



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BEATRIZ CAMPOS LINHARES LIMA
BEATRIZ DOMINGUES BRESSAN LOPES GUIMARÃES VIDAL

TERAPIA DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAIS NA OSTEOARTROSE

BRASÍLIA

2020



BEATRIZ CAMPOS LINHARES LIMA
BEATRIZ DOMINGUES BRESSAN LOPES GUIMARÃES VIDAL

TERAPIA DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAIS NA OSTEOARTROSE

Relatório final de pesquisa de iniciação científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Orientação: Carlos Alberto da Cruz Junior

BRASÍLIA

2020

DEDICATÓRIA

Gostaríamos de agradecer o Laboratório BioCell Terapia Celular por todo o auxílio durante a pesquisa. Um agradecimento em especial para a Hilana Brunel e Patrícia Malard, que nos orientaram, junto ao nosso orientador Carlos Alberto durante toda pesquisa.

RESUMO

A osteoartrose (OA) é uma doença crônica e degenerativa que resulta na perda progressiva da cartilagem articular. Essa progressiva redução faz com que ocorra o remodelamento ósseo e possível formação de osteófitos. Os sinais clínicos apresentados pelo paciente com AO são crepitação, claudicação e dor, com conseqüente diminuição da qualidade de vida dos animais acometidos. Os tratamentos convencionais disponíveis incluem fármacos como os anti-inflamatórios não esteroidais, porém o uso prolongado pode gerar impactos negativos como potencializar a degradação da cartilagem e alterar o bom funcionamento do organismo como um todo. A terapia com células mesenquimais (CTM) pode ser uma alternativa para os tratamentos de cães com OA pelas células terem a habilidade de migrar até o local de inflamação e apresentar atividades imunomoduladoras e secretar compostos bioativos, possibilitando a regeneração e reparação da cartilagem, já que a CTM também possui a capacidade de se dividir ilimitadamente, podendo se transformar em células de diferentes linhagens, incluindo condrócitos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da terapia celular no tratamento de cães com OA. No estudo foram utilizados dois animais, diagnosticados com a doença e encaminhados para o laboratório BiOCELL Terapia Celular para realização da terapia com CTM. As células foram cultivadas e congeladas pelo laboratório BiOCeLL terapia celular. Em cada animal foi realizada apenas uma única aplicação utilizando a via endovenosa e intra-articular. Após a aplicação, os animais apresentaram uma melhora clínica significativa, concluindo que a terapia celular pode ser uma alternativa bastante promissora para o tratamento de cães com OA.

Palavras chave: células tronco, osteoartrose, cão.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
2.1.OSTEOARTROSE.....	7
2.2.CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	8
2.3.TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	9
3. METODOLOGIA	11
3.1.ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS DA PESQUISA	11
3.2.ISOLAMENTO, CULTIVO E CONGELAMENTO DAS CTM.....	11
3.3.CARACTERIZAÇÃO DAS CTM.....	11
3.4.ANIMAIS E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DAS CTM'S.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
6. REFERÊNCIAS	16

1. INTRODUÇÃO

As doenças osteoarticulares são bastante corriqueiras na rotina clínica e cirúrgica veterinária de pequenos animais e dentre elas, a osteoartrose se encontra como a mais comum na espécie (SCHMIDT, 2009). Essa é uma doença crônica e degenerativa que resulta na perda progressiva da cartilagem articular (HARRELL *et al.*, 2019), reduzindo significativamente a motilidade e causando dores severas aos animais acometidos.

Pelo fato de não existir cura para a osteoartrose, o tratamento tem como foco o controle da dor e melhora da motilidade, o qual é feito geralmente por meio de dietas e medicamentos, como os antiinflamatórios não esteroidais (EDAMURA *et al.*, 2012). Porém o uso desses fármacos à longo prazo gera impactos negativos na matriz da cartilagem, acelerando o seu processo de deterioração (HAUSER, 2010). Dependendo do grau da doença do paciente, pode-se considerar a abordagem cirúrgica, porém na maioria dos casos, não será possível reverter as alterações degenerativas geradas pela doença (PIMENTEL, 2013).

