro fetal bovino. Intradiscal duas semanas após a lesão	Avaliações foram realizadas 0, 4, 8, 16 semanas após a aplicação dos tratamentos	Espessura do DIV: CSC+CT-DA foi maior que o grupo degeneração e CT-DA nas semanas 4,8 e 16. CSC+CT-DA foi maior que o grupo controle na semana 16. Distribuição dos componentes da matriz extracelular (MEC) e células estavam mais organizadas no grupo CSC+CT-DA do que no grupo degeneração, com expressão mais significativa de hidroxiprolina (indicador de colágeno) na semana 16 em comparação com grupo degeneração, CSC e CT-DA. Escores histopatológicos: CSC+CT-DA melhor do que CSC, CT-DA e grupo degeneração na semana 16: Controle (5.2 ± 0.5), degeneração (12.8 ± 0.8), CSC (9.8 ± 0.8), CT-DA (10.2 ± 1.3), CSC+CT-DA (7.4 ± 1.1).
(ZHANG; DRAPEA U; AN; THONAR <i>et al.</i> , 2011).	Caprinos da raça Núbia, machos, 4 anos de idade, com DDIV induzida por punção cirúrgica.	Um mês após a injúria induzida do disco intervertebral (DIV), 24 animais foram divididos em três grupos para injeção intradiscal de:	Ressonância magnética (espessura do DIV), análises histopatológicas, detecção	Aspirado de medula óssea de macho raça Boer. Aplicação única 1 mês após a lesão.	40 µl de hidrogel (controle +) ou solução salina (controle -)	Avaliações foram realizadas 3 e 6 meses após a injeção.	1)Espessura do DIV: 3 e 6 meses – sem diferença entre grupo tratado x grupos controle (hidrogel e salina) 2) Sem resultados histopatológicos

		1) Células tronco derivadas da medula óssea (CT-MO) suspensas em hidrogel* 2) Hidrogel (controle +); 3) Solução salina (controle -) *Mistura de polietilenoglicol-diacrilato, sulfato de condroitina e ácido hialurônico de alto peso molecular.	bioquímica de DNA (celularidade), detecção de colágeno (hidroxiprolina) e PG.	Quantidade injetada: 10 µl de 2.5 × 10⁵ células em PBS + hidrogel		3) Colágeno: aos 3 meses – sem diferença tanto no núcleo pulposo (NP) quanto no ânulo fibroso (AF) para grupo tratado x controles. 6 meses: Grupo tratado, Núcleo pulposo 79% mais colágeno que o grupo hidrogel, e 83% mais que o grupo salina. AF sem diferença. 4) PG: sem diferença em 3 meses. Aos 6 meses: CT-MO: NP com 45% mais do que grupo hidrogel, 127% mais que o grupo salina. Ânulo fibroso sem diferença. Análise macro: tecido luscente de regeneração no local da lacuna da lesão no grupo 1. Índice de sinal de intensidade na ressonância magnética: grupo 1 maior aos 6 meses comparando-se ao 3º e 1º mês. Outros grupos reduziram o índice ao longo das avaliações. Ainda com a RM: espaço intervertebral (IV) sem alteração no grupo 1, porém redução nos demais grupos ao longo das avaliações. Assim como o Bradner Disc Index foi maior em todas as avaliações comparando o grupo 1 com os demais. Distribuição dos componentes da MEC e células: grupo 3 lesão ainda aparente, grupo 2 resquícios de materiais não degradados, mas sem celularidade, e grupo 1: grande quantidade de células com
(ZHOU; WANG; FANG; TAO <i>et al.</i>, 2018).	24 Coelhos Neozelandeses, DDIV induzida por punção cirúrgica.	Imediatamente após a intervenção cirúrgica de indução da lesão, divisão dos 24 animais em 3 grupos (6 animais/grupo): *não citam sobre os outros animais (total 24, mas utilizaram 18 animais, sendo 6 por grupo): 1) nucleotomia + CT + <i>scaffold</i> 2) nucleotomia + <i>scaffold</i> (controle positivo) 3) Apenas nucleotomia (controle negativo)	Radiografia, ressonância magnética (espessura do DIV), análises histopatológicas (classificação qualitativa), viabilidade das células aloenxertadas.	Origem: células tronco derivadas do NP de coelhos neozelandeses de 3 semanas de idade. Aplicação única, imediatamente após a lesão. Quantidade injetada: 1x10⁵	Preparo prévio de <i>scaffold</i> com ácido hialurônico, colágeno tipo II e células-tronco.	Avaliações de imagem foram realizadas 1, 3 meses e 6 meses (imagem e histopatol.) após a aplicação dos tratamentos.

