



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Uso de células tronco mesenquimais no tratamento conservador da insuficiência  
do ligamento cruzado cranial em cães**

**ARTHUR SANTANA DE ALMEIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: XX/2024**

**BRASÍLIA/DF**  
**NOVEMBRO DE 2024**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Uso de células tronco mesenquimais no tratamento conservador da insuficiência  
do ligamento cruzado cranial em cães**

**Aluno: Arthur Santana de Almeida**  
**Orientador: Profa. Dra. Christine Souza Martins**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: XX/2024**

**BRASÍLIA/DF**  
**NOVEMBRO DE 2024**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE AGRONOMIA E  
MEDICINA VETERINÁRIA**

**Uso de células tronco mesenquimais no tratamento conservador da insuficiência  
do ligamento cruzado cranial em cães**

**ARTHUR SANTANA DE ALMEIDA**

**Dissertação submetida ao programa de  
pós-graduação em ciências animais,  
como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de mestre em ciências  
animais**

**APROVADO POR:**

---

**Christine Souza Martins, Doutora (Universidade de Brasília)**

**ORIENTADORA**

---

**Eduardo Maurício Mendes de Lima, Doutor (Universidade de Brasília)**

**EXAMINADOR INTERNO**

---

**André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna, Doutor (Universidade Federal do Paraná)**

**EXAMINADOR EXTERNO**

**BRASÍLIA/DF. 28 de novembro de 2024**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ALMEIDA, A. S. **Uso de células tronco mesenquimais no tratamento conservador da insuficiência do ligamento cruzado cranial em cães.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024, 60 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

AA447u	Almeida, Arthur Santana de Uso de células tronco mesenquimais no tratamento conservador da insuficiência do ligamento cruzado cranial em cães. / Arthur Santana de Almeida; orientador Christine Souza Martins. -- Brasília, 2024. 60 p.  Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -- Universidade de Brasília, 2024.  1. Cães. 2. Ruptura parcial do ligamento cruzado cranial. 3. Escala numérica. 4. Tecido adiposo. 5. Teste de gaveta. I. Martins, Christine Souza, orient. II. Título.
--------	---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha mãe é um exemplo de vida para mim, sempre me apoiando e estando ao meu lado mesmo nos momentos em que tudo parecia perdido, sempre me ajudando e me mostrando a luz no fim do túnel.

Ao meu irmão por sempre me ajudar e se preocupar comigo, especialmente nos piores momentos.

Aos meus amigos Aryel, Talita, Paulo, Amanda L., Amanda F., Elisa, Giulia, e Ana Luísa que acompanharam toda a saga que esse mestrado foi, sempre me ajudando do jeito de cada um. A amizade de vocês é o maior presente que a pós e a vida me deram!

À minha orientadora Christine de Souza Martins por acreditar no meu potencial, me convidar a ingressar na pós-graduação e por ter sido uma pessoa tão querida durante todo esse processo, me ajudando sempre que eu estava desesperado e aceitando o desafio que foi esse trabalho.

À toda equipe da BIO CELL por terem me recebido tão bem desde o primeiro dia e me ajudarem em todos os momentos, em especial à Hilana e à Patrícia que dispuseram de muito tempo para me ajudar na escrita do trabalho, e aos médicos Evandro por me disponibilizar os casos e ao Alefe por me auxiliar na escrita.

À toda equipe do hospital veterinário da UnB, que acompanharam todo o processo durante esses dois anos, me ensinando sempre com toda paciência do mundo.

Agradeço à CAPES e à FAPDF pelo fornecimento das bolsas durante esse período.

Finalmente, gostaria de agradecer a todas as pessoas que passaram pelo meu caminho ao longo da pós-graduação, esse trabalho e esse autor não seria nada sem vocês. Muito obrigado!

## Índice

Lista de figuras .....	iii
Lista de tabelas e quadros .....	iv
Lista de siglas e abreviações .....	iv
CAPÍTULO 1 .....	1
1. Introdução.....	2
1.1. Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivos gerais .....	2
1.1.2 Objetivos específicos .....	3
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. Estrutura anatômica e funcional do ligamento cruzado cranial .....	4
2.2. Ruptura do ligamento .....	7
2.2.1 Etiopatogenia.....	7
2.2.2. Principais grupos acometidos.....	10
2.2.3. Diagnóstico .....	10
2.2.4. Exame físico .....	11
2.2.5. Exames de imagem .....	13
2.3. Tratamento .....	15
2.3.1. Tratamento cirúrgico .....	15
2.3.1.1. Técnicas intra-articulares.....	15
2.3.1.2. Técnicas extracapsulares .....	16
2.3.1.3. Técnicas de osteotomia .....	16
2.3.2. Tratamento conservador .....	17
2.3.3. Prognóstico .....	19
2.4. Células tronco .....	19

2.4.1. Tratamento da RLCC com células Tronco .....	21
CAPÍTULO 2 .....	25
3. Materiais e métodos .....	26
3.1. Seleção de casos .....	26
3.1.1. Animais .....	26
3.1.2. Exame físico ortopédico .....	26
3.2. Células tronco mesenquimais .....	27
3.2.1. Obtenção, isolamento, cultivo e congelamento das MSC.....	27
3.2.2. Caracterização das MSC.....	27
3.2.3. Aplicação das MSC .....	29
3.3. Análise estatística .....	30
4. Resultados.....	31
4.1. Animais .....	31
4.3. Avaliação clínica .....	32
4.3.1. Avaliação clínica antes da aplicação das MSC .....	32
4.3.2. Avaliação clínica 30 dias pós-aplicação .....	33
4.3.3. Escala de claudicação .....	34
4.3.4. Escala de dor .....	35
4.3.5. Correlação das escalas de claudicação e dor.....	36
5. Discussão.....	37
6. Conclusão.....	41
Referências bibliográficas .....	42

## Lista de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> - Desenho da anatomia do joelho do cão: 1.1 banda caudolateral do ligamento cruzado cranial; 1.2 banda craniomedial do ligamento cruzado cranial; 2 ligamento cruzado caudal; 3 menisco medial; 4 menisco lateral; 5 côndilo femoral medial; 6 côndilo femoral lateral; 7 tuberosidade tibial (MUIR, 2018) .....	5
<b>Figura 2</b> - Teste de gaveta para diagnosticar rupturas do ligamento cruzado cranial. O exame avalia a capacidade de limitar o movimento em sentido cranial da tibia exercida pelo ligamento cruzado cranial (Fossum, 2015) .....	12
<b>Figura 3</b> – Teste de compressão tibial para diagnóstico de rupturas no ligamento cruzado cranial. O exame mimetiza o movimento fisiológico durante a caminhada do paciente, sendo imprescindível durante a avaliação de pacientes com suspeita de RLCC (Fossum, 2015) .....	13
<b>Figura 4</b> - Fatores secretados pelas células tronco mesenquimais: A IL-8 é secretada juntamente com outros fatores anti-inflamatórios como a IL-10 e PGE2, alterando a polarização dos macrófagos presentes no local inflamado para o tipo M2 que auxilia no reparo tecidual (Rivas et al., 2023) .....	23
<b>Figura 5</b> - Aplicação por via percutânea das MSC em região de joelho (cedidas ao autor pelo M.V. Evandro Barreto) .....	29
<b>Figura 6</b> - Distribuição dos casos selecionados por raça.....	31
<b>Figura 7</b> - Boxplot comparando medianas obtidas da escala de claudicação entre D0 e D30 * representando valor de $P < 0.05$ .....	34
<b>Figura 8</b> - Boxplot comparando medianas de dor obtidas em D0 e D30 * representando valor de $P < 0.05$ .....	35

## Lista de tabelas e quadros

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> - Raça, idade e valores individuais de escala de claudicação e grau de dor articular obtidos previamente à aplicação das MSC (SRD: sem raça definida) .....	32
<b>Tabela 2</b> - Raça, idade e valores individuais de escala de claudicação e grau de dor articular obtidos após a aplicação das MSC (SRD: sem raça definida) .....	33
<b>Tabela 3</b> - Teste de Wilcoxon medianas obtidas antes e após a aplicação das MSC para escala de claudicação.....	34
<b>Tabela 4</b> - Teste de Wilcoxon medianas obtidas antes e após a aplicação das MSC para escala de dor.....	35
<b>Quadro 1</b> - Escalas numéricas de dor e função de membro utilizadas, adaptadas de Enomoto et al. (2024) e Park et al. (2024) .....	27

## Lista de siglas e abreviações

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
CCL2	Quimiocina ligandina 2
CTC	Compressão tibial cranial
DMSO	Dimetilsulfóxido
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico 2
GAGs	Glicosaminoglicanos
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN $\gamma$	Interferon gama
HLA5	Antígeno leucocitário humano 5
IGF1	Fator estimulante semelhante a insulina 1
IL-6	Interleucina 6
LC	Ligamento cruzado
LCC	Ligamento cruzado cranial
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

MMP9	Metaloproteinases de matriz nove
MSC	Células tronco mesenquimais
OA	Osteoartrite
PGE2	Prostaglandina E2
PRP	Plasma rico em plaquetas
RM	Ressonância magnética
RLCC	Ruptura do ligamento cruzado cranial
SFB	Soro fetal bovino
SOX 9	Sry-type HMG box 9
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TPLO	Osteotomia de nivelamento do platô tibial
TTA	Avanço da tuberosidade da tíbia
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

## Resumo

A ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCC) é uma das principais causadoras de claudicação nos cães, podendo afetar qualquer animal em diferentes idades, gerando uma instabilidade articular que sem tratamento induz o aparecimento da osteoartrite (OA). Os tratamentos convencionais utilizados são a cirurgia ou uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) juntamente com o repouso absoluto do paciente. Animais que não podem ser submetidos a procedimento cirúrgico se vêm obrigados a utilizar medicamentos para o controle da dor articular durante longos períodos, ficando mais suscetíveis aos efeitos adversos dos mesmos. O uso das células tronco mesenquimais (MSC) visa a melhora da qualidade de vida dos pacientes e o atraso na progressão da OA com menos efeitos colaterais. O presente trabalho realizou um estudo retrospectivo de cães que apresentaram uma ruptura parcial do ligamento cruzado cranial atendidos entre os anos de 2021 e 2023 nos quais as MSC foram utilizadas como tratamento conservador. Ao todo, 25 casos foram avaliados, sendo os critérios de inclusão a ausência de outras comorbidades ou histórico prévio de alterações articulares. Os animais receberam uma dose de  $3 \times 10^6$  de células por via percutânea na articulação afetada. Foram avaliados no dia da aplicação e 30 dias depois utilizando as escalas numéricas de dor e claudicação. Em D0 os valores obtidos para a escala de claudicação foram de  $3,12 \pm 0,525$ , caindo para  $1,44 \pm 1,193$  em D30, representando resultado estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) após a aplicação. Os valores para a escala de dor obtidos em D0 foram  $3,2 \pm 0,408$ , reduzindo para  $1,44 \pm 0,960$  em D30, melhorando a dor dos pacientes tratados de maneira significativa ( $P < 0,05$ ). Quanto à interação entre os parâmetros observados no tratamento, a correlação de Spearman demonstrou não houve correlação entre a idade e os parâmetros em nenhum momento do estudo ( $P > 0,05$ ) e a correlação entre os parâmetros não foram significativos em D0 ( $P = 0,186$ ), em D30 a correlação foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ), obtendo o valor de 0,811, demonstrando que após a aplicação das MSCs juntamente com o repouso dos pacientes os parâmetros reduziram de maneira semelhante. O tratamento com as MSC foi eficaz no controle da dor e melhora da função do membro após sua aplicação, sendo uma alternativa ao tratamento conservador habitual.

**Palavras-Chaves:** Cães; Ruptura parcial do ligamento cruzado cranial; Escala numérica; Tecido adiposo; Teste de gaveta.

## Abstract

Cranial cruciate ligament rupture (CCLR) injury is one of the main causes of lameness in dogs affecting animals of different ages and leading to joint instability that, without treatment, induces the onset of osteoarthritis (OA). The conventional treatment options are surgery or the administration of non-steroidal anti-inflammatory (NSAIDs) along with absolute rest. Animals that cannot undergo surgical procedures are forced to use medications for joint pain management over long periods, making them more susceptible to the side effects of these medications. The use of mesenchymal stem cells (MSC) aims to improve the quality of life for patients and delay the progression of OA with fewer unwanted side effects. This study conducted a retrospective analysis of animals with cranial cruciate ligament insufficiency treated between 2021 and 2023 who received MSCs for conservative treatment. A total of 25 cases were evaluated retrospectively, with inclusion criteria being the absence of other comorbidities or a previous history of joint affections. The animals received a dose of  $3 \times 10^6$  cells percutaneously in the affected joint. They were assessed on D0 and D30 using numerical pain and lameness scales. At D0, the values obtained for the lameness scale were  $3.12 \pm 0.525$ , decreasing to  $1.44 \pm 1.193$  at D30, representing a statistically significant result ( $P < 0.05$ ) after treatment. The pain scale values obtained at D0 were  $3.2 \pm 0.408$ , reducing to  $1.44 \pm 0.960$  at D30, significantly improving the pain in treated patients ( $P < 0.05$ ). Regarding the interaction between the observed parameters in the treatment, Spearman's correlation demonstrated that there was no correlation between age and the parameters at any time point in the study ( $P > 0.05$ ). The correlation between the parameters was not significant on D0 ( $P = 0.186$ ), but on D30, the correlation was statistically significant ( $P < 0.05$ ), with a value of 0.811 ( $P < 0.05$ ), demonstrating that after the application of MSCs along with patient rest, the parameters decreased in a similar manner. Treatment with MSCs was effective in controlling pain and improving limb function in treated animals after its application, being an alternative to conventional conservative treatment.

**Keywords:** Dogs; Partial cranial cruciate ligament rupture; Numerical rating scale; Adipose tissue; cranial drawer test.