Com isso, a terapia celular com células-tronco adultas mesenquimais se apresenta como uma alternativa promissora para o controle da osteoartrose, pois além do manuseio da dor, também estimula a regeneração da cartilagem, resultando na melhora da qualidade de vida do paciente (SHAN *et al.*, 2019).

Células-tronco são definidas como células indiferenciadas e que possuem a capacidade de se diferenciar em células de linhagens diferentes, ou de se auto-replicar. As chamadas células tronco mesenquimais são células adultas, e caracterizadas como multipotentes, podendo se diferenciar em linhagens celulares como condrócitos (HAN *et al.*, 2019; MIYAGI *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a eficácia da terapia com célula-tronco mesenquimais como alternativa terapêutica no tratamento de cães com osteoartrose.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. OSTEOARTROSE

A osteoartrose (OA) é uma doença crônica de causa multifatorial que afeta a integridade da cartilagem articular, ocasionando sua degeneração de maneira progressiva e causando alterações no animal como por exemplo, a claudicação, diminuição da atividade física, rigidez e dor (CARMONA; REZENDE, 2014; PIMENTEL, 2013).

Essa doença pode ser classificada de duas maneiras: osteoartrose primária e secundária. Na osteoartrose primária, caracterizada como idiopática, decorre o acometimento bilateral das articulações e tem uma causa desconhecida. Na secundária, as causas são mais evidentes, como, por exemplo: fraturas, rupturas ligamentares, displasia e obesidade, ou seja, é quando se tem um fator determinante ou conhecido (PIMENTEL, 2013). O diagnóstico pode ser feito através do histórico clínico, exames físicos e radiográficos, sempre tentando avaliar o nível da dor que o animal está sentindo (RYCHEL, 2010).

A cartilagem oferece uma superfície macia evitando a fricção entre os ossos, e permitindo deslizamento durante o movimento da articulação. Isso é facilitado por uma camada lubrificante na superfície articular proveniente de ácido hialurônico produzidos pelos condrócitos e células sinoviais. A principal função da cartilagem é a absorção e dissipação de carga mecânica, a qual é necessária para a homeostase da cartilagem.

Na osteoartrose mudanças aparecem primeiramente na superfície da articulação, onde essas forças mecânicas como o cisalhamento, são grandes, resultando no desequilíbrio da homeostase da cartilagem, caracterizado por uma série de eventos nas quais resultam na perturbação do estado normal dos condrócitos, os quais acabam expressando numerosos mediadores inflamatórios capazes de conduzir danos à cartilagem (HOUARD et al. 2013). Com isso, terá a evolução para um ciclo vicioso inflamatório, mantendo uma constante degradação articular. Os agentes primários dessa via inflamatória são os fatores de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-1 (IL-1)(REZENDE, *et al.* 2009).

Uma característica muito importante e comum na osteoartrose é a diminuição do espaço articular, o que pode ocasionar o aumento da pressão intra-articular, que futuramente pode ocasionar a síndrome compartimental articular. Esta síndrome pode resultar em uma inadequada perfusão sanguínea, causando isquemia local e um maior dano articular (BROMBINI, *et al.* 2020).

Hoje a OA é uma doença que não possui cura e os tratamentos são baseados apenas no controle da dor e da motilidade. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos tratamentos envolvendo a regeneração destes tecidos, uma vez que a cartilagem não tem capacidade de auto regeneração (HARRELL *et al.*, 2019; SHAN *et al.*, 2018).

As medicações normalmente indicadas são os anti-inflamatórios não esteroidais voltados para diminuição da dor e inflamação. De acordo com Guercio e colaboradores (2012) estes medicamentos não são muito eficazes. Para a realização de um tratamento mais eficiente na osteoartrose, deve haver a combinação de diferentes abordagens (COIMBRA, 2004).

Segundo Duarte e colaboradores (2013), realizar exercícios físicos, quando não são muito intensos, podem ajudar na prevenção de diversas patologias crônico degenerativa, como a osteoartrose. A fisioterapia também é uma das formas de tratamento auxiliar para a AO, sendo utilizada para fortalecer músculos específicos. Esse fortalecimento irá diminuir o avanço da AO, reduzindo os sintomas do paciente (FARIA *et al.*, 2017).

