

CYNTHIA DO PRADO VENDRUSCOLO

Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos com osteocondrite dissecante

São Paulo

2021

CYNTHIA DO PRADO VENDRUSCOLO

Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos com osteocondrite dissecante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4078
FMVZ

Vendruscolo, Cynthia do Prado

Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos com osteocondrite dissecante / Cynthia do Prado Vendruscolo. – 2021.

97 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profª. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Líquido sinovial. 2. Interleucina. 3. Ultrassonografia. 4. Escore facial de dor. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

BIOÉTICA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos com osteocondrite dissecante", protocolada sob o CEUA nº 5661280717, sob a responsabilidade de **Raquel Yvone Arantes Baccarin** e equipe: Cynthia do Prado Vendruscolo - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 28/02/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effects of medicinal ozone on synovial joints of horses with osteochondritis dissecans", utilizing 20 Equines (males and females), protocol number CEUA 5661280717, under the responsibility of **Raquel Yvone Arantes Baccarin** and team: Cynthia do Prado Vendruscolo - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/28/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 10/2017 a 06/2020

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

Idade: **1 a 5 anos**

N: **20**

Linhagem: **Diversas**

Peso: **300 a 600 kg**

Local do experimento: **Hospital Veterinário**

São Paulo, 01 de julho de 2019

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Autor: VENDRUSCOLO, Cynthia do Prado

Título: Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos com osteocondrite dissecante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Leiva e Hilário, por me darem a vida, educação, oportunidade, apoio e força para lutar por meus objetivos e sonhos, servindo de exemplo sempre e demonstrando que nada é impossível,

Aos meus amigos e familiares, por me ampararem em todos os momentos, tornando a caminhada mais leve.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida por todas as bênçãos recebidas nesse período.

Aos meus pais, Leiva e Hilário, meus exemplos de vida me apoiando sempre para que conseguisse alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos e professores Carla B. Belli, Wilson R. Fernandes, Luís Claudio Lopes Correa da Silva, André L.V. de Zoppa, Rodrigo Romero Correa e Cristina O. Massoco Salles Gomes pelos inúmeros ensinamentos.

Às minhas duas casas de coração FMVZ-Unesp Botucatu e FMVZ-USP, por toda a base profissionais e pessoal e por me apresentar pessoas mais que especiais.

À minha orientadora Raquel Yvonne Arantes Baccarin, que me acolheu como orientada desde a residência, estando sempre presente para auxiliar no projeto, nas dúvidas e discussões, tanto relacionadas a parte científica, profissional e pessoal.

À minha primeira orientadora Ana Liz Garcia Alves, que me acolheu na graduação, me auxiliando nos primeiros passos da jornada científica.

Aos meus companheiros e irmãos de pós-graduação, Juliana, Joice, Sarah, Fernanda, Eric, Ana Lúcia, Marília, Núbia, Paula, Henrique e Fernando que me ajudaram durante essa árdua jornada científica, nas inúmeras coletas, análises, confecção e depósito da tese, e claro nos momentos de descontração e risadas.

Aos meus colegas e amigos da FMVZ-USP e de fora dela também pelo auxílio durante a realização do projeto, troca de experiências, pelas risadas e bons momentos, deixando o fardo muito mais leve e a experiência inesquecível.

Aos enfermeiros e tratadores Marquinhos, Cícero, Rosendo, Gervásio e Felipe por toda ajuda, companheirismo e amizade nesses 9 anos de USP.

À equipe de residentes que me auxiliou nas inúmeras administrações de tramadol a noite e de madrugada, além da amizade, trocas de experiência e as boas risadas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado processo nº 2015/04006-9 e doutorado nº2017/15834-5.

Ao professor Paulo César Ciarlini e sua orientada Taiana Valadares da Unesp Campus Araçatuba por realizarem as análises de estresse oxidativo.

Aos cavalos, criaturas apaixonantes, razão de tanta dedicação a projetos de pesquisa para melhorar tratamentos de diversas afecções, e que involuntariamente auxiliaram na realização do projeto.

Gratidão a todos de que alguma forma contribuíram para que essa tese e o crescimento pessoal e profissional ao longo destes anos acontecesse.