# CAPÍTULO 1

## **1. Introdução**

A principal função do ligamento cruzado cranial (LCC) é estabilizar a movimentação do joelho durante a marcha, inibindo a translação em sentido cranial da tíbia e evitar sua rotação interna (SCHULZ, 2015). Lesões neste ligamento podem ocorrer de maneira parcial ou total e são uma das principais causas de claudicação em cães, especialmente em animais de porte grande, acima dos 22 kg (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021), gerando uma instabilidade articular que progride com o tempo. A lesão pode ser causada por um evento traumático ou por uma degeneração do ligamento de caráter multifatorial que propicia a perda de sua resistência e posterior ruptura (PEGRAM et al., 2023). O sinal mais comum dessa afecção é a claudicação intermitente percebida pelos tutores, em um ou ambos os membros pélvicos, que piora após o animal realizar alguma atividade física, progredindo com o tempo a uma claudicação intensa com rigidez articular (SCHULZ, 2015).

O padrão para o tratamento da ruptura é a intervenção cirúrgica, uma vez que é o único método que corrige a instabilidade articular e reduz a progressão da osteoartrite causada pela ruptura (SCHULZ, 2015). Para animais em que não é possível realizar a correção cirúrgica, o tratamento conservador é indicado na tentativa de minimizar os danos causados pela instabilidade articular e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. A abordagem conservadora envolve o uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais para o controle da dor e repouso para poupar a articulação, entretanto os resultados são piores quando comparados aos de animais tratados por cirurgia (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021). Em virtude das limitações do tratamento conservador convencional e da necessidade de alternativas para animais que, por algum motivo, não podem ser submetidos a uma intervenção cirúrgica, novas abordagens precisam ser elaboradas visando a melhora da qualidade de vida dos pacientes com tal afecção.

### **1.1. Objetivos**

#### **1.1.1 Objetivos gerais**

O presente trabalho buscou avaliar retrospectivamente a eficácia de uma única aplicação de MSCs no tratamento conservador de cães que apresentaram uma RLCC parcial em um período de 30 dias.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a capacidade das células tronco mesenquimais de controlar a dor dos pacientes tratados.
- Avaliar a evolução da claudicação dos animais tratados após uma aplicação de células tronco.
- Avaliar a viabilidade do tratamento quanto aos benefícios para animais que não podem ser operados.

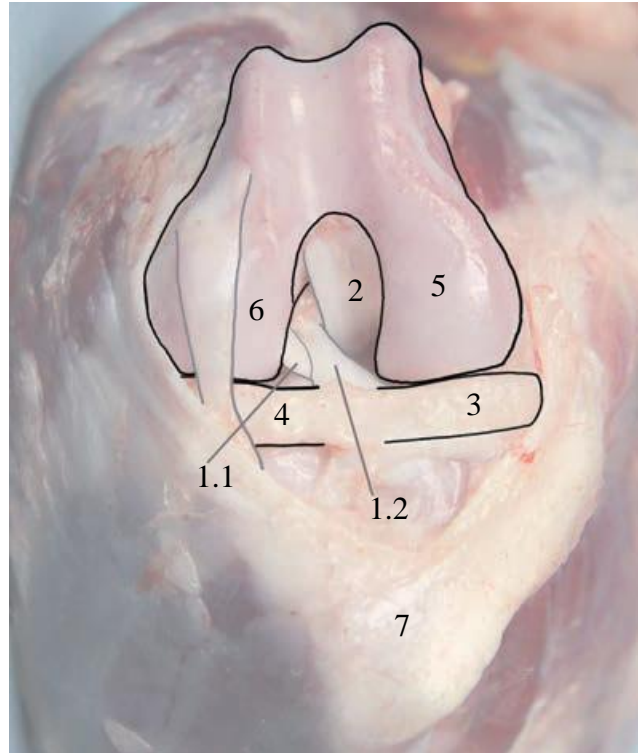
## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Estrutura anatômica e funcional do ligamento cruzado cranial

O ligamento cruzado (LC) é uma estrutura localizada na articulação femorotibiopatelar, inserindo-se no aspecto axial do côndilo femoral lateral, próximo à margem articular. Ele estende-se diagonalmente através do espaço articular, inserindo-se na porção medial da área intercondilar do platô tibial. A área de inserção distal é circundada cranialmente pelo ligamento meniscotibial cranial do menisco medial e caudalmente pelo ligamento meniscotibial cranial do menisco lateral (MUIR, 2018).

O LC é formado por duas bandas estendendo-se nos sentidos cranial, medial e caudal em formato de espiral enquanto percorre a área entre o fêmur e a tíbia. As bandas divisíveis macroscopicamente são denominadas bandas craniomedial e caudolateral (Figura 1). Enquanto a primeira é mais estreita, espiralada e longa, a segunda é mais robusta e mais curta. A banda craniomedial se origina mais proximal ao fêmur se inserindo na porção cranial da área intercondilar tibial enquanto a banda caudolateral origina-se da porção lateral mais distal da área de inserção do côndilo femoral lateral, inserindo-se na região caudal da área intercondilar (SCHULZ, 2015).

Ambas as porções do LC são quase totalmente envoltas por uma membrana sinovial de uma maneira uniforme, com exceção às áreas em que ambos estão em contato direto entre si, denominado epiligamento. O envelope é composto basicamente por tecido conectivo denso, fibroblastos, e alguns adipócitos, sendo possível diferenciar a camada íntima da sub-íntima. Microscopicamente, a membrana que os circunda é repleta de fenestrações que permitem a passagem de nutrientes ao ligamento e a troca do líquido sinovial. A membrana possui função de nutrir, lubrificar, limpar debris intra-articulares e regular a resposta imune local. Devido à presença dessa estrutura, os ligamentos estão dentro da articulação, mas são extra-sinoviais. A presença de uma barreira entre o sangue e o ligamento é importante na patofisiologia da ruptura parcial do ligamento cruzado cranial (MUIR, 2018).



**Figura 1** - Anatomia do joelho do cão: 1.1: banda caudolateral do ligamento cruzado cranial; 1.2: banda craniomedial do ligamento cruzado cranial; 2: ligamento cruzado caudal; 3: menisco medial; 4: menisco lateral; 5: côndilo femoral medial; 6: côndilo femoral lateral; 7: tuberosidade tibial (Fonte: MUIR, 2018).

Grande parte da composição do ligamento é água (60-80%), enquanto a matéria seca é composta basicamente por fibras colágenas dos tipos I e III dispostas longitudinalmente, sendo o tipo I predominante (> 90%), uma pequena porção de colágeno tipo III e quantidades mínimas dos tipos V, X, XII e XIV e outros componentes, enzimas, elastina, glicoproteínas, lipoproteínas, proteoglicanos e integrinas, organizados em vários fascículos que contêm principalmente diversas subunidades de feixes e fibroblastos. Cada fibra possui um formato frisado, uma espécie de ondulação que é a responsável primária pela elasticidade que o ligamento apresenta quando é submetido a uma carga de estresse. A ondulação permite o recrutamento progressivo das fibras de um modo que elas resistam à tensão aplicada, além de aumentar a resistência das fibras a amplitudes de movimento excessivas. Outras estruturas, como fibras de elastina e feixes de microfibrilas contendo fibrilina I e II estão dispostas paralelamente aos feixes principais ou presentes nas regiões interfasciculares do ligamento (MUIR, 2018).

Nos cães, a articulação femorotibiopatelar desempenha um papel fundamental estabilizando a movimentação do membro pélvico em três planos, sagital de flexão/extensão, transversal de rotação extra e intra-tibial e frontal de adução e abdução, além de permitir micro movimentações de translação nos sentidos craniocaudal, medial-lateral e ventro-dorsal. Em estação, o menisco localizado entre os côndilos femorais e tibiais é responsável por estabilizar o animal e absorver o peso. Durante o movimento ele possibilita a propagação do movimento de propulsão à articulação coxofemoral enquanto limita a extensão funcional do membro. Já a principal função do LCC é limitar a movimentação da articulação em que se encontra, evitando a translação da tíbia cranialmente em relação ao fêmur, uma força de cisalhamento denominada compressão tibial cranial (CTC), além de impedir a rotação interna da mesma e evitar a hiperextensão da articulação como um todo (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021).

A porção craniomedial do ligamento cruzado cranial alonga-se enquanto a porção caudolateral se encurta durante a flexão do membro pélvico do animal. Durante a extensão, ambas as porções do ligamento se encontram tensionadas, limitando a translação cranial da tíbia em relação ao fêmur, sendo os ligamentos colaterais os principais responsáveis por restringir a rotação da articulação, enquanto os ligamentos cruzados desempenham um papel secundário, tal interação resulta em um suporte varo-valgo evitando que a rotação interna da tíbia ocorra (SCHULZ, 2015). A extensão excessiva dos ligamentos colaterais é evitada pela tensão nos ligamentos cruzados, onde o LCC desempenha o papel principal como seu limitador. Mecanorreceptores e terminações nervosas aferentes presentes na articulação geram um *feedback* no intuito de proteger a articulação evitando uma extensão ou flexão exageradas, regulando a movimentação do membro (MUIR, 2018).

A estabilidade articular depende do equilíbrio entre as estruturas intra e periarticulares e dos vetores de força que atuam nela, como a força oposta originada pelo solo e a própria força originada da contração dos músculos. Durante a marcha, os vetores de força são distribuídos e acumulam-se na região central do joelho. Como característica anatômica, a tíbia possui sua superfície articular inclinada no sentido próximo-distal, o denominado platô tibial. Quando os vetores de força são acumulados na região do platô, gera-se um vetor resultante tibial no sentido cranial, a CTC que é sustentada pelo LCC. A CTC atua de maneira proporcional ao ângulo do platô, quanto maior o ângulo, maior a força atuante (SCHULZ, 2015).

## **2.2. Ruptura do ligamento**

### **2.2.1 Etiopatogenia**

Uma das causas mais comuns de claudicação em cães é a RLCC. Estima-se que a prevalência possa ser de até 11% a depender do estudo (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021). O rompimento pode ocorrer de forma aguda, devido a um evento traumático, por exemplo, ou de forma crônica, devido a fatores predisponentes, com o tutor observando somente uma claudicação intermitente em seu animal, que pode deixar de sustentar o peso no membro acometido com o passar do tempo ou evoluir para uma melhora nos sintomas após 3 a 6 semanas (SCHULZ, 2015). Em grande parte dos casos, o início da ruptura é causado por uma degeneração da matriz extracelular do ligamento que progride ao longo do tempo ou por um evento traumático, sendo esse menos comum que o processo degenerativo (PEGRAM et al., 2023). A degeneração possui caráter multifatorial complexo que envolve componentes imunológicos, genéticos, hormonais e biomecânicos que juntos culminam em um desequilíbrio entre as forças biomecânicas aplicadas ao ligamento que geram a ruptura e a instabilidade articular (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021).

O LCC não possui a capacidade de se regenerar sozinho, fibras de colágeno podem começar a surgir no local lesionado após 10 semanas, entretanto, a completa recuperação funcional da área lesionada não ocorre (MUIR, 2018). Sem intervenção, a ruptura do ligamento ocasiona alterações articulares, como degeneração da matriz extracelular, metaplasia das células responsáveis por produzir colágeno, sinovite e osteoartrite (OA) (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021). Quando não tratada a condição se agrava gerando alterações articulares mais severas, como degeneração da cartilagem articular, fibrose capsular e o aparecimento de osteófitos periarticulares, predispondo à ruptura total do ligamento (SCHULZ, 2015).

Lesões dos ligamentos podem ser classificadas de acordo com o grau de danos às fibras em conjunto com os sinais clínicos apresentados, onde o grau I corresponde a lesões que não afetam a estabilidade da articulação com dano mínimo às fibras do ligamento, grau II apresentam moderada lesão ao ligamento com instabilidade leve e grau III são lesões associadas a dano severo às fibras com presença de instabilidade articular (MUIR, 2018). O LCC pode romper-se de forma parcial (onde somente uma das bandas está lesionada), total (ambas as bandas estão lesionadas) ou sofrer uma avulsão de seu local de inserção ou origem (SCHULZ, 2015). Estima-se que 4 a 10% dos animais afetados possuem um rompimento bilateral quando se apresentam ao primeiro atendimento, enquanto animais com rompimento unilateral possuem

40% de chances de romper o ligamento do membro contralateral num período de um ano ou menos (PEGRAM et al., 2023).

Apesar de não ser bem elucidada, teorizava-se que a RLCC ocorria única e exclusivamente devido a um evento traumático. Entretanto, recentemente foi teorizado que uma gama de fatores são responsáveis por predispor ruptura mesmo sem um evento traumático que poderia justificá-la. As alterações, como degeneração, metaplasia condroide, alteração na matriz extracelular e redução no número de fibroblastos podem ser a resposta para a perda de elasticidade e resistência que causam a lesão sem que o animal aumente sua carga de trabalho ou atividade (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021).

O colágeno do tipo I compõe grande parte da cartilagem, sendo responsável por conferir resistência à força de tensão ao ligamento (ICHINOHE et al., 2015). Em animais que apresentam uma RLCC, foi demonstrado que a composição da matriz extracelular é diferente de animais saudáveis. Tal alteração reflete na fragilidade do ligamento, uma vez que a quantidade do colágeno tipo I é reduzida, enquanto o colágeno tipo II e III e a presença de fibroblastos com halos perinucleares expressando o gene *SRY-box transcription factor 9* (SOX9) aumentam, caracterizando uma metaplasia fibroblástica, reduzindo sua resistência mecânica (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021). No ligamento rompido uma maior quantidade de ligações de colágeno incompletas, glicosaminoglicanos (GAGs) totais e sulfatados e água pode ser observada quando comparado a um joelho com o ligamento intacto, sugerindo que a matriz extracelular do ligamento rompido possui um maior *turnover* indicado pelas alterações nas quantidades de colágeno e GAGs presentes (MUIR, 2018).