morfologia de condrócitos, 90%
viáveis as 24 semanas pós injeção.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Nenhum estudo comparando a terapia com CT por via sistêmica com uso de SC por via oral ou subcutânea foi encontrado. Somente três estudos avaliaram os efeitos terapêuticos das CT intradiscal utilizando carreadores à base de SC de forma associada ou isolada.

A tabela 4 apresenta a classificação dos artigos selecionados com relação à qualidade metodológica do estudo (JADAD *et al.*, 1996; ABRAHAM *et al.*, 2004).

Tabela 4 - Classificação dos artigos selecionados com relação à qualidade metodológica do estudo (JADAD; MOORE; DAWN CARROLL; JENKINSON *et al.*, 1996).

Item do escore (JADAD; MOORE; DAWN CARROLL; JENKINSON <i>et al.</i>, 1996).	Estudo em ratos (ZHOU; WANG; FANG; TAO <i>et al.</i>, 2018)	Estudo em cabras (ZHANG; DRAPEAU; AN; MARKOVA <i>et al.</i>, 2011)	Estudo em Coelhos (HUANG; ZHUANG; LI; LIU <i>et al.</i>, 2011)
Estudo descrito como randomizado?	1	1	1
Método da randomização bem descrito e apropriado?	1	1	1
Estudo descrito como duplo-cego?	1	0	0
Método duplo-cego bem descrito e apropriado?	1	0	0
Descrição dos indivíduos excluídos e desistências?	0	0	0
Subtrair 1 ponto caso o método da randomização tenha sido descrito, mas inadequado	0	0	0
Subtrair um ponto caso o método duplo-cego tenha sido descrito, porém inadequado	0	0	0
Escore total (5)	4	2	2

Fonte: Elaborada pelos autores.

A literatura sobre terapias regenerativas e reconstrutivas para o tratamento da DDIV é vasta, trazendo metodologias variadas em modelos experimentais de diferentes espécies e aplicação de componentes da MEC ou CT de diversas origens (GANEY; LIBERA; MOOS; ALASEVIC *et al.*, 2003; HIYAMA; MOCHIDA; IWASHINA; OMI *et al.*, 2008; HUANG; ZHUANG; LI; LIU *et al.*, 2011; MASUDA; AOTA; MUEHLEMAN; IMAI *et al.*, 2005; NAKASHIMA; MATSUYAMA; TAKAHASHI; SATOH *et al.*, 2009; OEHME; GHOSH; SHIMMON; WU *et al.*, 2014; SERIGANO; SAKAI; HIYAMA; TAMURA *et al.*, 2010; ZHANG; DRAPEAU; AN; MARKOVA *et al.*, 2011). Entretanto, outra revisão sistemática recente mais abrangente sobre terapias avaliadas no tratamento da DIV em diversos modelos de experimentação animal já havia indicado a escassez de estudos in vivo (MERN; WALSEN; BEIERFUß; THOMÉ, 2021).