O tratamento da osteoartrose tanto em humanos como em animais é voltado para o manuseio da dor e recuperação das articulações, por isso, os resultados de estudos clínicos em cães podem oferecer informações importantes para o tratamento de lesões na cartilagem de pacientes humanos e veterinários (SASAKI *et al.*, 2019)

2.2.CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As células tronco (CT) são células indiferenciadas, que possuem a capacidade de se dividir ilimitadamente, de maneira que podem formar células filhas ou se transformar em uma célula especializada (CARVALHO *et al.*, 2012)

As CT são classificadas de acordo com a sua capacidade de diferenciação, podendo ser totipotentes ou multipotentes. Pode-se citar, primeiramente, as células com maior potencial de diferenciação, chamadas de totipotentes, capazes de se diferenciar em qualquer célula do corpo, formando estruturas embrionárias e extra-embrionárias. Já as células pluripotentes são semelhantes, porém, não são capazes de se diferenciar em estruturas extra-embrionárias. Em seguida, tem-se as multipotentes que são células com potencial reduzido e diferenciam-se em linhagens específicas (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

Entre essas células multipotentes estão as células tronco mesenquimais (CTM's) (CAPLAN; DENNIS, 2016; CSAKI *et al.*, 2007). As CTM's estão presentes nos tecidos e órgãos, e

podem ser obtidas através de fontes como tecido adiposo ou medula óssea. Em processos fisiológicos, essas células já se mostram necessárias na substituição de células mortas durante a renovação celular, também agindo em processos patológicos como na isquemia, inflamação ou trauma (MARKOSKI, 2016; HARMAN *et al.*, 2016).

A partir de estudos feitos por Yagi e colaboradores (2010), o homing é o processo que células tronco conseguem migrar até locais inflamados, independente do tecido. A capacidade que a CTM's possuem de se diferenciar irá depender do microambiente que estão inseridas, pois este é o local que irão receber as informações oriundas dos processos de sinalização celular, para assim ativar mecanismos de diferenciação (MARKOSKI, 2016). De acordo com Harman e colaboradores (2016), as CTM são capazes de se diferenciar em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas.

Essas células também possuem propriedades tróficas envolvendo a secreção de fatores de crescimento e citocinas capazes de induzir a proliferação celular e angiogênese, além de reduzir a formação de tecido cicatrizante. A sua capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora também se destaca, pois, a partir de mecanismos parácrinos, as CTM's secretam fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias a fim de reverter o sinal inflamatório (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013).

Além da imunomodulação, de acordo com Monteiro e colaboradores (2009) as CTM também possuem a fusão como mecanismo de diferenciação, na qual as células são capazes de assumir o padrão de expressão genética da célula alvo ao fusionar-se na mesma.

As CTM desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuam nas células do sistema imune. Entre esses fatores, se tem o TGF- β (fator de crescimento beta), fator de crescimento hepatócitos (HGF), prostaglandina (PGE2), e a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Existem formas de suprimir a proliferação dos linfócitos T e B. especificamente, a produção dos linfócitos T citotóxicos e as outras citocinas pró-inflamatórias, podem ser inibida por meio da liberação de PEG2 (MONTEIRO, 2010).

2.3.TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse no uso de células-tronco como terapia para diversos tipos de doenças em animais domésticos, em especial cães e gatos. Por mais ainda esteja sob necessidade de novos estudos, a terapia celular oferece novas perspectivas para tratamento de enfermidades que não apresentam cura (MARKOSKI, 2016).

A terapia celular é um método que tem como objetivo agir na regeneração de órgãos e tecidos, apresentando uma fonte de compostos bioativos com propriedades terapêuticas que ser utilizados para o tratamento de diversas doenças e condições (CARVALHO *et al.*, 2012; SHAH *et al.*, 2018).