A membrana possui celularidade própria, sinoviócitos encontrados espalhados ao longo dela, desempenhando o papel de manter a saúde articular. Existem dois tipos de células morfológica e funcionalmente distintas: tipo A (macrófagos) imunoativos com função fagocítica e tipo B (semelhantes a fibroblastos) que possuem a função de produzir colágeno, fibronectina e hialuronato (MUIR, 2018). Especula-se que quando ocorrem lesões nos LC, a exposição do colágeno ao meio desencadeia uma reação imune humoral e celular, instaurando uma sinovite acentuada pelos sinoviócitos tipo A presentes na membrana, sugerindo que a ruptura do ligamento pode ter relação com um componente imunomediado (MUIR, 2018; SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021)

A presença de sinovite crônica reduz consideravelmente a resistência do ligamento, alterando a orientação normal das fibras, a organização celular, a matriz extracelular e gera um infiltrado inflamatório ao longo do ligamento (MUIR, 2018). O líquido sinovial contém imunocomplexos e anticorpos contra o colágeno do tipo I e II, a membrana sinovial inflamada

possui um infiltrado mononuclear e, por vezes, agregados nodulares linfoplasmocíticos. Linfócitos B e T e complexo principal de histocompatibilidade (MHC) tipo II com morfologia de células dendríticas também são um achado comum (MUIR, 2018). Entretanto, altas titulações de anticorpo podem não gerar uma ruptura, sugerindo que o componente imunológico pode contribuir por alterar a resistência do ligamento mas não ser a principal causa da RLCC (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021).

O ângulo do platô tibial é outro fator que predispõe a RLCC. As forças atuantes na articulação são neutralizadas ou reduzidas quanto mais esse ângulo se aproxima de  $0^\circ$ , em contrapartida, quanto mais distante desse ângulo a inclinação do platô estiver, maior a CTC, consequentemente, maior a chance de ocorrer uma lesão. Cães de grande porte são mais afetados quando possuem ângulos de  $22$  a  $28^\circ$ , enquanto animais menores mais predispostos possuem os ângulos de  $28,8$  a  $36,3^\circ$  (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021).

As forças atuantes na articulação diferem durante a movimentação do animal, apresentando força máxima quando o animal apoia o membro no solo e zeram quando o membro se desloca de posição. Animais com RLCC tendem a manter a articulação flexionada enquanto em estação no intuito de poupá-la, enquanto seu quadril e articulação do tarso permanecem mais estendidos, em uma tentativa de compensação. Tal ato é uma adaptação do animal para estabilizar melhor a articulação, reduzir a carga no membro e aliviar a dor. Por outro lado, a flexão do membro recruta o grupamento muscular dos flexores do joelho, que por sua vez, estabilizam a tíbia e inibem a translação cranial. Esse mecanismo de compensação pode ocasionar o desenvolvimento de uma subluxação cranial da tíbia em relação ao fêmur durante a fase da marcha em que ocorre o apoio no solo do membro (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021).

A ruptura do LCC causa uma instabilidade articular importante que perpetua a progressão da OA. Por vezes, ela está presente desde o primeiro atendimento, influenciando diretamente o prognóstico do paciente a depender do grau das alterações (BINVERSIE et al., 2022). Em animais que possuem uma ruptura parcial do ligamento, as alterações articulares decorrentes da OA podem causar uma ruptura total pela soma de fatores, como alterações da matriz extracelular, sinovite, resposta imune celular e humoral articular que resulta na diminuição da resistência mecânica do ligamento (MUIR, 2018) ao mesmo tempo em que a carga imposta na articulação aumenta em decorrência do aumento da CTC causada pela ineficiência do ligamento (SCHULZ, 2015), gerando danos às estruturas articulares e o aparecimento das alterações observadas, como osteófitos, esclerose do osso subcondral, efusão articular e espessamento da capsula articular (GILBERT et al., 2019). Por consequência, a

progressão da OA gera uma progressão da lesão do ligamento e vice-versa, gerando um ciclo vicioso que perpetua e acelera a progressão de ambos. Tal efeito é o ponto principal do tratamento da RLCC, seja pela intervenção cirúrgica ou pelo tratamento conservador, uma vez que ambos visam reduzir a progressão da OA.

### **2.2.2. Principais grupos acometidos**

Vários fatores estão associados ao desenvolvimento da afecção em cães, como raça, sexo, idade, peso, castração e predisposição genética. Todas as raças de cães podem ser acometidas, entretanto, os animais com maior probabilidade de romper o ligamento são raças de médio a grande porte, com peso  $\geq 22\text{kg}$ , como Labrador, Newfoundland, Rottweiler e American Staffordshire Terriers. Dentre estas, acredita-se que fêmeas são mais afetadas que machos, havendo também diferença significativa caso o animal seja castrado ou está acima do peso, aumentando as chances de uma ruptura (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021).

A lesão do LCC é comum em cães, surgindo em torno dos 2-10 anos de idade. Em animais mais jovens, até os 4 anos, a lesão traumática é a mais comum, enquanto em animais mais velhos, o rompimento espontâneo decorrente de uma degeneração articular ocorre com maior frequência (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021).

Nos animais de menor porte ( $<15\text{kg}$ ), o aparecimento do quadro difere, acometendo principalmente animais mais velhos, variando entre os 5 aos 9 anos de idade, sendo as raças mais acometidas os West Highland White terrier, poodle *toy* e miniatura e Yorkshire Terrier (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021).

### **2.2.3. Diagnóstico**

O diagnóstico da RLCC é clínico, baseado na junção dos achados do exame físico ortopédico e histórico do paciente em conjunto com os exames de imagem. Os animais podem apresentar um histórico de início súbito de claudicação, que tende a diminuir em 3 a 6 semanas após o episódio inicial, podendo ou não apoiar o peso do corpo no membro acometido, exceto em casos em que o menisco também é acometido, nesses casos a claudicação só melhora após intervenção cirúrgica. Quando a lesão é crônica, o paciente pode apoiar o membro parcialmente e apresentar um histórico de claudicação de longa data, com dificuldade em levantar ou se sentar, e uma tendência do animal de sentar-se com o membro acometido virado para o lado de fora do corpo e em extensão. A lesão crônica está associada à OA que se instaura após a ruptura

do ligamento. Outro relato comum é de uma piora na claudicação após exercício ou quando o animal acorda (SCHULZ, 2015).

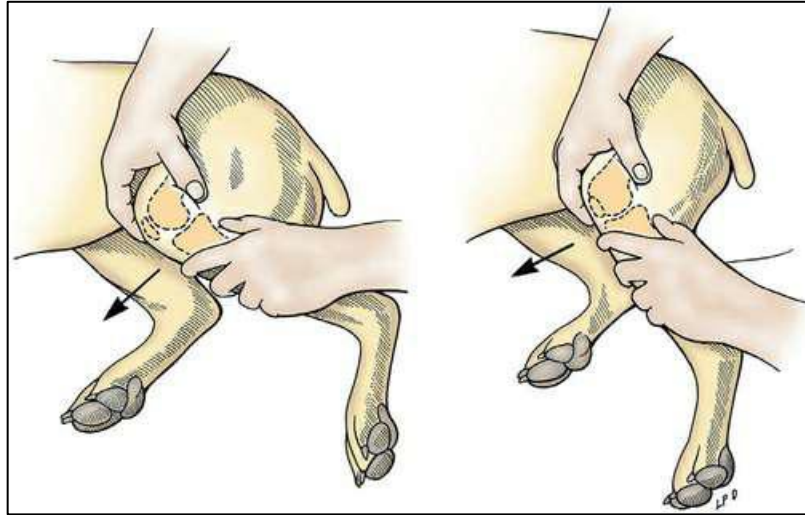
#### **2.2.4. Exame físico**

Animais frequentemente relutam em deixar o avaliador observar o membro devido à dor. Uma efusão articular pode ser palpada durante o exame físico próximo ao tendão patelar. Outros sinais clínicos observado são: a atrofia dos músculos da coxa vista em pacientes que apresentam um quadro crônico, uma crepitação que pode ser sentida na articulação quando flexionada/estendida, além de um aumento no diâmetro da superfície articular medial causada pela formação de osteófitos nas cristas trocleares e de tecido fibroso no côndilo medial e na tíbia proximal. Devido à proliferação do tecido fibroso na articulação, a instabilidade articular em sentido crânio caudal pode ser mais difícil de se demonstrar no exame físico. Em rupturas parciais os sinais são menos evidentes, uma vez que a instabilidade articular é inicialmente compensada por uma das bandas do ligamento, e à medida que o rompimento progride os sinais ficam mais evidentes. A confirmação do diagnóstico envolve a junção dos sinais clínicos, histórico do animal e os achados do exame físico e de imagem (SCHULZ, 2015).

Durante o exame físico, é importante que o avaliador observe a marcha do animal, em especial se existe algum grau de deambulação, claudicação (Park et al. 2024) e/ou presença de dor (MONTEIRO et al., 2023). A claudicação nos membros pélvicos pode ser uni ou bilateral com um ou os dois membros sendo poupados durante a movimentação. Normalmente animais com uma claudicação bilateral apresentam uma tendência a mudar a distribuição do peso corporal inclinando-se para a frente, estendendo seu pescoço e abaixando a cabeça. Outros sinais mais sutis observados são atrofia da musculatura do membro afetado, a rotação externa do membro acometido quando o animal caminha e ao sentar-se o membro acometido é posicionado em abdução, reduzindo a flexão da articulação (MUIR, 2018).

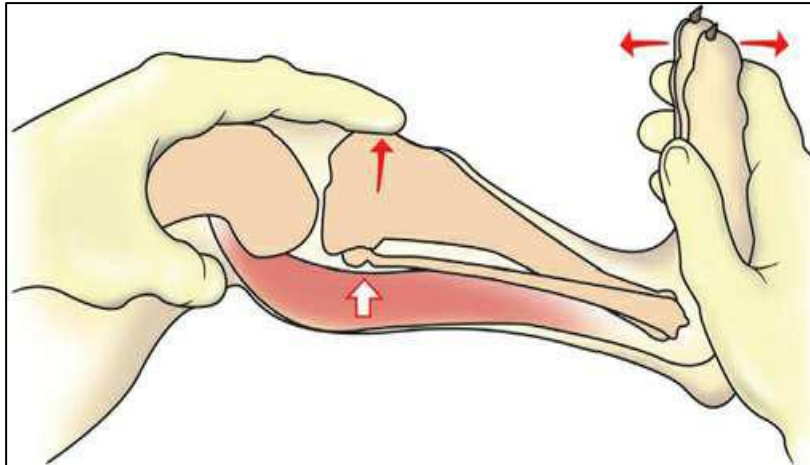
Um dos testes realizados para a avaliação articular é o teste de gaveta, que consiste em provocar um deslocamento craniocaudal na articulação acometida, sendo este diagnóstico de ruptura do ligamento. O teste é realizado com o paciente em decúbito lateral, enquanto o avaliador permanece atrás dele. O avaliador posiciona uma de suas mãos sobre o fêmur distal do animal, com o polegar atrás da fabela e o dedo indicador sobre a patela, os demais dedos envolvendo a coxa, enquanto a outra mão permanece na tíbia, com o polegar atrás da cabeça da fíbula e o indicador sobre a crista tibial com os dedos restantes envolvendo a diáfise da tíbia. Posicionadas as mãos, o avaliador estabiliza o fêmur enquanto move a tíbia em sentido cranial, paralelo ao platô tibial. Durante todo o exame, a tíbia deve ser mantida em uma posição neutra a fim de não confundir a rotação interna com um sinal positivo do teste de gaveta cranial. O

joelho deve ser avaliado em flexão de 90° e em extensão total do membro. Espera-se em um animal com sinal de gaveta positivo ocorra deslocamento da articulação acima do padrão, ou seja, acima de 0 a 2 mm em animais mais velhos e em animais jovens o deslocamento pode chegar a 5 mm, sendo a ruptura confirmada pela ausência de uma parada abrupta no movimento que seria originada pelo LCC (SCHULZ, 2015).



**Figura 2** - Teste de gaveta para diagnosticar rupturas do ligamento cruzado cranial. O exame verifica a limitação do movimento em sentido cranial da tibia exercida pelo ligamento cruzado cranial (Fonte: Fossum, 2015).

Outro teste utilizado é o de compressão tibial, onde o paciente pode estar em decúbito lateral ou em estação. O examinador posiciona-se atrás do animal, com a mão localizada acima da articulação, em superfície cranial, segurando o quadríceps distal. O dedo indicador é posicionado sobre a patela, com a ponta tocando a crista tibial. A outra mão segura a região do metatarso na superfície plantar. O membro é então estendido moderadamente e a mão de baixo flexiona o tarso enquanto a de cima evita uma flexão do joelho. A ponta do dedo indicador da mão superior é utilizada para sentir um deslocamento cranial da crista tibial enquanto o movimento é realizado. Em uma articulação saudável, a mão superior deve sentir a pressão exercida pela patela, enquanto na ruptura, o examinador sente um deslocamento da crista da tibia em sentido cranial. Tal movimento deve-se à pressão cranial exercida na tibia pelo músculo gastrocnêmio (SCHULZ, 2015).



**Figura 3** – Teste de compressão tibial para diagnóstico de rupturas no ligamento cruzado cranial. O exame mimetiza o movimento fisiológico durante a caminhada do paciente, sendo imprescindível durante a avaliação de pacientes com suspeita de RLCC (Fonte: Fossum, 2015).

O diagnóstico em animais com ruptura parcial é mais desafiador, uma vez que a instabilidade articular pode não ser observada ou estar presente em menor grau. No teste de gaveta a instabilidade pode ser percebida em menor grau com o joelho em uma posição de  $90^\circ$ , com a presença de uma parada suave do movimento, mas quando estendido a instabilidade pode desaparecer (MUIR, 2018). Já o teste de compressão tibial pode demonstrar a instabilidade quando o avaliador testa diferentes ângulos de flexão do joelho (SCHULZ, 2015). Qualquer grau de instabilidade articular durante os testes é diagnóstico de ruptura do ligamento, entretanto, a instabilidade articular pode ainda não estar presente, ou ser minimamente perceptível, com alterações sutis durante o exame físico, desse modo, a associação a exames de imagem com presença de efusão sinovial e formação de osteófitos e histórico clínico auxiliam seu diagnóstico (MUIR, 2018).