Um estudo in vitro demonstrou que a inclusão de SC na composição do material injetado (MEC descelularizada de NP bovino) parece ser crítica para promover morfologia celular arredondada e posterior síntese de GAG e deposição de matriz semelhante ao NP. No entanto, os autores apontam que seria importante também determinar se os GAG sintetizados estão integrados a um PG para

reduzir a probabilidade de que eles possam se difundir facilmente para fora do órgão após serem sintetizados *in vivo* (BORRELLI; BUCKLEY, 2020). Diversos estudos fazem uso do SC como um composto importante na fabricação de biomateriais como base para injeção de CT (HAJIESMAILPOOR; MOHAMADI; FARZANEGAN; EMAMI *et al.*, 2023; PENG; DU; ZHANG; CHEN *et al.*, 2023). Entretanto, a expressiva maioria dos estudos utilizando SC por via oral ou subcutânea avalia seus efeitos em outras articulações como temporomandibular, quadril e joelhos (HANSON; SMALLEY; HUFF; WHITE *et al.*, 1997; HENROTIN; MARTY; MOBASHERI, 2014; KAHAN; UEBELHART; DE VATHAIRE; DELMAS *et al.*, 2009; MCCARTHY; O'DONOVAN; JONES; MCALLISTER *et al.*, 2007; RAYNAULD; PELLETIER; ABRAM; DODIN *et al.*, 2016; UEBELHART; THONAR; ZHANG; WILLIAMS, 1998).

Uma revisão sistemática de literatura corroborou evidenciando a falta de literatura, relatando apenas dois artigos avaliando o uso oral de glicosamina e condroitina no tratamento da DDIV ou artrose espinal (STUBER; SAJKO; KRISTMANSON, 2011). Um dos artigos foi considerado de baixa qualidade, mas relatou melhora no grupo tratado (FUJITA; OHUE; FUJII; MIYAUCHI *et al.*, 2002), e outro artigo foi considerado de boa qualidade, mas sem resultados significativos (PHILIPPI; LEFFLER; LEFFLER; MOSURE *et al.*, 1999). A pequena quantidade de artigos estudando a eficácia do SC no tratamento da DDIV, associado a metodologias e resultados conflitantes dificulta a recomendação do uso do nutracêutico com fins terapêuticos (STUBER; SAJKO; KRISTMANSON, 2011; TUDURY; JÚNIOR; SILVA; TRAJANO *et al.*, 2022).

Quanto ao uso isolado de CT, estudos *in vitro* apontam o potencial inibitório de células notocordais para invasão de vasos e nervos no disco intervertebral, resultado relacionado com potencial prevenção da dor discogênica (CORNEJO; CHO; GIANNARELLI; IATRIDIS *et al.*, 2015; PURMESSUR; CORNEJO; CHO; STOCK *et al.*, 2012; PURMESSUR; CORNEJO; CHO; ROUGHLEY *et al.*, 2015). Uma revisão sistemática da literatura sobre CT no tratamento da DDIV dividiu os artigos em três fases: a) fase 1: de 2005 a 2012, investigando principalmente diferenças de expressão gênica, diferenciação condrogênica de CTM e alterações da matriz extracelular no disco intervertebral; b) fase 2: de 2012 a 2017, investigando principalmente terapia de injeção de CTM e alterações no microambiente do disco intervertebral; fase 3 de 2017 a 2019, o foco principal dos estudos é terapia celular e regeneração discal promovida por CTM (ZHANG; ZHANG; SHI; WANG *et al.*, 2021). O direcionamento das pesquisas se dá através da extração de CTM e indução da sua diferenciação ao núcleo pulposo, secreção parácrina de CTM na função de CT e CTM combinadas com tecnologia de engenharia de tecidos para promover a regeneração do DIV (ZHANG; ZHANG; YANG; HUANG *et al.*, 2021).

Apesar do grande número de artigos e revisões bibliográficas sobre o uso de CT no tratamento da DDIV, poucos artigos comparam seus efeitos terapêuticos com o SC in vivo. Na presente revisão sistemática, apenas três artigos atenderam aos critérios de inclusão. Ainda, os artigos em cabras e coelhos foi classificado como de baixa qualidade, e o outro artigo em ratos, classificado como de boa qualidade.

Como semelhança entre as metodologias avaliadas nos estudos que atenderam os critérios de inclusão e exclusão, pode-se observar: a) utilização de modelos experimentais para indução da lesão através de punctura cirúrgica e avaliações realizadas: b) espessura do DIV, c) componentes da matriz extracelular, d) celularidade e e) análises histopatológicas. Porém o estudo em ratos considerou análises histológicas quantitativas e o estudo em coelhos a análise foi qualitativa, buscando avaliar a viabilidade celular.