As CTM se destacam por apresentarem a propriedade de plasticidade, ou seja, são capazes de se diferenciarem em tecidos de origem mesodérmica, além de possuírem a função de modulação imunológica e atividade anti-inflamatória. Essas células, junto com compostos bioativos solúveis, conseguem inibir ativação de células como: linfócitos T, linfócitos B e células natural killers. Por apresentarem essas características, são utilizadas em tratamento alogênicos, nos quais células de cães doadores podem ser utilizadas para o tratamento de outros cães. Com o uso dessas células multipotentes, é possível promover a regeneração e reparo de cartilagem e ossos promovendo maior qualidade de vida para os animais de companhia (ALVES *et al.*, 2019; SHAN *et al.*, 2018; MARKOSKI, 2016).

A terapia envolve diferentes vias de aplicação para transfusão de células como a aplicação local ou sistêmica. As CT podem ser originadas do mesmo animal, sendo autólogas, ou alogênicas, pertencendo a um animal diferente, porém da mesma espécie (GADE *et al.*, 2012). As fontes mais utilizadas para retirada das CTM's são tecido adiposo e medula óssea devido uma maior facilidade de obtenção (VOGA *et al.*, 2020) porém o tecido adiposo é uma fonte mais desejável por apresentar maior abundância e taxa de expansão rápida em cultura (HARMAN *et al.*, 2016), podendo ser obtido a partir de cirurgias ou biópsias (ALVES, 2017). Também existem outras fontes como sangue do cordão umbilical, placenta, líquido amniótico (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013) e polpa dentária (FREITAS, 2011).

Devido também à intensa inflamação presente na osteoartrose, as propriedades imunomoduladoras oferecidas pelas CTM's despertaram o interesse de pesquisadores, os quais iniciaram investigações para seu uso para o tratamento da dor em pacientes com OA (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013).

O tratamento da osteoartrose tanto em humanos como em animais é voltado para o manejo da dor e recuperação das articulações, por isso, os resultados de estudos clínicos em cães podem oferecer informações importantes para o tratamento de lesões na cartilagem de pacientes humanos e veterinários (SASAKI *et al.*, 2019).

3. METODOLOGIA

3.1.ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS DA PESQUISA

A realização deste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de animais do UniCEUB (CEUA/UniCEUB), sob o protocolo Nº. 025/2018.

3.2.ISOLAMENTO, CULTIVO E CONGELAMENTO DAS CTM

As CTM foram isoladas e cultivadas a partir de tecido adiposo de um cão doador saudável. Para a coleta de tecido, o doador foi anestesiado e foi feita uma incisão na região lombar, aproximadamente 20g de tecido adiposo foi coletado da base da cauda do animal.

O tecido adiposo foi lavado em solução salina de fosfato para remoção de resíduos celulares e sanguíneos, cortados em pedaços pequenos e, em seguida expostos a hialuronidase, para assim passarem pela digestão enzimática.

Depois disso, as células sofreram um processo de filtração a fim de iniciar a seleção de CTM. Posteriormente, as células foram colocadas em garrafas de cultura com Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbeco (DMEM) e incubadas à 37.5 °C e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após vinte e quatro horas, o meio foi descartado com as células não aderentes e um novo meio de cultura foi adicionado as garrafas. O meio foi trocado uma vez a cada 3 semanas, até as células alcançarem 80% de confluência.

Em seguida, a tripsinização foi realizada para retirar as células das garrafas de cultivo, realizar a contagem na câmara de Neubauer e embalá-las em palhetas (1x10⁶ de células por palheta) para o congelamento com sulfóxido de dimetilo (DMSO) e soro fetal bovino (SFB) em nitrogênio líquido. Cinco palhetas foram descongeladas e utilizadas para realizar a caracterização das CTM's.

3.3.CARACTERIZAÇÃO DAS CTM

A caracterização das CTM foram realizadas de acordo com os padrões estabelecidos pela The International Society for Cellular Therapy. As células foram avaliadas quanto à expressão de antígenos de superfície (CD105, CD73 e CD90) e fatores de transcrição intranucleares (OCT3.4 e SOX-2), todos avaliados por citometria, de fluxo (Aminis® Imaging Flow Cytometer). A capacidade das células de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condrócitos também foi avaliada, bem como a sua aderência ao plástico.