### 2.2.5. Exames de imagem

As alterações radiográficas nos pacientes com suspeita de ruptura do ligamento são inespecíficas, podendo ser observadas em outras afecções causadoras de osteoartrite. Os achados mais comuns nas rupturas são a compressão, em aspecto cranial articular, do coxim gorduroso do joelho, espessamento da cápsula articular, esclerose subcondral, efusão articular,

fibrose medial e formação de osteófitos ao longo da crista troclear, da superfície caudal do platô e do polo distal patelar, que podem ser visualizadas como uma extensão da cápsula articular caudal (SCHULZ, 2015).

O uso da ultrassonografia pode ser benéfico devido à alta disponibilidade, boa relação custo-benefício e facilidade na execução. O achado mais comum em animais que apresentam uma RLCC aguda é a efusão articular moderada a severa, com o fluido apresentando maior ecogenicidade caso uma hemartrose esteja presente. Nos casos crônicos, podem ser observadas hipertrofia sinovial, irregularidades na superfície óssea, espessamento do LCC com retração nos pontos lesionados e presença ou não de efusão, sendo menos evidente que nos casos agudos (MUIR, 2018).

A utilização da ressonância magnética (RM) tem como vantagem o diagnóstico precoce de artropatias, como a sinovite, degeneração do osso subcondral, e alterações nos meniscos e cartilagem articular, guiando a terapêutica do paciente, oferecendo um prognóstico mais preciso enquanto avalia a eficácia do tratamento. A membrana sinovial pode ser observada mais espessa, semelhante a um nódulo ou massa, principalmente em casos mais crônicos. Alterações ósseas, como osteófitos são diferenciados por sua localização na superfície óssea, apresentando-se com uma intensidade de sinal moderada a baixa e sem presença de uniformidade observada em um osso normal. O ligamento lesionado tem sua intensidade de sinal aumentada, podendo ser observadas alterações em sua morfologia e irregularidades em sua superfície. A junção dos achados na membrana e líquido sinovial, superfície óssea e morfologia do ligamento corroboram para o diagnóstico de uma deficiência do LC aguda. Em casos crônicos, o LCC pode não ser visível ou como uma estrutura de baixa intensidade que não apresenta a morfologia usual do ligamento. Apesar de possuir diversas vantagens, a utilização da RM deve ser ponderada levando em consideração fatores externos como custos, disponibilidade e necessidade de sedação do paciente para realizar o exame, não sendo recomendada em todos os casos (MUIR, 2018).

Um procedimento de grande valia durante a avaliação do joelho é a artroscopia, podendo ser utilizado como método diagnóstico ou de tratamento. As alterações articulares que podem ser observadas pela técnica envolvem a visualização da ruptura, fibrilação ou alteração em sua coloração, possibilitando também a avaliação dos meniscos. A artroscopia permite avaliar o rompimento parcial do ligamento cranial e avaliar o grau de osteoartrite de maneira mais efetiva que comparado às outras modalidades de exames de imagem. Quando utilizada como forma de terapia, ela possibilita a remoção de restos do ligamento, reconstrução, tratamento de lesões

concomitantes nos meniscos e realização de artroplastia por abrasão e microfratura (SCHULZ, 2015).

### **2.3. Tratamento**

O padrão ouro para tratar a ruptura do ligamento é a intervenção cirúrgica, uma vez que esse é o único método que corrige a instabilidade articular de maneira efetiva e diminui a progressão da OA (SCHULZ, 2015). Em casos específicos de animais que possuem outras comorbidades ou não podem ser operados, seja por risco anestésico ou por opção dos tutores, o tratamento conservador pode ser utilizado para melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Cães de menor porte suportam bem a segunda opção, podendo ter boa qualidade de vida após o final do tratamento, entretanto ao longo do tempo a degeneração articular progride de maneira mais rápida que em animais operados. Animais de porte médio a grande não suportam bem o tratamento conservador, visto que as alterações articulares progridem de maneira mais rápida que em animais menores. A OA irá ocorrer independente da opção escolhida, porém, a intervenção cirúrgica é o padrão ouro, pois permite que o animal retorne às atividades mais rapidamente e reduz a velocidade da progressão da degeneração articular (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021).

#### **2.3.1. Tratamento cirúrgico**

As intervenções cirúrgicas podem ser realizadas através de técnicas de reconstrução intra-articular, estabilização extracapsular e osteotomia, sendo a escolha baseada na experiência do cirurgião, custos e tamanho do paciente (SCHULZ, 2015).

##### **2.3.1.1. Técnicas intra-articulares**

As técnicas intra-articulares consistem em passar um tecido autógeno pela articulação, ou por orifícios previamente perfurados no fêmur. Usualmente, o tecido escolhido é a fáscia lata obtida do próprio paciente devido à sua resistência e menor probabilidade de rejeição. Tecidos sintéticos podem ser utilizados, entretanto possuem a desvantagem de poder causar uma reação local, se romperem ou se distenderem. A vantagem desse tipo de técnica é o fato dela mimetizar com maior acurácia a função normal do ligamento, entretanto são mais invasivas e propensas a ruptura ou rejeição do enxerto (SCHULZ, 2015). Devido a isso, tem-se optado pelas técnicas de osteotomia, como o avanço da tuberosidade tibial (TTA) ou o nivelamento do platô tibial (TPLO), fazendo com que as técnicas intra-articulares comecem a cair em desuso (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021).

### **2.3.1.2. Técnicas extracapsulares**

Técnicas extracapsulares envolvem o posicionamento de uma sutura externa à articulação ou redirecionamento do ligamento colateral lateral de forma a envolvê-la, restringindo o movimento de translação cranial da tíbia em relação ao fêmur, suportando a CTC, mimetizando a função do ligamento cruzado cranial. Existem mais de um tipo de técnica de reparo extracapsular, a variação nos pontos de ancoragem reflete na mobilidade articular. Os materiais utilizados podem ser compostos de nylon, fio ortopédico, ou sutura ortopédica entrelaçada, podendo ser amarrados ou conectados a uma dobra. O sucesso do procedimento depende da formação de tecido fibroso periarticular para ancorar a articulação a longo prazo, uma vez que a sutura é uma ancoragem temporária (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021).

### **2.3.1.3. Técnicas de osteotomia**

Em uma articulação normal, a estabilização articular é alcançada de forma indireta pelos ligamentos, meniscos e pela cápsula articular e de forma direta pelos músculos e tendões (SCHULZ, 2015). A osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO) atinge a estabilidade articular por meio de uma estabilização dinâmica, alterando a mecânica da articulação, nivelando o platô tibial a uma angulação que neutralize a CTC. O procedimento consiste em realizar uma osteotomia radial na região tibial proximal, o qual é então rotacionado até obter o ângulo desejado de 5 a 7°, redirecionando o ângulo da compressão tibial de crânio-proximal para caudal ou neutro onde a compressão tibial caudal pode ser controlada de maneira efetiva pelo ligamento cruzado caudal e pela musculatura. O ponto negativo deste procedimento deve-se ao fato dele não ser capaz de controlar a rotação tibial interna, outra função do ligamento cruzado cranial, produzindo um desvio axial. (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021; SCHULZ, 2015).

A TTA é realizada através de um avanço na crista tibial que não sustenta o peso do animal. O procedimento foi descrito pela primeira vez em 2002 no intuito de reduzir a CTC não pelo nivelamento do platô tibial, mas sim pelo ângulo do tendão patelar, localizado entre o ligamento patelar e o platô tibial, onde um ângulo maior que 90° gera a CTC. A articulação é estabilizada por esta técnica através de uma osteotomia no plano frontal da tíbia, avançando a tuberosidade tibial juntamente com o ligamento patelar em sentido cranial até o ângulo do tendão patelar atingir 90° em extensão máxima articular durante a sustentação de peso do animal, aliviando a pressão no ligamento rompido. A forma “clássica” do procedimento envolvia a fixação através de uma placa de tensão e de um *cage*. A técnica foi modificada e as

placas foram removidas, sendo a estabilização da tuberosidade dependente somente do *cage*. Uma das vantagens da técnica é uma taxa de inflamação do ligamento patelar pós operatória menor quando comparado à TPLO (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021; SCHULZ, 2015), enquanto suas desvantagens são possíveis fraturas ósseas, falhas nos implantes, seromas e infecções no local da incisão (WOLF et al., 2012).

### **2.3.2. Tratamento conservador**

Em animais que possuem alguma restrição ao procedimento cirúrgico, como comorbidades, restrições financeiras ou negativa à intervenção cirúrgica por parte dos tutores, o tratamento conservador pode ser uma opção para tentar melhorar a qualidade de vida dos pacientes que possuem uma RLCC. O tratamento consiste em repouso absoluto durante 4 a 8 semanas e uso concomitante de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) por 10 a 14 dias, sendo seu uso prolongado com administração intercalada de dias caso necessário, podendo ser associado ou não o uso de órteses e fisioterapia. Os animais menores possuem uma taxa de recuperação de 85 a 90%, enquanto nos maiores essa taxa varia entre 19 e 78%, entretanto o tempo decorrido para uma melhora clínica não é bem definido. É importante salientar que todos os animais que realizam o tratamento ainda possuem evidência de degeneração articular nos exames de imagem, visto que a deformidade articular não é corrigida (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021). Independentemente da modalidade escolhida, a taxa de sucesso do manejo conservador permanece incerto, especialmente para animais de porte grande, ao mesmo tempo em que se sabe que o animal irá se recuperar mais lentamente e seguirá apresentando outras alterações, como perda de massa muscular no membro afetado, grau variável de claudicação e OA (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021; KWANANOCHA et al., 2024). O sucesso do tratamento conservador envolve a associação entre a redução da injúria articular ao mesmo tempo em que se tenta evitar a evolução da OA. Existem ainda diversas variações do tratamento com diferentes finalidades, como controlar a inflamação e dor articular utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) (COOK et al., 2016; RAULINAITÉ et al., 2023) promover regeneração do ligamento (CANAPP et al., 2016) e proteção da articulação com células tronco mesenquimais (MSC) (MUIR et al., 2016), contenção física e proteção do membro com órteses (HART et al., 2016), controle do sobrepeso do animal (WUCHERER et al., 2013) e fisioterapia (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021).

Uma vez que a deformidade articular não é corrigida pelo tratamento conservador, a OA gerada pela RLCC deve ser um ponto de atenção no planejamento do tratamento, visto que ela desencadeia a sinovite, formação de osteófitos, perda progressiva da cartilagem articular e

remodelamento do osso subcondral, que juntos culminam na perda da função do membro devido à dor e à rigidez articular. A fisioterapia atua inibindo o ciclo da OA, evitando assim que a cascata de eventos se perpetue (MILLE; MCCLEMENT; LAUER, 2022). Em animais que realizaram o tratamento conservador, a fisioterapia visa melhorar a qualidade de vida através da redução da dor, prevenção da perda de musculatura, evitando os mecanismos de compensação do membro, diminuindo assim desajustes posturais (MUIR, 2018). O sobrepeso é um fator que influencia diretamente a RLCC e a gravidade da OA que a segue (SPINELLA; ARCAMONE; VALENTINI, 2021). Sozinha, a redução no peso do paciente pode melhorar clinicamente a função do membro afetado e reduzir os efeitos deletérios observados na radiografia, quando utilizada em conjunto com a fisioterapia, pode auxiliar no tratamento conservador melhorando sua qualidade de vida (WUCHERER et al., 2013). O PRP pode ser indicado em casos em que o animal não tolera a administração de anti-inflamatórios ou quando o uso crônico deles oferece algum risco à saúde do paciente. Cook et al. (2016) utilizaram o PRP em animais com RLCC e lesão em menisco induzidas cirurgicamente e concluíram que seu uso pode auxiliar na regeneração do ligamento e reduzir a sinovite que sucede à ruptura do ligamento, diminuindo a dor dos pacientes e melhorando a função do membro afetado. Raulinatè et al. (2023) compararam a eficácia do PRP quanto a dor, função do membro e inflamação do joelho de animais com RLCC de ocorrência natural frente ao uso de AINEs e perceberam tanto a analgesia quanto a claudicação do grupo tratado com PRP foram melhores nos animais tratados com AINEs ao final do período avaliado. Enquanto os fármacos apresentaram seu pico de eficácia nos primeiros 14 dias, os animais do grupo da PRP apresentaram uma melhora mais evidente e duradoura quanto ao grau de claudicação e mobilidade do membro. É interessante notar que o uso do PRP pode ser benéfico para casos específicos, apesar do início do efeito anti-inflamatório ocorrer mais lentamente em comparação aos AINEs, seu efeito dura por mais tempo e não apresenta reações adversas (COOK et al., 2016; RAULINAITÈ et al., 2023).

O tratamento conservador possui ainda outra limitação referente ao uso prolongado de AINEs para o controle da dor dos pacientes. Apesar de pequenos de início, os efeitos do anti-inflamatório podem acumular-se ao longo do tempo. O trato gastrointestinal é o mais frequentemente associado aos efeitos adversos dos AINEs, sinais como vômito, inapetência, diarreia e úlceras gastrointestinais são observados em casos de intoxicação. Sinais mais graves como, lesão renal e coagulopatias também podem estar associados ao uso dos fármacos, especialmente em cães idosos que apresentam comorbidades hepáticas, cardíacas ou renais (INNES; O'NEILL; LASCELLES, 2010; LAWSON; WALTON, 2019).

### 2.3.3. Prognóstico

Animais que iniciaram o tratamento mais cedo possuem uma maior chance de retornar às atividades mais rapidamente, enquanto animais que apresentam uma degeneração crônica possuem uma gama de outras alterações atreladas à OA. Em todas as modalidades de tratamento, o objetivo é a melhora da qualidade de vida do animal e o atraso da inevitável progressão da OA. Animais que passam por um tratamento conservador podem voltar a ter uma vida “normal” dentro de poucas semanas, especialmente se forem de porte menor (<15kg), entretanto o período de recuperação é mais longo, a OA progride mais rapidamente e a atrofia muscular é mais acentuada do que em animais que passam pelo procedimento cirúrgico (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021).