Além disso, o tempo de espera entre lesão e intervenção também foi diferente entre os estudos: imediatamente após lesão, no mesmo estudo realizado em coelhos; duas semanas após a lesão no estudo em ratos, e quatro semanas após a lesão no estudo em cabras.

Vale ressaltar que o estudo em ratos contou com um grupo sem intervenção cirúrgica e terapêutica, grupo controle negativo (DMEM), grupo controle positivo (hidrogel), e grupos experimentais (grupo células-tronco e células tronco + hidrogel), em espécie com escores histopatológicos bem definidos (ZHOU; WANG; FANG; TAO *et al.*, 2018). Esse delineamento permitiu a avaliação dos discos normais, da efetividade da técnica na indução da lesão, da evolução da lesão induzida apenas aplicando-se DMEM, e a comparação dos grupos de intervenção com os grupos controle.

Já o delineamento do estudo em cabras foi baseado apenas em grupo experimental (células tronco + hidrogel) comparado ao grupo controle positivo (hidrogel) e negativo (solução salina). Assim, não foi possível a confirmação da indução da lesão nem a comparação com discos normais ao longo das avaliações, não apresentando os resultados dos escores histopatológicos descritos em material e métodos (ZHANG; DRAPEAU; AN; THONAR *et al.*, 2011). No estudo em coelhos (HUANG; ZHUANG; LI; LIU *et al.*, 2011), também foram agrupados em grupo intervenção já associando CT com scaffold no grupo de tratamento, comparando-se a controle positivo (nucleotomia e scaffold) e grupo controle negativo (apenas nucleotomia). Nesse estudo foi possível a determinação da lesão induzida, sem a presença de artefatos mencionados no estudo em cabras (ZHANG; DRAPEAU; AN; THONAR *et al.*, 2011), bem como as análises histológicas, ainda que qualitativas.

Além disso, os estudos em cabras e coelhos não realizaram o experimento com um grupo de tratamento apenas com intervenção por CT, e sim, utilizou o hidrogel com SC e outros compostos

(ácido hialurônico, colágeno tipo II) como carreador junto com a aplicação de CT. Assim, não foi possível acessar a efetividade das terapias de forma isolada, sobretudo do SC por estar associada a outros componentes da MEC. Outro fator limitante apontado foi a ausência de padronização dos escores histopatológicos em caprinos, impossibilitando a análise dos resultados das avaliações. Entretanto, em termos de medicina comparativa, a evolução da degeneração e reparação do DIV em caprinos se deu de forma mais lenta quando comparada a roedores, o que pode ser um fator mais intimamente ligado com a fisiopatologia mais crônica observada em seres humanos (ZHANG; DRAPEAU; AN; THONAR *et al.*, 2011).

Os próprios autores levantam a hipótese de os resultados terem sido afetados pela falta de padronização lesional ao exame histopatológico na espécie, e que a evolução da lesão induzida pode se dar de forma mais crônica em caprinos do que em outros modelos animais como coelhos e ratos (ZHANG; DRAPEAU; AN; THONAR *et al.*, 2011). Em contrapartida, em outro estudo em ovelhas, também modelo animal de grande porte, a injeção de CT no anel fibroso ou no núcleo pulposo do DIV degenerado resultou em melhoras significativas na graduação histopatológica do DIV (FREEMAN; KULIWABA; JONES; SHU *et al.*, 2016). Entretanto, esse estudo não realizou a comparação com um grupo tratado com SC, por isso não entrou nessa revisão sistemática.