O meio de cultura das células foi triado para patógenos e contaminantes (bactérias, fungos, micoplasma) usando reação em cadeia da polimerase (Veriti Thermal Cycler e ThermoFisher Scientific®). Além disso, a viabilidade das células após o descongelamento foi avaliada por citômetro de fluxo com Dead Cell Apoptosis Kit com Anexina V Alexa Fluor™ 488 e Iodeto de Propídio (PI) (Thermo-Fischer Scientific®) no equipamento Amnis® Imaging Flow Cytometer.

3.4.PREPARAÇÃO DAS CTM ALÓGENAS

O laboratório BioCELL Terapia Celular produziu e conservou as CTM em palhetas congeladas. As CTM foram descongeladas e lavadas com meio de transporte para uso, de acordo com o protocolo interno.

3.5.ANIMAIS E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DAS CTM'S

A pesquisa foi realizada com dois cães diagnosticados com osteoartrose, que foram encaminhados para o laboratório BioCELL para realização do tratamento com terapia de CTM's. Os dados foram obtidos através da análise documental do banco de dados do laboratório, contato com os tutores e acompanhamento das aplicações.

Para realização das aplicações com células tronco mesenquimais o diagnóstico foi confirmado através de exames radiográficos e avaliações físicas e a melhora clínica dos animais foi avaliada através do contato com os tutores.

Os animais foram submetidos ao tratamento com CTMs por meio de aplicação intra-articular e endovenosa. De acordo com o protocolo interno, em pacientes com osteoartrose é realizada uma aplicação, com 2×10^6 de células em cada articulação afetada e 1×10^6 /kg de peso via endovenosa diluído em ringer com lactato, porém a quantidade de células e de aplicações pode sofrer variação dependendo do estado apresentado pelo animal. Durante as aplicações não foi preciso administração de sedativos, porém, foram realizado exames de auscultação e aferição de temperatura foram realizados antes, durante e após as aplicações. Esse é um procedimento padrão para garantir a intervenção imediata caso o animal apresente alguma reação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro animal foi diagnosticado com osteoartrose nos joelhos através de exames radiográficos, também foi notado uma presença de crepitação e bastante dor durante exame clínico. Foi realizada apenas uma aplicação com células tronco mesenquimais, onde foram utilizadas 12×10^6 de células no total, sendo administrado 8×10^6 de células por via endovenosa e 2×10^6 de células via intra-articular em cada joelho. Foi realizado contato com o tutor um dia após a aplicação, o qual relatou que o animal não apresentou nenhum tipo de reação adversa à aplicação. Quinze dias após aplicação o animal retornou ao laboratório e durante o exame físico o animal se mostrou mais ativo, não apresentou sensibilidade nas articulações, e houve uma diminuição significativa na crepitação. Sessenta dias após a aplicação foi realizado contato novamente, e foi relatado que o animal não apresentava dores nas articulações, apresentando deambulação normal.

No segundo paciente diagnosticado com osteoartrose. Foi realizada uma aplicação de células troncos mesenquimais com um total de 14×10^6 de células, na qual 10×10^6 de células foram feitas via intravenosa e 4×10^6 de células para as articulações. Dez dias após a aplicação foi realizado contato com o responsável pelo animal e foi informado que o animal apresentou melhora clínica, havia ganhando peso e também estava realizando fisioterapia.

Os resultados apresentados se assemelham aos encontrados por Mohoric e colaboradores (2016), na qual a administração de células tronco mesenquimais nas articulações dos joelhos mostrou uma diminuição no desconforto e na claudicação dos animais, conseqüentemente, melhorando na qualidade de vida desse animal. Outro estudo mais recente (SHAN *et al*, 2018) revelou uma melhora nos sintomas da osteoartrose como a redução da dor, melhora na mobilidade e aumento da atividade física, influenciando positivamente na qualidade de vida dos animais.

De acordo com Deanne e colaboradores (2014) as células tronco podem ser consideradas uma possível alternativa em terapias celulares voltadas para o reparo da cartilagem devido suas propriedades anti-inflamatórias e condrogênicas, melhorando na dor do animal.