A intervenção cirúrgica apresenta bons resultados quanto ao tratamento da RLCC, com uma taxa de sucesso que varia de 85-90% (SCHULZ, 2015), entretanto ela também possui suas limitações, uma vez que podem ocorrer complicações no pós-operatório dos pacientes, como tendinite patelar, fraturas ósseas, falha de implantes, infecções no local de incisão (WUCHERER et al., 2013), lesões secundárias no menisco, artrite séptica, osteomielite e persistência de instabilidade articular, seromas e deiscência de pontos (BERGH; PEIRONE, 2012; COSTA et al., 2017). Além disso, mesmo sendo operado, com o passar dos anos pode haver um declínio nas atividades do paciente, um aumento da incapacidade de locomoção, incômodos em climas frios e rigidez de membros relacionados a progressão da OA (SCHULZ, 2015).

Visando a melhora na qualidade de vida dos pacientes que não podem ser operados e a redução da progressão da OA, o tratamento conservador utilizando células tronco mesenquimais (MSC) foi pensado como alternativa aos métodos tradicionais, uma vez que ele é pouco invasivo, auxilia na regeneração do ligamento (CANAPP et al., 2016), reduz a reação inflamatória na articulação (MUIR et al., 2016) e auxilia no controle da dor de forma semelhante aos AINEs (TARONI et al., 2017).

### 2.4. Células tronco

As MSCs são células indiferenciadas com alta capacidade de multiplicação presentes em virtualmente todos os tecidos mesenquimais derivados do mesoderma como tecido adiposo, placentário, polpa dental, cordão umbilical e tecido conectivo cutâneo, podendo diferenciar-se em várias linhagens celulares *in vivo*, a depender do local de origem, como osteócitos, condrócitos, adipócitos e mioblastos. *In vitro* elas podem ser induzidas a se diferenciar em

outras linhagens endodermiais, como hepatócitos e células pancreáticas além de linhagens ectodermiais, como astrócitos e células epiteliais. Tal plasticidade deve-se ao fato de as células serem responsivas ao ambiente em que se encontram, produzindo linhagens diferentes. A terapia celular tem emergido como uma forma alternativa aos tratamentos convencionais devido ao seu potencial imunomodulatório, principalmente em doenças inflamatórias locais ou sistêmicas (BAOUCHE et al., 2023).

As MSCs são um grupo heterogêneo de células multipotentes caracterizadas por sua habilidade de multiplicação. Sua caracterização é baseada em três fatores: aderência ao plástico, diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos em cultura e presença de marcadores de superfície celular específicos positivos, como CD29, CD44, CD73, 90 e 105 e negativos para CD45, 34, 14, 11b, 19 ou CD79a- e HLA-DR- (BAOUCHE et al., 2023; DOMINICI et al., 2006).

Mesmo quando aplicadas por via endovenosa, as MSC possuem a capacidade de migrar para locais de inflamação através de um mecanismo de *homing* que as atrai por quimiotaxia, semelhante à ação dos leucócitos. Elas utilizam moléculas de adesão para se ligar aos locais que apresentam lesão isquêmica ou sítios de inflamação, onde migram para o interstício e se incorporam ao microambiente local (CHAVAKIS; URBICH; DIMMELER, 2008).

Acreditava-se que a principal vantagem da terapia com MSC seria a possibilidade de renovação tecidual local através da capacidade delas em se diferenciar e substituir o tecido danificado, entretanto, foi observado que somente uma pequena porção dessas células transplantadas desempenha tal função, não justificando o efeito observado nos pacientes. Foi então sugerido que a principal função das células seria a liberação de fatores que auxiliam o reparo tecidual de maneira indireta através de um efeito parácrino (IVANOVSKA et al., 2022). As MSC modulam a resposta inflamatória no organismo através da síntese e secreção de moléculas anti-inflamatórias e mediadores da inflamação, como a interleucina 6 (IL-6), fator estimulador de macrófagos, interferon gama (IFN $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) além de controlar a maturação de monócitos. Elas auxiliam no reparo tecidual por secretarem moléculas bioativas que promovem angiogênese, inibem a formação de tecido fibroso, e estimulam a diferenciação tecidual local (BAOUCHE et al., 2023).

A angiogênese promovida pelas células tronco desempenha um papel fundamental na reparação tecidual, uma vez que o aporte sanguíneo é extremamente necessário para a oxigenação local. Algumas das moléculas secretadas pelas MSC que foram identificadas como promotoras da neovascularização são o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), angiopoietina-1, quimiocina ligandina 2 (CCL2), IL6,

fator de crescimento placentário e proteína rica em cisteína indutora de angiogênese 61 (BAOUCHE et al., 2023).

As células tronco agem localmente interagindo diretamente com as células por intermédio de nanotubos ou ancoragem via receptor celular, transferindo moléculas e outras organelas. O recrutamento de células tronco endógenas se dá através da secreção de quimiocinas, como o fator estimulante de queratinócitos, metaloproteinases de matriz nove (MMP9), bFGF, MMP22 e fator de crescimento de hepatócitos (HGF), CXCL12 ou CCL5, que estimulam a regeneração local. Outra capacidade dessas células é de regular a apoptose através da redução do estresse oxidativo pela liberação de heme oxigenase-1 ou eritropoietina e produção de outros fatores como o próprio HGF, bFGF e fator estimulante semelhante à insulina 1 (IGF1). Sistemicamente, a secreção de fatores tróficos, no microambiente ou carregados através de vesículas extracelulares, como a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), antígeno leucocitário humano 5 (HLA5), prostaglandina E2 (PGE2), TNF $\alpha$ , IL-6 e antagonista do receptor IL-1 modulam a resposta imune do animal (BAOUCHE et al., 2023).

As células tronco possuem diversos usos em doenças autoimunes, como a atopia canina, doença intestinal inflamatória, asma felina, gengivoestomatite crônica felina, doenças articulares como OA, osteocondrite, tendinite e ruptura de ligamentos (BAOUCHE et al., 2023), doenças neurológicas como nas sequelas causadas pelo vírus da cinomose canina (CHOPP; LI, 2002), doença renal crônica (GRANGE et al., 2019) e doenças oculares (FALCÃO et al., 2020; VILLATORO et al., 2015).

#### **2.4.1. Tratamento da RLCC com células Tronco**

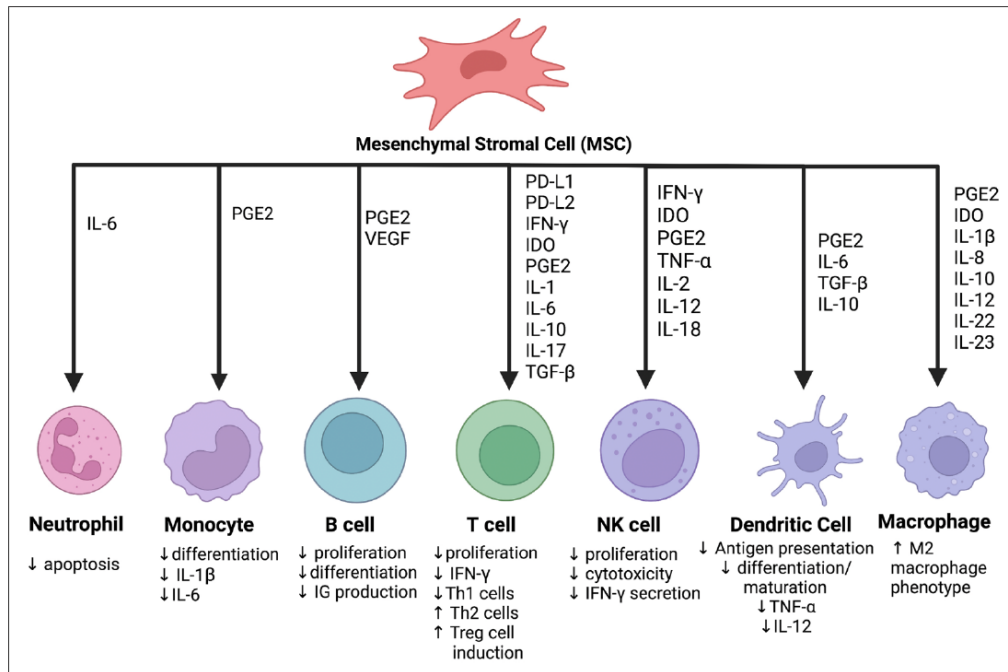
As células tronco mesenquimais atuam de diferentes formas nas lesões articulares, possuindo a capacidade de se transdiferenciar em condrócitos *in vivo*, além de produzirem um efeito parácrino anti-inflamatório. As MSC auxiliam no recrutamento de células tronco que já estão presentes no local da injúria a se diferenciarem além de secretar diversas moléculas bioativas melhorando a taxa de renovação tecidual local (FILARDO et al., 2016).

As MSC representam uma opção viável no tratamento de rupturas parciais do ligamento cruzado cranial uma vez que elas podem ser utilizadas para auxiliar a regeneração do ligamento, melhorar a função do membro (CANAPP et al., 2016) e auxiliar no controle da dor (TARONI et al., 2017). A principal função das MSC é auxiliar o corpo do animal a se regenerar, apesar de nem todas as células transplantadas se diferenciarem em condrócitos, elas possuem a habilidade de induzir a diferenciação das MSC locais em condrócitos, promover angiogênese e reduzir a apoptose de células locais através de sua ação parácrina. Por meio desta propriedade

também, as MSC reduzem a inflamação local, inibindo a ativação e diferenciação de linfócitos T e B e a cascata inflamatória e reduzem a dor do paciente. Ao longo dos anos, pesquisadores voltaram sua atenção à reação inflamatória que precede a ruptura do ligamento cruzado, uma vez que foi demonstrado que tal reação pode acarretar em diversas alterações degenerativas na matriz extracelular, metabolismo celular e, por consequência, a resistência mecânica do ligamento parcialmente rompido (MUIR, 2018; MUIR et al., 2016).

Muir et.al, (2016) avaliaram os marcadores inflamatórios presentes na circulação e no fluido sinovial de animais apresentando uma ruptura do ligamento cruzado cranial e uma ruptura parcial no membro contralateral antes e após a aplicação das MSC e constataram uma redução nos níveis de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e proteína C-reativa (CRP) circulantes e um aumento nos níveis de Interleucina 8 (IL-8). No líquido sinovial, foi demonstrado uma redução nos níveis de IFN $\gamma$  e de CRP. A proteína C-reativa é um marcador inflamatório produzido pelos hepatócitos e regulada principalmente pela IL-6 que normalmente está aumentado em animais que apresentam condições de inflamação, como no caso da ruptura parcial ou total do ligamento cruzado e tende a diminuir após tratamento bem-sucedido, podendo ser um marcador da gravidade da sinovite/OA. Apesar de não ser bem elucidada, a resposta imune nos pacientes tratados com MSC tendeu a reduzir, apesar dos níveis de IL-8 permanecerem altos mesmo após oito semanas do tratamento, especialmente em animais que possuíam uma ruptura parcial do ligamento. A IL-8 é um agente pró-inflamatório e angiogênico responsável por atrair por quimiotaxia neutrófilos e macrófagos aos sítios de inflamação e está relacionada com o risco de uma ruptura no membro contralateral, sugerindo que a ação das MSC envolve uma complicada rede de modulação da resposta inflamatória uma vez que elas mesmas são atraídas pela IL-8 ao local de inflamação e uma vez lá, também a secretam. Uma possível explicação para esta observação é que a secreção da IL-8 por parte das MSC possui outra função, estando relacionada à polarização dos macrófagos do tipo M2 que auxiliam o reparo tecidual e têm propriedades anti-inflamatórias (Figura 4), uma vez que a correlação entre os níveis de CRP e IL-8 circulantes observados no estudo reduziu após a aplicação (RIVAS et al., 2023; YUNNA et al., 2020). Células tronco possuem a capacidade de modular a inflamação reduzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , além de aumentarem a diferenciação de células T reguladoras como CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e FoxP3<sup>+</sup>, responsáveis por secretar fatores anti-inflamatórios como IL-10 e TGF- $\beta$  que desempenham um papel fundamental na regulação da resposta imune do animal. Depois de aplicadas, as células tronco induzem a redução da resposta imune do animal diretamente por meio da secreção ativa de interleucinas e indiretamente pela ação das células que se diferenciaram por meio de sua ação

parácrina. Estas regulam a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> reduzindo os efeitos negativos produzidos pela resposta imune principalmente dos tipos Th1 e Th17 e perpetuam o efeito gerado pela aplicação das MSC (PARK et al., 2016).



**Figura 4** - Fatores secretados pelas células tronco mesenquimais: A IL-8 é secretada juntamente com outros fatores anti-inflamatórios como a IL-10 e PGE2, alterando a polarização dos macrófagos presentes no local inflamado para o tipo M2 que auxilia no reparo tecidual (Fonte: Rivas et al., 2023).

Outra vantagem na utilização de MSCs é a possibilidade da substituição ao uso de AINES no pós-operatório imediato. Os anti-inflamatórios são amplamente utilizados no pós-operatório de animais que passam por cirurgia de estabilização da articulação do joelho por controlarem a reação inflamatória local e a dor. Em um estudo comparativo, um grupo de cães tratados com uma única dose de MSC após a TPLO não apresentou diferenças significativas quanto à dor quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com anti-inflamatório no pós-cirúrgico. Ambos os grupos apresentaram um manejo adequado durante todo o estudo, entretanto, uma diferença significativa foi observada quanto a cicatrização óssea do grupo tratado com MSCs, onde em M1 (30 dias) foi observado um resultado superior do grupo tratado em comparação ao grupo controle, e em M2 (60 dias), todos os animais do grupo das MSC s apresentaram completa cicatrização enquanto nenhum do grupo do anti-inflamatório tinha apresentado (TARONI et al., 2017).

Canapp et al. (2016) avaliaram a eficácia do tratamento da RLCC utilizando uma única aplicação de MSC associadas ao PRP, sendo observada uma melhora na análise objetiva da marcha dos pacientes, uma remissão parcial ou completa da ruptura com presença de neovascularização local e distribuição normal das fibras do ligamento nos locais previamente lesados. Foi observado também que os animais apresentaram uma melhora na qualidade da marcha após 90 dias da aplicação das células tronco (CANAPP et al., 2016).