EPÍGRAFE

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

VENDRUSCOLO, C. P. **Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos com osteocondrite dissecante.** [Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effect of medicinal ozone on synovial joints of horses with osteochondritis dissecans]. 2021. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O Ozônio (O_3) é um gás solúvel altamente oxidante. Vários estudos e experimentos clínicos têm demonstrado que a ozonioterapia possui efeitos positivos como redução da dor e inflamação, melhora na função e efeitos benéficos no trofismo de ossos e cartilagem, aumentando vascularização e reparo cartilágneo e do osso subcondral. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito anti-inflamatório e de modulação do estresse oxidativo do O_3 no pós-operatório de artroscopia para casos de osteocondrite dissecante (OCD), por meio das concentrações de interleucinas (1, 4, 6, 10 e $TNF-\alpha$), substância P, prostaglandina E_2 (PGE_2), capacidade anti-oxidante total (TAC), capacidade oxidante total (TOC), malonaldeído (MAD), proteína, uréia, condroitim sulfato (CS), ácido hialurônico (AH), peso molecular do AH (PMAH), além de contagem celular total (WBC) e diferencial, avaliação de *burst* oxidativo, exame físico, ultrassonográfico, da membrana sinovial e de claudicação. Para isso 31 articulações com OCD foram selecionadas, formando dois grupos: o grupo tratado (GT) recebeu 5 minutos de lavagem com $20\mu g/ml$ de O_3 após a cirurgia e, 48h depois, 5ml de O_3 e 2ml de AH. O controle (GC) recebeu lavagem com gás carbônico e depois de 48h 2 ml de AH. Imediatamente antes do início da artroscopia e do tratamento às 48 horas o líquido sinovial foi coletado; as avaliações físicas foram diárias até o final do experimento e as ultrassonográficas foram realizadas antes (M0h), 48 (M48h) e 96h (M96h) após o procedimento cirúrgico. As membranas sinoviais foram coletadas no momento que se estabeleceram os portais (M0), ao final do procedimento cirúrgico (M1), e ao final da lavagem articular (M2). Às 48 horas houve aumento em ambos os grupos nas concentrações de IL-1, 4, 6, 10, substância P, TAC, TOC, MAD, CS, proteína, WBC e no índice de ativação de monócitos e neutrófilos, não sendo estatisticamente significante a diferença entre os momentos apenas do MAD e havendo diferença de IL-6 entre os grupos ($p<0,05$). Observou-se também que a concentração de PGE_2 diminuiu no GT e aumentou significativamente no GC, e a concentração de $TNF-\alpha$ aumentou significativamente no GT. O PMAH e as concentrações de AH e uréia diminuíram, porém sem significância estatística entre os grupos, apenas entre os momentos no PMAH. O escore ultrassonográfico diminuiu, sendo significativamente estatístico ($p<0,05$) entre o M0h e M48h e 96h em ambos os grupos, e com diferença entre os grupos no item vascularização e sinovite.

No exame físico houve diferença significativa entre os grupos na frequência respiratória e no escore facial de dor ($p < 0,05$). O tratamento foi capaz de controlar parcialmente o processo inflamatório, com diminuição na concentração de marcadores inflamatórios como a PGE_2 , cuja concentração diminuiu, e na IL-6, cuja concentração aumentou em menor escala no GT. Esperava-se também aumento nas concentrações de interleucinas anti-inflamatórias, contudo o aumento mais acentuado em IL-10, não foi estatisticamente significativo. Quanto ao catabolismo da matriz extracelular as concentrações de CS foram menores no GT assim como a diminuição do PMAH, embora ambas também não diferiram significativamente do GC. O escore facial de dor e a frequência respiratória foram menores no GT, demonstrando potencial efeito analgésico e anti-inflamatório. Na avaliação ultrassonográfica o item vascularização e sinovite diferiu significativamente entre os grupos, sendo menor no GT. A utilização do ozônio medicinal ao final do procedimento artroscópico em casos de osteocondrite dissecante mostrou efeito anti-inflamatório e analgésico, diminuindo a concentração de marcadores inflamatórios e de catabolismo cartilágneo. Além disso, proporcionou melhores escores na avaliação física dos cavalos, auxiliando no período pós-operatório.

Palavras-chave: Líquido sinovial. Interleucina. Ultrassonografia. Escore facial de dor. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