Diversas pesquisas demonstraram que uma única aplicação intra-articular de células tronco mesenquimais reduziram a degradação da cartilagem e inflamação da articulação em cães. As CTM mostram possuir habilidades imuno regulatórias capazes de suprimir células

imunes que apresentam importante participação na progressão da OA. Através de processos parácrinos e autócrinos as MSC inibem a ativação de macrófagos inflamatórios M1, promovendo sua conversão para macrófagos de fenótipo M2 de perfil anti-inflamatório. Também são capazes de suprimir a ativação das células inflamatórias Th1 CD4 + e promover a produção de linfócitos T regulatórios, permitindo a atenuação da inflamação articular (HARRELL *et al.*, 2018).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que após a aplicação de CTM, os pacientes obtiveram uma melhora clínica significativa, evidenciando que esse tipo de terapia complementar pode ser uma alternativa para o tratamento de animais com osteoartrose. Porém estudos randomizados, controlados e multicêntricos ainda são necessários para desenvolver protocolos mais robustos.

6. REFERÊNCIAS

ALVES, Suelen et al. O Uso Terapêutico de Células Tronco. **Revista Saúde em Foco – Edição nº 11** – Ano: 2019. Disponível em: <http://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2019/11/O-USO-TERAP%C3%80UTICO-DE-C%C3%89LULAS-TRONCO-1291-a-1302.pdf>. Acesso em 18 de outubro de 2020.

BROMBINI, Giovanna et al. **Pressão articular na osteoartrose femorotibial de cães (Canis lupus familiaris)** – Uma Revisão Sistemática. Veterinária e Zootecnia. ISSN 2178-3764, 2020. Acesso em: 20 de setembro de 2020.

CARMONA, Esteban; Rezende, Cleuza Maria de Faria. **Osteoartrose: aspectos clínicos e novas perspectivas terapêuticas baseadas na terapia regenerativa**. Veterinaria y Zootecnia - ISSN 2011-5415, Vol. 8, No.2, jun/dez, 2014.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/profile/Esteban_Osorio_carmona2/publication/295009929_Osteoartrose_aspectos_clinicos_e_novas_perspectivas_terapeuticas_baseadas_na_terapia_regenerativa/links/56c6203208ae8cf828fef549.pdf. Acesso em: 25 de setembro de 2020.

CARVALHO, A. C. C. de. **Células Tronco Mesenquimais**. 2012. [s. l.]: Editora Atheneu, [s. d.]. ISBN 9788538803348. Disponível em:

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat03341a&AN=pears.9788538803348&lang=pt-br&site=eds-live>. Acesso em: 4 outubro 2020.

CAPLAN, et al. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, 98(5), 1076–1084. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>. Acesso em: 10 de outubro de 2020.

COIMBRA, IB et al. Osteoartrite (artrose): tratamento. **Rev. Bras. Reumatol.** São Paulo , v. 44, n. 6, p. 450-453, dez. 2004 . Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042004000600009>. Acesso em: 4 de outubro de 2020.

CSAKI, C., MATIS, U., MOBASHERI, et al. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study.

Histochemistry and Cell Biology, 128(6), 507–520. 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00418-007-0337-z>. Acesso em: 20 de setembro de 2020.

DUARTE, Vanderlane de Souza; SANTOS, Marcelo Lasmar, et al. Exercícios físicos e osteoartrose: **uma revisão sistemática**. 2013. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/fm/v26n1/22.pdf>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

EDAMURA, K. et al. Comparison of Oral Robenacoxib and Carprofen for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Veterinary Medical Science**, 74(9): 1121–1131, 2012. Disponível em:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/74/9/74_11-0529/_pdf/-char/en. Acesso em: 15 de setembro de 2020.

FARIA, Luís Guilherme; POPAK, Patricia, et al; **Fisioterapia da articulação escapuloumeral em cães comosteocondrite dissecante**. 2017. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-690876>

FREITAS, Daniele. **Células-Tronco Mesenquimais Derivadas Da Polpa de Dente Humano: Caracterização e Estudos Funcionais em Modelo Experimental De Epilepsia**. Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/4166/1/Daniele%20Pinheiro%20de%20Freitas%20C%3%A9lulas-tronco%20mesenquimais%20derivadas%20da%20polpa%20de%20dente....pdf>. Acesso em: 10 de setembro de 2020.