O uso das MSC pode ser promissor no tratamento da ruptura do ligamento cruzado cranial, entretanto, mais estudos são necessários na área, uma vez que há uma discrepância entre os achados, com variação de doses e falta de acompanhamento em longo prazo dos animais tratados (FILARDO et al., 2016). É sugerido que uma única aplicação das MSCs pode ser efetiva no controle da dor (TARONI et al., 2017), reação inflamatória (MUIR et al., 2016), pode auxiliar na regeneração do ligamento (CANAPP et al., 2016), além de estabilizar a progressão da OA a longo prazo, promovendo uma melhora na qualidade de vida dos animais (CABON et al., 2019), podendo substituir a utilização de outras medicações (CANAPP et al., 2016) ou procedimentos, sendo benéfica em casos específicos. Entretanto, vale ressaltar a necessidade de padronização dos estudos na área para validar a utilização das MSC no reparo do ligamento cruzado cranial ou como substituto aos fármacos utilizados rotineiramente (FILARDO et al., 2016).

Em virtude das limitações do tratamento conservador convencional e necessidade de alternativas para animais que, por algum motivo, não podem ser submetidos a uma intervenção cirúrgica, o presente trabalho buscou avaliar a eficácia de uma única aplicação de MSC no controle da dor e na melhora da função de membro afetado de cães que apresentaram uma RLCC parcial em um período de 30 dias.

## CAPÍTULO 2

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Seleção de casos**

##### **3.1.1. Animais**

Prontuários de cães atendidos na clínica veterinária Saint Germain (Florianópolis - SC) pelo médico veterinário ortopedista Evandro Barreto, entre os anos de 2021 e 2023 com diagnóstico de ruptura parcial do ligamento cruzado cranial foram selecionados e analisados quanto a eficácia da utilização das MSC no tratamento conservador e no impacto da qualidade de vida dos pacientes tratados quanto às escalas de dor e de claudicação.

Os critérios de inclusão foram: histórico de claudicação inferior a 15 dias, testes de gaveta e compressão tibial positivos e ausência de ruptura total do ligamento, os casos excluídos do estudo foram de animais que apresentavam outras comorbidades clínicas e histórico de alterações articulares prévias.

A ruptura parcial do ligamento foi diagnosticada com base no histórico de claudicação intermitente de início inferior a 15 dias, teste de gaveta e de compressão tibial positivos, presença de dor quando o membro é hiperestendido e ausência de ruptura total do ligamento. A ruptura parcial foi diferenciada da total pela ausência de instabilidade articular quando o joelho do animal era estendido durante os testes. O teste de gaveta revelou uma instabilidade mínima somente quando o joelho foi flexionado em um ângulo de 90° ainda apresentando um ponto de parada suave devido à presença do LCC, a compressão tibial só demonstrou instabilidade após a articulação ser flexionada em ângulos de 45-90°, não sendo percebida quando o joelho foi estendido, conforme descrito por (SCHULZ, 2015).

##### **3.1.2. Exame físico ortopédico**

Após o exame clínico, o avaliador classificou os animais utilizando as escalas numéricas adaptadas com escore de 0 a 4 para avaliação de dor e claudicação dos animais, previamente à aplicação das MSC (D0) e 30 dias após a aplicação (D30), sendo 0 ausência de dor/ marcha normal no membro acometido e 4 representa dor extrema/ membro não apoiado em solo com presença de compensação contralateral, sendo o diagnóstico e avaliações em D0 e D30 realizados pelo mesmo avaliador (Quadro 1).

Escore	Escala de dor	Escala de claudicação
0	Ausência de dor	Ausência de claudicação
1	Dor leve	Claudicação quase imperceptível com suporte de peso
2	Dor moderada	Claudicação com presença de suporte de peso
3	Dor intensa	Claudicação intensa com apoio da ponta do pé em solo
4	Dor extrema	Claudicação intensa com ausência de apoio do membro em solo

**Quadro 1** - Escalas numéricas de dor e função de membro utilizadas, adaptadas de Enomoto et al. (2024) e Park et al. (2024)

### 3.2. Células tronco mesenquimais

#### 3.2.1. Obtenção, isolamento, cultivo e congelamento das MSC

As células-tronco mesenquimais utilizadas no estudo foram obtidas de banco de células comercial BIO CELL Terapia Celular. O isolamento, cultura e congelamento foram realizados pelo laboratório BIO CELL. As células foram derivadas de tecido adiposo de doadores saudáveis em acordo com RAMOS et al., 2020. Um fragmento de 20 gramas de tecido adiposo é retirado da base da cauda dos doadores mediante anestesia e lavado com solução NaCl 0,9% para remoção de detritos celulares e sanguíneos. Após a lavagem inicial, o fragmento de tecido é cortado em fragmentos menores e expostos a colagenase para ser digerido enzimaticamente. Após o procedimento as células são filtradas, iniciando a seleção das MSC. Em seguida as células são semeadas em frasco de cultura contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e incubadas em estufa a 37.5°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio é descartado juntamente às células não aderidas e um novo meio de cultura é adicionado aos frascos. O meio foi trocado a cada 3 dias até as células atingirem 80% de confluência, ponto onde são tripsinizadas para remoção do frasco de cultura e proceder a contagem de células na câmara de Neubauer e armazenagem em palhetas contendo um milhão de células, dimetilsulfóxido (DMSO) e soro fetal bovino (SFB) para congelamento em nitrogênio líquido conforme descrito na literatura (CUI; PU, 2009; DE ROSA et al., 2009).

#### 3.2.2. Caracterização das MSC

Cinco palhetas foram descongeladas para testes de caracterização das MSC. A caracterização foi realizada por meio da presença de propriedades específicas destas, como a aderência ao plástico em cultura, expressão de marcadores específicos de indiferenciação na superfície celular e pela capacidade de se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos como determina a *International Society for Cellular Therapy* (DOMINICI et al., 2006). Para avaliar a expressão de marcadores de superfície, as células foram incubadas com anticorpos

específicos CD29-RD1 murino anti-humano, CD44-FITC murino anti-equino, caprina anti-canina CD90 primária e IgM murino conjugado anti-caprino AF594 (secundário) para marcadores positivos e CD34-FITC anti-humano murino para marcador negativo, sendo avaliados por imunofenotipagem por citometria de fluxo em citômetro Amnis® (ThermoFisher Scientific®). A viabilidade das células após descongelamento foi avaliada através de citometria de fluxo no citômetro Amnis® (ThermoFisher Scientific®) com *dead cell apoptosis kit*, utilizando Annexin V Alexa Fluor™ 488 e Iodeto de Propídio (PI). O controle de qualidade do produto foi realizado conforme descrito por Alves e Guimarães (2009) passando por avaliação de esterilidade através de membrana filtrante e pesquisa de endotoxinas por meio de teste *Lymulus Amebocyte Lysate (LAL)* (Pyrosate®). Foi utilizado o teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) (Veriti Thermal Cycler - ThermoFisher Scientific®) em busca de *Mycoplasma* (FALCÃO et al., 2020; RAMOS et al., 2020). Quanto a habilidade de diferenciação, as células foram cultivadas em meios específicos. Para diferenciação em adipócitos o meio foi acrescido de fator monofosfato de adenosina (cAMP), 3-isobutyl-1-metil-xantina (IBMX), dexametasona, insulina recombinante humana e indometacina. As células originárias do meio foram coradas com coloração Oil Red O. Para diferenciação em condrócitos, as MSC foram cultivadas com meio acrescido de insulina, TGFβ1 e ascorbato, sendo coradas com coloração Alcian Blue (DE FRANCESCO et al., 2015; DOMINICI et al., 2006). Para diferenciação em osteócitos o meio foi suplementado com dexametasona, ácido ascórbico 2-fosfato, e beta-glicerofosfato. As células do meio foram coradas com coloração Alizarin Red (KANG et al., 2012). A coloração positiva das células caracteriza o processo de diferenciação.

Todos os lotes de células-tronco utilizados nos animais demonstraram-se aptos à utilização conforme os modelos descritos (DOMINICI et al., 2006). As células foram devidamente obtidas, isoladas e caracterizadas antes de sua utilização. 24 horas após seu isolamento, as colônias de células aderentes ao plástico foram observadas no fundo dos frascos de cultura. As células cresceram e alongaram-se após dois dias, adotando um formato fusiforme, semelhante a fibroblastos. Após atingir 80% de confluência a colônia apresentou características fenotípicas das MSC e estavam aderidas ao plástico.

A imunofenotipagem demonstrou que as células apresentavam quantidades expressivas de marcadores superficiais de indiferenciação celular CD29, CD44 e CD90 e baixas quantidades do marcador negativo CD34. Ainda, a análise de viabilidade das células demonstrou um alto número de células viáveis após o descongelamento e resultado negativo para patógenos, *Mycoplasma* e endotoxinas.

### 3.2.3. Aplicação das MSC

Os animais que participaram do estudo receberam uma aplicação intra-articular de MSC alogênicas na dosagem de  $3 \times 10^6$  de células.

Para o processamento, cada amostra foi descongelada, centrifugada e lavada a temperatura ambiente protegida da luz e centrifugada para a concentração das células. O meio de aplicação próprio da BIO CELL® Terapia Celular foi adicionado à seringa conforme o porte do paciente, variando de 0,5 a 2 ml juntamente com o concentrado de células. O processamento ocorreu em um período máximo de duas horas previamente à aplicação.

A aplicação ocorreu em ambiente de centro cirúrgico, após tricotomia e posterior antisepsia e uso de campo estéril sem retirada de líquido sinovial utilizando um catéter 22G (0,9 x 25 mm). As células foram aplicadas via intra-articular, a maioria dos animais permitiu a aplicação utilizando somente a contenção física, para os que não permitiram, a aplicação foi realizada mediante anestesia, com o protocolo definido pelo anestesista presente, na articulação afetada (figura 5). Os tutores foram instruídos a administrar Dipirona 500mg/ml na dosagem de 25mg/kg, três vezes ao dia no caso de o paciente apresentar sinais de desconforto no membro da aplicação.



**Figura 5** - Aplicação intra-articular das MSC em região de joelho (cedidas pelo M.V. Evandro Barreto).

### **3.3. Análise estatística**

Os dados foram analisados por meio do software SAS® academic for students. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar os dados de dor e função de membro obtidos entre D0 e D30. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a correlação entre as escalas de dor e claudicação em D0 e em D30 bem como a correlação entre a idade e os parâmetros avaliados, sendo os valores estatisticamente significativos adotados para  $P < 0.05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Animais

Ao todo, 25 casos foram selecionados para o estudo, sendo 15 fêmeas (60%) e 10 machos (40%) com média de idade de 9,4 anos ( $\pm 3,916$ ), variando de 3 a 17 anos. A distribuição dos cães quanto a raça foi a seguinte: sem raça definida (SRD) (28%), Yorkshire terrier (12%), Bull terrier (8%), Labrador (8%), Maltês (8%), Beagle (4%), Cane Corso (4%), Chihuahua (4%), Pitbull (4%), Shih-tzu (4%), Golden Retriever (4%), American Staffordshire (4%), Dogo Argentino (4%), Pastor Belga (4%) (Figura 6).

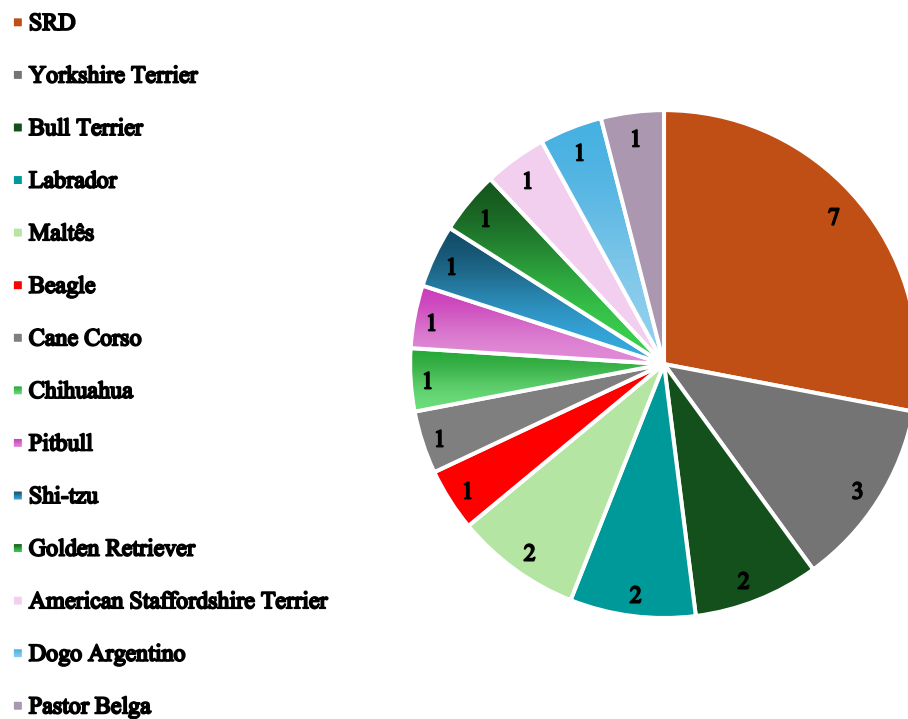


Figura 6 - Distribuição dos casos selecionados por raça

### 4.3. Avaliação clínica

#### 4.3.1. Avaliação clínica antes da aplicação das MSC

Com relação à escala de claudicação, os animais apresentaram uma média de 3,12  $\pm$  0,525 de desvio padrão em D0, quanto às médias para a escala de dor antes do tratamento, os valores foram de 3,2  $\pm$  0,408 (tabela 1)

**Tabela 1** - Raça, idade e valores individuais de escala de claudicação e grau de dor articular obtidos previamente à aplicação das MSC (SRD: sem raça definida)

Paciente	Raça	Idade	Escala de claudicação D0	Escala de dor articular D0
1	Yorkshire Terrier	8 anos	3	3
2	Staffordshire Bull Terrier	9 anos	3	3
3	Beagle	14 anos	3	3
4	SRD	15 anos	3	3
5	Yorkshire Terrier	15 anos	3	3
6	Cane Corso	8 anos	3	3
7	Chihuahua	13 anos	3	3
8	Staffordshire Bull Terrier	5 anos	3	4
9	Labrador retriever	5 anos	4	3
10	Pit Bull	12 anos	4	3
11	SRD	14 anos	4	4
12	Yorkshire Terrier	17 anos	3	4
13	SRD	5 anos	4	3
14	SRD	12 anos	2	3
15	Maltês	8 anos	3	3
16	SRD	13 anos	3	3
17	Shih-tzu	5 anos	3	3
18	Golden retriever	8 anos	3	3
19	SRD	9 anos	3	3
20	American Staffordshire Terrier	3 anos	3	3
21	SRD	8 anos	3	3
22	Dogo Argentino	8 anos	2	3
23	Labrador retriever	10 anos	3	4
24	Pastor Belga	4 anos	3	3
25	Maltês	7 anos	4	4

### 4.3.2. Avaliação clínica 30 dias pós-aplicação

Em D30, as médias obtidas na escala de claudicação dos pacientes caíram para 1,440 ( $\pm 1,193$  de desvio padrão), enquanto a dor observada nos pacientes também caiu para 1,440 ( $\pm 0,960$ ) no trigésimo dia (tabela 2)

**Tabela 2** - Raça, idade e valores individuais de escala de claudicação e grau de dor articular obtidos após a aplicação das MSC (SRD: sem raça definida).