O uso de hidrogel com alta injetabilidade e características viscoelásticas semelhantes ao NP, e boas propriedades de dissipação de energia e capacidade de intumescimento, preservou a vitalidade das CT do NP contra cargas patológicas e teve efeitos terapêuticos no reparo DIV em modelos induzido por punção ou incisão discal (JIA; LIN; WANG; WANG *et al.*, 2022). Porém, um ponto importante que pode influenciar nos resultados é o tempo pós-lesão para injeção do hidrogel. Em um estudo em macacos foi observado que o grupo em estágio da lesão moderada induzida por isquemia se beneficiou mais da aplicação do hidrogel do que estágios mais extremos sendo avançados ou leves (LIU; LI; HU; WANG *et al.*, 2020). A indução da lesão parece ocorrer de forma mais lenta em modelo animal de grande porte quando comparado aos roedores, devendo-se assim, levar em consideração o estágio da lesão em cada espécie para se obter melhores resultados (ZHANG; DRAPEAU; AN; MARKOVA *et al.*, 2011).

Já no estudo em ratos, a espessura do DIV, celularidade e componentes da MEC, bem como escores histológicos apresentaram-se significativamente melhores no grupo tratado com CT e SC comparando-se ora com o grupo controle com solução salina, ora com o grupo somente com hidrogel. Segundo os autores, o *bioscaffold* desenvolvido para aplicação de CT e hidrogel apresentou a biossegurança desejada e a terapia foi capaz de reparar parcialmente o DIV degenerado (ZHOU; WANG; FANG; TAO *et al.*, 2018).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da existência de muitos estudos sobre terapias regeneradoras para o tratamento da DDDIV, apenas três comparam os efeitos das CT com o SC in vivo e, como foram realizados em espécies, metodologias e critérios de avaliação diferentes, impossibilitaram a realização de meta-análise. Não foi possível extrair dados de estudos que avaliassem a efetividade das terapias mencionadas de forma isolada para comparação entre elas, sobretudo pela metodologia adotada no grupo de intervenção associando SC como base do carreador para as CT.

Dessa forma, conclui-se que mais estudos são necessários para comparação dos efeitos terapêuticos do uso de CT e SC in vivo, podendo-se avaliar, além dos exames de imagem e histológicos em curto prazo, o impacto de tais terapias sobre a qualidade de vida e funções motora, sensitiva e autônoma no acompanhamento a longo prazo.

REFERÊNCIAS

ALONSO-GARCÍA, M.; SARRÍA-SANTAMERA, A. The economic and social burden of low back pain in Spain: a national assessment of the economic and social impact of low back pain in Spain. **Spine**, 45, n. 16, p. E1026-E1032, 2020.

AMELOT, A.; MAZEL, C. The intervertebral disc: physiology and pathology of a brittle joint. **World neurosurgery**, 120, p. 265-273, 2018.

BEATTIE, P. Current understanding of lumbar intervertebral disc degeneration: a review with emphasis upon etiology, pathophysiology, and lumbar magnetic resonance imaging findings. **Journal of orthopaedic & sports physical therapy**, 38, n. 6, p. 329-340, 2008.

BORRELLI, C.; BUCKLEY, C. T. Injectable disc-derived ECM hydrogel functionalised with chondroitin sulfate for intervertebral disc regeneration. **Acta Biomaterialia**, 117, p. 142-155, 2020.

CHEN, Z.; ZHANG, W.; ZHANG, N.; ZHOU, Y. *et al.* Down-regulation of insulin-like growth factor binding protein 5 is involved in intervertebral disc degeneration via the ERK signalling pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 23, n. 9, p. 6368-6377, 2019.

CORNEJO, M.; CHO, S.; GIANNARELLI, C.; IATRIDIS, J. *et al.* Soluble factors from the notochordal-rich intervertebral disc inhibit endothelial cell invasion and vessel formation in the presence and absence of pro-inflammatory cytokines. **Osteoarthritis and cartilage**, 23, n. 3, p. 487-496, 2015.

FREEMAN, B. J.; KULIWABA, J. S.; JONES, C. F.; SHU, C. C. *et al.* Allogeneic mesenchymal precursor cells promote healing in postero-lateral annular lesions and improve indices of lumbar intervertebral disc degeneration in an ovine model. **Spine**, 41, n. 17, p. 1331-1339, 2016.