GADE, Nitin et al. Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. **Vet World**, 5(8): 499-507, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.5455%2Fvetworld.2012.499-507>. Acesso em: 10 de setembro de 2020.

GUERCIO, Annalisa et al. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. **Cell Biology International**. v. 36, p. 189-194, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/CBI20110304>. Acesso em: 10 de setembro de 2020.

HAN, Yu et al. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. **Cells**, 2019. Disponível em: [10.3390/cells8080886](https://doi.org/10.3390/cells8080886). Acesso em: 10 de setembro de 2020.

HARRELL, Randall et al. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2318-2326, jan, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.099>. Acesso em: 17 de setembro de 2020.

HARMAN, Robert et al. A Prospective, Randomized, Masked, and Placebo-Controlled Efficacy Study of Intraarticular Allogeneic Adipose Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs. **Front. Vet. Sci**, Sep, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00081>. Acesso em: 17 de setembro de 2020.

HAUSER, A. The Acceleration of Articular Cartilage Degeneration in Osteoarthritis by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Journal of Prolotherapy**, vol. 2, p. 305- 322, 2010. Disponível em: <http://journalofprolotherapy.com/the-acceleration-of-articular-cartilage-degeneration-in-osteoarthritis-by-nonsteroidal-anti-inflammatory-drugs/>. Acesso em: 10 de setembro de 2020.

HOUARD, Xavier. et al. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. **Current rheumatology reports**, 15(11), 375, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11926-013-0375-6>. Acesso em: 5 de agosto de 2020.

MARKOSKI; **Advances in the Use of Stem Cells in Veterinary Medicine: From Basic Research to Clinical Practice**. 2016. Disponível:

<https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2016/4516920/>. Acesso em: 16 de outubro de 2020.

MIYAGI, H. PI.; GOMES, M.; SANTOS, J.C. Estudo comparativo das células tronco mesenquimais de tecido adiposo e polpa dentária de cães para utilização na terapia celular veterinária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 36(0):000-000, 2016 . Disponível em:10.13140/RG.2.2.25119.87201 . Acesso em: 7 de setembro de 2020.

MURPHY, Matthew; MONCIVAIS, Kathryn; CAPLAN, Arnold. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Exp Mol Med**. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>. Acesso em: 20 de setembro de 2020.

MOHORIC et al. Blinded Placebo Study of Bilateral Osteoarthritis Treatment Using Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. **Slov Vet Res**, 53 (3): 167-74, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/310615271_Blinded_placebo_study_of_bilateral_osteoarthritis_treatment_using_adipose_derived_mesenchymal_stem_cells. Acesso em: 20 de outubro de 2020.

MONTEIRO, Betânia Souza; ARGOLO, Napoleão Martins; DEL CARLO, Ricardo Junqueira. Células-tronco mesenquimais. **Cienc. Rural**, Santa Maria , v. 40, n. 1, p. 238-245, Feb. 2009.

PIMENTEL, Thais Spacov Camargo. **Tratamento da Osteoartrose com o uso de antiinflamatórios não esteroidais em cães**, 2013. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-12062013-115529/publico/ThaisSpacovCamargoPimentel.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2020.

REZENDE, Márcia Uchôa.; GOBBI, Riccardo Gomes. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. **Revista brasileira de ortopedia**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 14-19, Feb. 2009 .Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-36162009000100002>. Acesso em: 4 de outubro de 2020.

RYCHEL, Jessica K. **Diagnosis and Treatment Osteoarthritis**. Topics in Companion Animal Medicine. v. 25, p. 20-25, Feb, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2009.10.005>. Acesso em: 4 de outubro de 2020.

SCHMIDT, Karen Moreira. **Doenças osteoarticulares em pequenos animais**. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária. Área de Concentração: Pequenos Animais) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2009.

SHAN, Kiran et al. **Outcome of Allogeneic Adult Stem Cell Therapy in Dogs Suffering from Osteoarthritis and Other Joint Defects**. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6046133/>. Acesso em: 20 de outubro de 2020.

SASAKI, et al. **Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in dogs.** World Journal of Stem Cells. 11(5): 254–269, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v11.i5.254>. Acesso em: 20 de outubro de 2020.