Paciente	Raça	Idade	Escala de claudicação D30	Escala de dor articular D30
1	Yorkshire Terrier	8 anos	0	0
2	Staffordshire bull terrier	9 anos	0	0
3	Beagle	14 anos	3	3
4	SRD	15 anos	2	1
5	Yorkshire Terrier	15 anos	3	2
6	Cane Corso	8 anos	1	2
7	Chihuahua	13 anos	0	1
8	Staffordshire bull Terrier	5 anos	0	1
9	Labrador	5 anos	4	2
10	Pit Bull	12 anos	2	2
11	SRD	14 anos	1	1
12	Yorkshire Terrier	17 anos	2	3
13	SRD	5 anos	1	1
14	SRD	12 anos	0	0
15	Maltês	8 anos	3	2
16	SRD	13 anos	2	2
17	Shih-tzu	5 anos	1	1
18	Golden Retriever	8 anos	0	0
19	SRD	9 anos	2	1
20	American Staffordshire Terrier	3 anos	2	3
21	SRD	8 anos	1	1
22	Dogo Argentino	8 anos	0	1
23	Labrador retriever	10 anos	1	1
24	Pastor Belga	4 anos	2	2
25	Maltês	7 anos	3	3

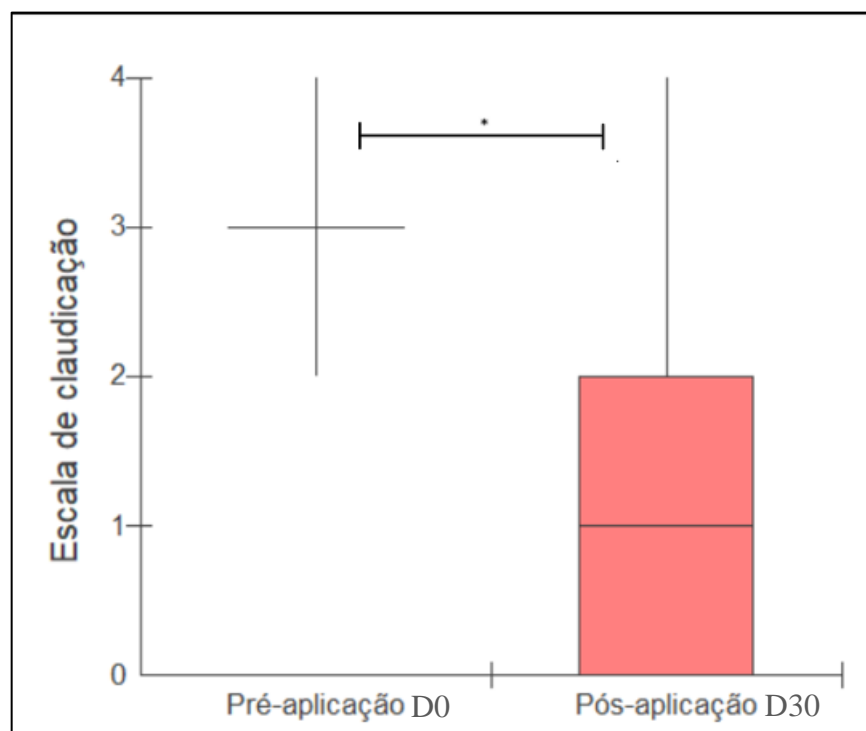
### 4.3.3. Escala de claudicação

Analisando os dados, os animais apresentaram uma redução na escala claudicação em D30 quando comparado aos parâmetros obtidos em D0. Foi demonstrado que houve uma redução nas medianas obtidas para a escala de claudicação entre o D0 e D30, sendo de 3 (Q1=3, Q3=3) e 1 (Q1=0, Q3=2) respectivamente, representando uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.001$ ). Dados dispostos na tabela 3 e figura 7.

**Tabela 3** - Teste de Wilcoxon medianas obtidas antes e após a aplicação das MSC para escala de claudicação

Medianas escala de claudicação antes e após o tratamento (Q1 - 3)			
75%(Q3)	3	75%(Q3)	2
Mediana	3	Mediana <sup>a</sup>	1
25%(Q1)	3	25%(Q1)	0

<sup>a</sup> valor de  $P < 0.001$



**Figura 7** - Boxplot comparando medianas obtidas da escala de claudicação entre D0 e D30 \* representando valor de  $P < 0.001$

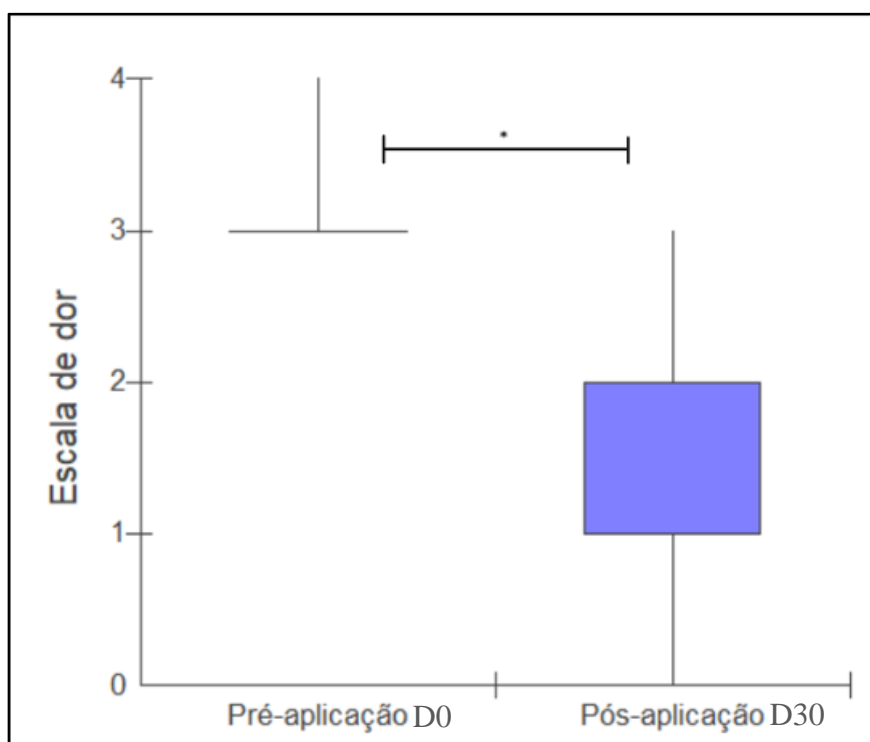
#### 4.3.4. Escala de dor

Com relação às diferenças entre as medianas obtidas na escala de dor, no D0 os animais apresentaram um valor de 3 (Q1 = 3, Q3 = 3) e no dia 30, o valor da mediana foi de 1 (Q1 = 1, Q3 = 2), quando comparados, os resultados obtidos representaram uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) na redução da escala de dor dos animais tratados. Dados dispostos na tabela 4 e figura 8.

**Tabela 4** - Teste de Wilcoxon com valor de P e medianas obtidas antes e após a aplicação das MSC para escala de dor.

Medianas escala de dor antes e após o tratamento (Q1 - 3)			
75%(Q3)	3	75%(Q3)	2
Mediana	3	Mediana <sup>a</sup>	1
25%(Q1)	3	25%(Q1)	1

<sup>a</sup> valor de  $P < 0.001$



**Figura 8** - Boxplot comparando medianas de dor obtidas em D0 e D30 \* representando valor de  $P < 0.001$

#### **4.3.5. Correlação das escalas de claudicação e dor**

Quanto à correlação de Pearson, os valores obtidos para a correlação entre a escala de claudicação e dor em D0 de 0,273, com valor de  $P = 0,186$ . Em D30 os valores se correlacionaram obtendo o valor de 0,811, com valor de  $P < 0,001$ , com relação à idade, os parâmetros avaliados não apresentaram uma correlação estatisticamente significativa.

## 5. Discussão

O tratamento conservador tem como objetivo reduzir os sinais clínicos observados nos animais acometidos e melhorar sua qualidade de vida ao passo que tenta reduzir a progressão da OA (BRIOSCHI; ARTHURS, 2021), entretanto, suas limitações quanto aos efeitos adversos do uso de fármacos e taxa de sucesso são uma preocupação, especialmente para cães maiores, idosos e que possuem comorbidades.

Existem diversos fatores que influenciam a escolha pelo tratamento conservador do animal com RLCC, sendo um deles o risco relativo ao procedimento cirúrgico/anestesia. Animais idosos possuem até o dobro de chances de morrer devido aos efeitos da anestesia durante o procedimento ou pouco após receber alta quando comparados a animais jovens, chance essa que pode ser aumentada pela presença de comorbidades comuns nesses pacientes, como problemas cardíacos ou renais (MATTHEWS et al., 2017). A vantagem de tratar animais com uma aplicação intra-articular é que muitas vezes a contenção física e anestesia local são suficientes para sua realização, dispensando o uso de anestesia geral ou sedação no paciente, reduzindo o risco do tratamento, evidenciado pelo fato de que 30 dias após a aplicação, nenhum óbito foi relatado.

Outra preocupação relacionada à cirurgia são as complicações no período pós-operatório, como fraturas ósseas, osteomielites, falhas nos implantes, persistência da instabilidade articular, infecções no local da incisão, tendinites patelares, seromas e deiscência de pontos (PACCHIANA et al., 2003; WOLF et al., 2012). Abordagens menos invasivas podem ser benéficas a depender do paciente, uma vez que a ocorrência de complicações no pós-operatório pode exigir uma segunda intervenção cirúrgica, representando mais uma situação de risco aos animais mais idosos. Uma abordagem conservadora, portanto, seria uma opção mais segura para esse grupo, uma vez que não envolve a possibilidade de uma segunda intervenção. As MSC são capazes de produzir uma ação de longo prazo no controle da dor dos pacientes devido ao seu efeito parácrino que reduz a dor e a inflamação articular, como demonstra os resultados do presente estudo, onde somente 2 (8%) dos animais não responderam ao tratamento, tal observação pode estar relacionada a presença de sobrepeso dos pacientes ou uma lesão de menisco associada, necessitando de uma nova abordagem. Ainda assim, uma segunda intervenção nesses casos é mais segura, uma vez que o animal não passou por procedimentos com potenciais riscos em nenhum momento do tratamento.

No presente estudo, os casos selecionados eram de animais que tiveram uma ruptura parcial do ligamento diagnosticada de maneira precoce, com os sinais clínicos aparecendo em no máximo 15 dias, com grau II de lesão do ligamento, onde o dano às fibras é moderado e a instabilidade ainda é minimamente perceptível durante o exame físico (MUIR, 2018). O uso das MSC pode ser benéfico nessa fase, especialmente devido à preocupação quanto a perpetuação das alterações inflamatórias no ligamento responsáveis pela progressão do quadro e da OA (CANAPP et al., 2016; LINON et al., 2014). As alterações no microambiente articular podem resultar em uma progressão da ruptura parcial do ligamento ao seu rompimento total. A sinovite é um fator importante reduz a resistência mecânica do ligamento devido à resposta imune celular e humoral, que por consequência, altera a matriz extracelular. As MSCs modulam a inflamação local e reduzem a sinovite presente na articulação instável (MUIR et al., 2016). Nenhuma ruptura total do ligamento foi reportada nos animais do presente estudo, esta observação pode ser justificada pela ação das MSCs, juntamente ao repouso do paciente, uma vez que sua ação parácrina modula a resposta inflamatória de células T e macrófagos, demonstrada pela redução dos níveis de produtos inflamatórios como a IL-6 e o IFN $\gamma$  presentes no líquido sinovial que Muir et al. (2016) descrevem em seu trabalho, enquanto o repouso reduz a carga imposta na articulação, evitando que a mesma seja sobrecarregada durante o período do tratamento.

Em seu estudo, Canapp et al. (2016) avaliaram a eficácia das MSC juntamente ao PRP, em proporção de 1:1 no tratamento da ruptura parcial do LCC, sendo confirmada via artroscopia. Dos 36 cães envolvidos no estudo, 29 apresentavam graus variáveis de claudicação previamente à aplicação das MSC. Ao todo, 11 resultados da avaliação objetiva de marcha dos pacientes após 90 dias da aplicação estavam disponíveis e demonstraram uma melhora estatisticamente significativa na qualidade da marcha, revelando que durante a reavaliação não havia diferença de função entre o membro afetado e o saudável. Os resultados do presente trabalho se assemelham aos encontrados pelos autores, visto que os nossos pacientes apresentaram uma diferença estatisticamente significativa na escala de claudicação 30 dias após a aplicação, demonstrando que o uso das MSC no tratamento de rupturas parciais do LCC pode influenciar a qualidade da marcha do animal de maneira positiva, através de seus mecanismos de ação que controlam a inflamação e reduzem a dor na articulação (MUIR et al., 2016; TARONI et al., 2017), entretanto, os resultados obtidos não puderam ser associados somente à ação das MSCs, uma vez que os animais reduziram sua carga de atividades durante o período avaliado, o que também pode auxiliar na redução da claudicação observada, visto que o período relativamente curto de tempo de acompanhamento coincide com a diminuição dos sinais que

os tutores observam em seus animais antes de levá-los ao atendimento médico (SCHULZ, 2015).