FUJITA, T.; OHUE, M.; FUJII, Y.; MIYAUCHI, A. *et al.* The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. **Journal of bone and mineral metabolism**, 20, p. 298-302, 2002.

GANEY, T.; LIBERA, J.; MOOS, V.; ALASEVIC, O. *et al.* Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. **Spine**, 28, n. 23, p. 2609-2620, 2003.

HAJIESMAILPOOR, A.; MOHAMADI, O.; FARZANEGAN, G.; EMAMI, P. *et al.* Overview of Stem Cell Therapy in Intervertebral Disc Disease: Clinical Perspective. **Current stem cell research & therapy**, 18, n. 5, p. 595-607, 2023.

HANSON, R. R.; SMALLEY, L. R.; HUFF, G. K.; WHITE, S. *et al.* Oral treatment with a glucosamine-chondroitin sulfate compound for degenerative joint disease in horses: 25 cases. **Equine Practice**, 19, p. 16-22, 1997.

HENROTIN, Y.; MARTY, M.; MOBASHERI, A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? **Maturitas**, 78, n. 3, p. 184-187, 2014.

HIYAMA, A.; MOCHIDA, J.; IWASHINA, T.; OMI, H. *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. **Journal of orthopaedic research**, 26, n. 5, p. 589-600, 2008.

HIYAMA, A.; SAKAI, D.; TANAKA, M.; ARAI, F. *et al.* The relationship between the Wnt/ β -catenin and TGF- β /BMP signals in the intervertebral disc cell. **Journal of cellular physiology**, 226, n. 5, p. 1139-1148, 2011.

HUANG, B.; ZHUANG, Y.; LI, C.-Q.; LIU, L.-T. *et al.* Regeneration of the intervertebral disc with nucleus pulposus cell-seeded collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer constructs in a rabbit disc degeneration model. **Spine**, 36, n. 26, p. 2252-2259, 2011.

HUGHES, S.; FREEMONT, A.; HUKINS, D.; MCGREGOR, A. *et al.* The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, 94, n. 10, p. 1298-1304, 2012.

JADAD, A. R.; MOORE, R. A.; DAWN CARROLL, R.; JENKINSON, C. *et al.* Assessing the Quality of Reports of Randomized zyxwvutsrqponmlkjihgfedcbaZ Clinical Trials: Is Blinding Necessary? **Controlled clinical trials**, 17, p. 1-12, 1996.

JIA, H.; LIN, X.; WANG, D.; WANG, J. *et al.* Injectable hydrogel with nucleus pulposus-matched viscoelastic property prevents intervertebral disc degeneration. **Journal of orthopaedic translation**, 33, p. 162-173, 2022.

JIN, L.; LIU, Q.; SCOTT, P.; ZHANG, D. *et al.* Annulus fibrosus cell characteristics are a potential source of intervertebral disc pathogenesis. **PloS one**, 9, n. 5, p. e96519, 2014.

KAHAN, A.; UEBELHART, D.; DE VATHAIRE, F.; DELMAS, P. D. *et al.* Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: The study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, 60, n. 2, p. 524-533, 2009.

- KHALID, S.; EKRAM, S.; SALIM, A.; CHAUDHRY, G. R. *et al.* Transcription regulators differentiate mesenchymal stem cells into chondroprogenitors, and their in vivo implantation regenerated the intervertebral disc degeneration. **World Journal of Stem Cells**, 14, n. 2, p. 163, 2022.
- LIU, Z.; LI, J.; HU, M.; WANG, X. *et al.* The Optimal Timing of Hydrogel Injection for Treatment of Intervertebral Disc Degeneration: Quantitative Analysis Based on T1 ρ MR Imaging. **Spine**, 45, n. 22, p. E1451-E1459, 2020.
- LYU, F.-J.; CUI, H.; PAN, H.; MC CHEUNG, K. *et al.* Painful intervertebral disc degeneration and inflammation: from laboratory evidence to clinical interventions. **Bone Research**, 9, n. 1, p. 7, 2021.
- MARTINS, D. E.; MEDEIROS, V. P. D.; WAJCHENBERG, M.; PAREDES-GAMERO, E. J. *et al.* Changes in human intervertebral disc biochemical composition and bony end plates between middle and old age. **PLoS One**, 13, n. 9, p. e0203932, 2018.
- MASUDA, K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors. **European Spine Journal**, 17, p. 441-451, 2008.
- MASUDA, K.; AOTA, Y.; MUEHLEMAN, C.; IMAI, Y. *et al.* A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. **Spine**, 30, n. 1, p. 5-14, 2005.
- MCCARTHY, G.; O'DONOVAN, J.; JONES, B.; MCALLISTER, H. *et al.* Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, 174, n. 1, p. 54-61, 2007.
- MERN, D. S.; WALSEN, T.; BEIERFUß, A.; THOMÉ, C. Animal models of regenerative medicine for biological treatment approaches of degenerative disc diseases. **Experimental Biology and Medicine**, 246, n. 4, p. 483-512, 2021.
- MILLWARD-SADLER, S. J.; COSTELLO, P. W.; FREEMONT, A. J.; HOYLAND, J. A. Regulation of catabolic gene expression in normal and degenerate human intervertebral disc cells: implications for the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. **Arthritis research & therapy**, 11, p. 1-10, 2009.
- MOHD ISA, I. L.; TEOH, S. L.; MOHD NOR, N. H.; MOKHTAR, S. A. Discogenic Low Back Pain: Anatomy, Pathophysiology and Treatments of Intervertebral Disc Degeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, 24, n. 1, p. 208, 2022.
- NAKASHIMA, S.; MATSUYAMA, Y.; TAKAHASHI, K.; SATOH, T. *et al.* Regeneration of intervertebral disc by the intradiscal application of cross-linked hyaluronate hydrogel and cross-linked chondroitin sulfate hydrogel in a rabbit model of intervertebral disc injury. **Bio-medical materials and engineering**, 19, n. 6, p. 421-429, 2009.
- NAVONE, S. E.; MARFIA, G.; GIANNONI, A.; BERETTA, M. *et al.* Inflammatory mediators and signalling pathways controlling intervertebral disc degeneration. **Histology and histopathology**, 32, n. 6, p. 523-542, 2017.

OEHME, D.; GHOSH, P.; SHIMMON, S.; WU, J. *et al.* Mesenchymal progenitor cells combined with pentosan polysulfate mediating disc regeneration at the time of microdiscectomy: a preliminary study in an ovine model. **Journal of Neurosurgery: Spine**, 20, n. 6, p. 657-669, 2014.

PENG, B.; DU, L.; ZHANG, T.; CHEN, J. *et al.* Research progress in decellularized extracellular matrix hydrogel for intervertebral disc degeneration. **Biomaterials Science**, 2023.

PENG, B.; HAO, J.; HOU, S.; WU, W. *et al.* Possible pathogenesis of painful intervertebral disc degeneration. **Spine**, 31, n. 5, p. 560-566, 2006.

PHILIPPI, A. F.; LEFFLER, C. T.; LEFFLER, S. G.; MOSURE, J. C. *et al.* Glucosamine, chondroitin, and manganese ascorbate for degenerative joint disease of the knee or low back: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Military medicine**, 164, n. 2, p. 85-91, 1999.

PURMESSUR, D.; CORNEJO, M.; CHO, S.; STOCK, I. *et al.* Notochordal Cell Conditioned Medium Inhibits Neurite Outgrowth and Maintains Neural Cell Viability. **Global Spine Journal**, 2, n. 1_suppl, p. s-0032-1319847-s-1310032-1319847, 2012.

PURMESSUR, D.; CORNEJO, M. C.; CHO, S. K.; ROUGHLEY, P. J. *et al.* Intact glycosaminoglycans from intervertebral disc-derived notochordal cell-conditioned media inhibit neurite growth while maintaining neuronal cell viability. **The spine journal**, 15, n. 5, p. 1060-1069, 2015.