Outro benefício do uso das MSC é o efeito analgésico, especialmente em animais que possuem alguma comorbidade e não podem realizar o controle da dor com anti-inflamatórios. No presente trabalho, animais de diferentes tamanhos e raças foram tratados com MSC em estágios iniciais da lesão do LCC e obtiveram bons resultados com somente uma aplicação no controle da dor, semelhante ao que foi encontrado por Taroni et al. (2017), onde foi demonstrado que uma única aplicação de MSC na articulação obteve o mesmo efeito analgésico que AINEs utilizados de maneira contínua em cães que corrigiram a instabilidade articular via TPLO. Embora os AINEs sejam fundamentais no tratamento conservador da RLCC, sua utilização a longo prazo aumenta as chances de surgirem efeitos indesejados, sendo perda de apetite, úlceras gástricas, e diarreia os mais comuns, entretanto, lesões renais e coagulopatias também podem ocorrer (INNES; O'NEILL; LASCELLES, 2010; LAWSON; WALTON, 2019). Os únicos efeitos adversos ao tratamento com as MSCs observados no presente estudo foram uma piora transitória na função de membro e dor no local da aplicação, como relatado também por (CABON et al., 2019), a observação de tais efeitos possivelmente decorreu da expansão da cavidade articular, uma vez que após reduzir a quantidade do meio de aplicação utilizado os efeitos adversos desapareceram ou ao próprio processo de aplicação, uma vez que a membrana sinovial sofre uma micro injúria originada pelo processo e pode desencadear uma reação inflamatória local que piora a função do membro do animal transitoriamente.

Tais efeitos adversos conflitam com os resultados obtidos por outros autores, (CANAPP et al., 2016; TARONI et al., 2017) onde não foram observados efeitos adversos após a aplicação. O uso das MSC frente ao principal método de controle de dor em animais com RLCC tratados de maneira conservadora pode ser mais seguro, uma vez que os sinais desapareceram após alguns dias, não apresentando recidivas, especialmente para casos específicos de animais que já realizam o tratamento com AINEs de maneira contínua por um longo período ou que nem sequer podem fazer seu uso.

No presente estudo, as escalas de claudicação e dor não apresentavam uma correlação significativa em D0, tal observação pode ser associada a fatores diversos que sabidamente influenciam o quadro, como porte do animal, raça, conformação articular e a presença de sobrepeso (SCHULZ, 2015). Em D30 os parâmetros observados se obtiveram uma correlação significativa ( $P < 0.001$ ), sendo a variação originada pela ação das MSCs, uma vez que após a aplicação os valores das escalas reduziram significativamente, assim como foi observado por outros autores, onde uma única aplicação foi capaz de melhorar a avaliação da função do

membro do animal (CANAPP et al., 2016) e controlar a dor (TARONI et al., 2017). A aplicação das MSC possui outra vantagem no que diz respeito ao tratamento conservador da RLCC auxiliando na redução da progressão da OA. A eficácia das MSC no tratamento da OA em cães já foi avaliada por diversos autores, sendo consenso entre os estudos que uma dose de MSC pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes, reduzindo a dor e a claudicação após seu uso, e principalmente, desacelerando a progressão da OA. Ainda os autores demonstraram que o efeito das MSC pode ser observado tanto a médio (SHAH et al., 2018) quanto a longo prazo (CABON et al., 2019; KRISTON-PÁL et al., 2020), ressaltando que o uso das MSC atinge as premissas do tratamento conservador, apresentando poucos efeitos colaterais a curto prazo, sugerindo que pode ser benéfico em casos específicos de restrição financeira, uma vez que o custo para a aquisição das células na dosagem utilizada no estudo é de R\$ 1.000 reais, ou presença de comorbidades que impeçam a realização de uma intervenção cirúrgica, visto que tais fatores podem se somar quando opta-se por esse tipo de tratamento. O uso das MSCs em associação com outras formas de tratamento conservador, como fisioterapia e controle de peso possivelmente poderiam melhorar os resultados observados, uma vez que tais modalidades são comprovadamente eficazes no controle da dor e melhora da função do membro dos pacientes, potencializando a ação das células ao mesmo tempo que corrige eventuais desajustes posturais e reduzem a carga imposta à articulação.

## **6. Conclusão**

O uso das MSC no tratamento conservador da ruptura parcial do ligamento cruzado cranial pode ser benéfico em casos específicos, o presente estudo demonstrou que elas possuem a capacidade de melhorar a função do membro do animal, reduzindo o grau de claudicação, bem como controlam a dor de maneira eficaz com somente uma aplicação, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. O campo da terapia celular ainda precisa ser mais explorado, doses e protocolos devem ser definidos, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que sua utilização para lesões de ligamento atende as premissas do tratamento conservador.

## Referências bibliográficas

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Conceitos E Métodos Para Formação De Profissionais Em Laboratórios De Saúde**. [s.l.] Epsjv - Fiocruz, 2009. v. 2

BAOUCHE, M. et al. Mesenchymal Stem Cells: Generalities and Clinical Significance in Feline and Canine Medicine. **Animals**, v. 13, n. 12, p. 1903, 7 jun. 2023.

BERGH, M. S.; PEIRONE, B. Complications of tibial plateau levelling osteotomy in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 25, n. 05, p. 349–358, 2012.

BINVERSIE, E. E. et al. Canine ACL rupture: a spontaneous large animal model of human ACL rupture. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 23, n. 1, p. 116, dez. 2022.

BRIOSCHI, V.; ARTHURS, G. I. Cranial cruciate ligament rupture in small dogs (<15 kg): a narrative literature review. **Journal of Small Animal Practice**, v. 62, n. 12, p. 1037–1050, dez. 2021.

CABON, Q. et al. Long-Term Safety and Efficacy of Single or Repeated Intra-Articular Injection of Allogeneic Neonatal Mesenchymal Stromal Cells for Managing Pain and Lameness in Moderate to Severe Canine Osteoarthritis Without Anti-inflammatory Pharmacological Support: Pilot Clinical Study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 10, 5 fev. 2019.

CANAPP, S. O. et al. Partial Cranial Cruciate Ligament Tears Treated with Stem Cell and Platelet-Rich Plasma Combination Therapy in 36 Dogs: A Retrospective Study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, 14 dez. 2016.

CHAVAKIS, E.; URBICH, C.; DIMMELER, S. Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 45, n. 4, p. 514–522, out. 2008.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **The Lancet Neurology**, v. 1, n. 2, p. 92–100, jun. 2002.

COOK, J. L. et al. Multiple injections of leukoreduced platelet rich plasma reduce pain and functional impairment in a canine model of ACL and meniscal deficiency. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 34, n. 4, p. 607–615, abr. 2016.

COSTA, M. et al. Major complications of tibial tuberosity advancement in 1613 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 46, n. 4, p. 494–500, maio 2017.

CUI, X.; PU, L. L. Q. The Search for a Useful Method for the Optimal Cryopreservation of Adipose Aspirates: Part I. In Vitro Study. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 29, n. 3, p. 248–252, maio 2009.

DE FRANCESCO, F. et al. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 6, p. 572–584, dez. 2015.

DE ROSA, A. et al. A New Method for Cryopreserving Adipose-Derived Stem Cells: An Attractive and Suitable Large-Scale and Long-Term Cell Banking Technology. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 4, p. 659–667, dez. 2009.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

ENOMOTO, M. et al. Prevalence of radiographic appendicular osteoarthritis and associated clinical signs in young dogs. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 2827, 3 fev. 2024.

FALCÃO, M. S. A. et al. Effect of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) on corneal wound healing in dogs. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 10, n. 5, p. 440–445, set. 2020.

FILARDO, G. et al. Stem cells in articular cartilage regeneration. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 11, n. 1, p. 42, dez. 2016.

GILBERT, S. et al. Stifle joint osteoarthritis at the time of diagnosis of cranial cruciate ligament injury is higher in Boxers and in dogs weighing more than 35 kilograms. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 60, n. 3, p. 280–288, maio 2019.

GRANGE et al. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Kidney Regeneration. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1240, 11 out. 2019.

HART, J. L. et al. Comparison of owner satisfaction between stifle joint orthoses and tibial plateau leveling osteotomy for the management of cranial cruciate ligament disease in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 249, n. 4, p. 391–398, 15 ago. 2016.

ICHINOHE, T. et al. Degenerative changes of the cranial cruciate ligament harvested from dogs with cranial cruciate ligament rupture. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 7, p. 761–770, 2015.

INNES, J.; O'NEILL, T.; LASCELLES, D. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of canine osteoarthritis. **In Practice**, v. 32, n. 4, p. 126–137, abr. 2010.

IVANOVSKA, A. et al. Manufacturing Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Canine Patients: Challenges and Recommendations. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 897150, 10 jun. 2022.

KANG, B.-J. et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, p. 299, 2012.

KRISTON-PÁL, É. et al. A Regenerative Approach to Canine Osteoarthritis Using Allogeneic, Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Safety Results of a Long-Term Follow-Up. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 510, 13 ago. 2020.

KWANANOCHA, I. et al. Short-term outcomes of cranial cruciate ligament rupture treated surgically with tibial plateau leveling osteotomy or non-surgically in small-breed dogs weighing less than 10 kg. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 86, n. 4, p. 428–435, 2024.

LAWSON, A.; WALTON, B. Monitoring side effects of long-term NSAID use in dogs with chronic osteoarthritis. **In Practice**, v. 41, n. 4, p. 148–154, maio 2019.

LINON, E. et al. Engraftment of autologous bone marrow cells into the injured cranial cruciate ligament in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 448–454, dez. 2014.

MATTHEWS, N. S. et al. Factors associated with anesthetic-related death in dogs and cats in primary care veterinary hospitals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 250, n. 6, p. 655–665, 15 mar. 2017.

MILLE, M. A.; MCCLEMENT, J.; LAUER, S. Physiotherapeutic Strategies and Their Current Evidence for Canine Osteoarthritis. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 1, p. 2, 21 dez. 2022.

MONTEIRO, B. P. et al. 2022 WSAVA guidelines for the recognition, assessment and treatment of pain. **Journal of Small Animal Practice**, v. 64, n. 4, p. 177–254, abr. 2023.

MUIR, P. et al. Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Molecular Markers of Inflammation in Dogs with Cruciate Ligament Rupture. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0159095, 30 ago. 2016.

MUIR, P. **Advances in the canine cranial cruciate ligament**. 2nd ed ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2018.

PACCHIANA, P. D. et al. Surgical and postoperative complications associated with tibial plateau leveling osteotomy in dogs with cranial cruciate ligament rupture: 397 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 2, p. 184–193, 1 jan. 2003.

PARK, K.-H. et al. Treatment of Collagen-Induced Arthritis Using Immune Modulatory Properties of Human Mesenchymal Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 6, p. 1057–1072, jun. 2016.

PARK, C. et al. Characterization of spatiotemporal and kinetic gait variables in dogs with hindlimb ataxia and bilateral hindlimb lameness. **BMC Veterinary Research**, v. 20, n. 1, p. 405, 11 set. 2024.

PEGRAM, C. et al. Risk factors for unilateral cranial cruciate ligament rupture diagnosis and for clinical management in dogs under primary veterinary care in the UK. **The Veterinary Journal**, v. 292, p. 105952, fev. 2023.

RAMOS, F. et al. Canine atopic dermatitis attenuated by mesenchymal stem cells. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 7, n. 3, p. 554, 2020.

RAULINAITÈ, K. et al. The Single Intra-Articular Injection of Platelet-Rich Plasma vs. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs as Treatment Options for Canine Cruciate Ligament Rupture and Patellar Luxation. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 9, p. 555, 4 set. 2023.

RIVAS, I. L. et al. Stromal cell therapy in cats with feline chronic gingivostomatitis: current perspectives and future direction. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 25, n. 8, p. 1098612X231185395, ago. 2023.

ROMAGNOLI, C. Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 144, 2014.

SHAH, K. et al. Outcome of Allogeneic Adult Stem Cell Therapy in Dogs Suffering from Osteoarthritis and Other Joint Defects. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 1–7, 28 jun. 2018.

SCHULZ, K. S. Afecções Articulares. *In*: FOSSUM, Teresa Welch (ed.). **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4. ed. Rio de Janeiro – RJ: Elsevier Editora Ltda., 2015. p. 3780-3837. ISBN 978-85-352-6991-8.

SPINELLA, G.; ARCAMONE, G.; VALENTINI, S. Cranial Cruciate Ligament Rupture in Dogs: Review on Biomechanics, Etiopathogenetic Factors and Rehabilitation. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 9, p. 186, 6 set. 2021.

TARONI, M. et al. Evaluation of the Effect of a Single Intra-articular Injection of Allogeneic Neonatal Mesenchymal Stromal Cells Compared to Oral Non-Steroidal Anti-inflammatory Treatment on the Postoperative Musculoskeletal Status and Gait of Dogs over a 6-Month Period after Tibial Plateau Leveling Osteotomy: A Pilot Study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 83, 8 jun. 2017.

VILLATORO, A. J. et al. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

WOLF, R. E. et al. Surgical and postoperative complications associated with tibial tuberosity advancement for cranial cruciate ligament rupture in dogs: 458 cases (2007–2009). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 12, p. 1481–1487, 15 jun. 2012.

WUCHERER, K. L. et al. Short-term and long-term outcomes for overweight dogs with cranial cruciate ligament rupture treated surgically or nonsurgically. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 10, p. 1364–1372, 15 maio 2013.

YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, p. 173090, jun. 2020.