RAYNAULD, J. P.; PELLETIER, J. P.; ABRAM, F.; DODIN, P. *et al.* Long-Term Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on the Progression of Structural Changes in Knee Osteoarthritis: Six-Year Followup Data From the Osteoarthritis Initiative. **Arthritis care & research**, 68, n. 10, p. 1560-1566, 2016.

ROUGHLEY, P. J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. **Spine**, 29, n. 23, p. 2691-2699, 2004.

SANTOS, C. M. D. C.; PIMENTA, C. A. D. M.; NOBRE, M. R. C. A estratégia PICO para a construção da pergunta de pesquisa e busca de evidências. **Revista latino-americana de enfermagem**, 15, p. 508-511, 2007.

SERIGANO, K.; SAKAI, D.; HIYAMA, A.; TAMURA, F. *et al.* Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. **Journal of orthopaedic research**, 28, n. 10, p. 1267-1275, 2010.

SILAGI, E. S.; SHAPIRO, I. M.; RISBUD, M. V. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: dysregulation and the pathogenesis of disc degeneration. **Matrix Biology**, 71, p. 368-379, 2018.

STUBER, K.; SAJKO, S.; KRISTMANSON, K. Efficacy of glucosamine, chondroitin, and methylsulfonylmethane for spinal degenerative joint disease and degenerative disc disease: a systematic review. **The Journal of the Canadian Chiropractic Association**, 55, n. 1, p. 47, 2011.

TILOTTA, V.; VADALÀ, G.; AMBROSIO, L.; CICIONE, C. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived secretome enhances nucleus pulposus cell metabolism and modulates extracellular matrix gene expression in vitro. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 11, 2023.

TUDURY, E. A.; JÚNIOR, D. B.; SILVA, I. C. C.; TRAJANO, S. C. *et al.* Efeitos da suplementação com nutracêuticos sobre a calcificação de discos intervertebrais em cães da raça Dachshund. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, 16, n. 1, p. 25-33, 2022.

UEBELHART, D.; THONAR, E. J. A.; ZHANG, J.; WILLIAMS, J. M. Protective effect of exogenous chondroitin 4, 6-sulfate in the acute degradation of articular cartilage in the rabbit. **Osteoarthritis and cartilage**, 6, p. 6-13, 1998.

WU, P. H.; KIM, H. S.; JANG, I.-T. Intervertebral disc diseases PART 2: a review of the current diagnostic and treatment strategies for intervertebral disc disease. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 6, p. 2135, 2020.

ZHANG, K.; ZHANG, X.; SHI, J.; WANG, K. *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of intervertebral disc degeneration: a bibliometric and visualization analysis based on Web of Science database. **Chinese Journal of Tissue Engineering Research**, 25, n. 19, p. 3031, 2021.

ZHANG, W.; SUN, T.; LI, Y.; YANG, M. *et al.* Application of stem cells in the repair of intervertebral disc degeneration. **Stem cell research & therapy**, 13, n. 1, p. 1-17, 2022.

ZHANG, Y.; DRAPEAU, S.; AN, H. S.; MARKOVA, D. *et al.* Histological features of the degenerating intervertebral disc in a goat disc-injury model. **Spine**, 36, n. 19, p. 1519-1527, 2011.

ZHANG, Y.; DRAPEAU, S.; AN, H. S.; THONAR, E. J. A. *et al.* Transplantation of goat bone marrow stromal cells to the degenerating intervertebral disc in a goat disc-injury model. **Spine**, 36, n. 5, p. 372, 2011.

ZHANG, Z.; ZHANG, L.; YANG, J.; HUANG, J. *et al.* Influence of extracellular nanovesicles derived from adipose-derived stem cells on nucleus pulposus cell from patients with intervertebral disc degeneration. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 22, n. 6, p. 1-7, 2021.

ZHOU, X.; WANG, J.; FANG, W.; TAO, Y. *et al.* Genipin cross-linked type II collagen/chondroitin sulfate composite hydrogel-like cell delivery system induces differentiation of adipose-derived stem cells and regenerates degenerated nucleus pulposus. **Acta Biomaterialia**, 71, p. 496-509, 2018.