VENDRUSCOLO, C. P. **Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effect of medicinal ozone on synovial joints of horses with osteochondritis dissecans.** [Avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos com osteocondrite dissecante]. 2021. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Ozone (O₃) is a highly oxidizing soluble gas. Several studies and clinical experiments have shown that ozone therapy has positive effects such as reducing pain and inflammation, improving function and benefiting bone and cartilage trophism, increasing vascularization and repair of cartilage and subchondral bone. The objective of the present study was to verify the anti-inflammatory and the oxidative stress modulation effects of O₃ in the postoperative period of osteochondritis dissecans (OCD) cases that went through arthroscopic surgery. The concentrations of interleukins (1, 4, 6, 10 and TNF- α), substance P, prostaglandin E₂ (PGE₂), total antioxidant capacity (TAC), total oxidizing capacity (TOC), malonaldehyde (MAD), protein, urea, chondroitin sulfate (CS), hyaluronic acid (HA) and molecular weight of AH (MHHA) were measured as well as the total and differential cell count (WBC). In addition, evaluation of oxidative burst and physical, ultrasonographic, synovial membrane and lameness examinations were performed. Thirty-one joints with OCD were selected and allocated in two groups: the treated group (TG) received 5 minutes of gas lavage with 20 μ g / ml of O₃ after surgery and, 48h later, 5ml of O₃ followed by 2ml of HA. The control (CG) was submitted to lavage with carbon dioxide and after 48h, 2 ml of HA. Synovial fluid was collected immediately before the initiation of arthroscopic procedure, and the treatment at 48 hours; the physical evaluations were performed on a daily basis until the end of the experiment and the ultrasound scans were taken before (M0h), 48 (M48h) and 96h (M96h) after the surgical procedure. Samples of synovial membranes were collected when portals were established (M0), at the end of surgical procedure (M1), and at the end of the joint lavage (M2). Results shown that at 48 hours, there was an increase, in both groups, in the concentrations of IL-1, 4, 6, 10, substance P, TAC, TOC, MAD, CS, protein, WBC and in the monocyte and neutrophil activation index, with no statistically significance only between the moments of MAD and with a difference of IL-6 between the groups (p <0.05). It was also observed that the concentration of PGE₂ decreased in the TG and increased significantly in the CG, and the concentration of TNF- α increased significantly in the TG. The MHHA and the concentrations of HA and urea decreased, but with no statistical significance between groups, only between the moments in the MHHA. The ultrasound scores decreased, being statistical significantly (p <0.05) between M0h and

M48h and 96h in both groups, with difference between groups in the scores of vascularization and synovitis. On physical examination, there was a significant difference between the groups in respiratory rate and facial pain score ($p < 0.05$). The treatment was able to partially control the inflammatory process, with a decrease in concentrations of inflammatory markers such as PGE₂, whose concentration decreased, and in IL-6, whose concentration increased to a lesser extent in the TG. An increase in the concentrations of anti-inflammatory interleukins was also expected, however the most pronounced increase in IL-10 was not statistically significant. As for the catabolism of the extracellular matrix, the CS concentrations were lower in the TG as well as the decrease in the MHHA, although both also did not differ significantly from the CG. The facial pain score and respiratory rate were lower in the TG, demonstrating potential analgesic and anti-inflammatory effects. In the ultrasonographic evaluation, scores for vascularization and synovitis differed significantly between the groups, being smaller in the TG. The use of medicinal ozone at the end of the arthroscopic procedure in cases of osteochondritis dissecans showed anti-inflammatory and analgesic effects, decreasing the concentrations of inflammatory markers and cartilage catabolism. In addition, it provided better scores in the physical evaluation of the horses, aiding in the postoperative period.

Keywords: Synovial fluid. Interleukin. Ultrasonography. Facial pain score. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura ilustrando as várias camadas da cartilagem hialina. Traduzida de Baxter (2011).	23
Figura 2 - Imagens radiográficas das articulações tibiotársica (A) e metacarpo/tarsofalangeana (B,C) exemplificando os locais mais comuns de apresentação da OCD. São Paulo, 2021.....	28
Figura 3 - Resumo dos principais efeitos biológicos durante a exposição do sangue à mistura O ₃ /O ₂ , ex vivo, e depois da sua administração ao paciente (traduzido de BOCCI, 2006b)....	31
Figura 4 - Momento da coleta de líquido sinovial após artroscopia (A) seguida de aplicação de ácido hialurônico (B) de animal do grupo controle. São Paulo, 2021.....	43
Figura 5 - Lavagem articular com gás ozônio através de instilação do gás saindo diretamente do gerador (A). Imagem focalizando a articulação com a entrada do gás através da cânula de artroscopia e saída formando as bolhas (B). São Paulo, 2021.....	44
Figura 6 - Infiltração com gás ozônio no momento 48 horas, após coleta e antes da aplicação de ácido hialurônico no grupo tratado. São Paulo, 2021.....	44
Figura 7 - Escala facial de dor (EFD) Grimace com imagens e explicação para cada uma das 6 unidades de ação facial. Cada unidade é avaliada quanto a ausência (score 0), moderadamente presente (1) e obviamente presente (2). Traduzido de Dalla Costa et al. (2014).	45
Figura 8 - Animal sendo avaliado com auxílio do equipamento Lameness Locator com sensores posicionados na cabeça, pelve e membro torácico direito (destacados nos círculos vermelhos) conectados ao <i>tablet</i> para conversão e interpretação das informações. São Paulo, 2021.....	46
Figura 9 - Quantidade de animais apresentando os escores de 0 a 5 nos momentos 0h a 96h.	56
Figura 10 - Imagem ultrassonográfica do doppler realizadas no recesso palmar proximal de um animal do grupo tratado nos momentos 0h (A), 48h (B) e 96h (C) e no grupo controle nos momentos 0h (D), 48h (E) e 96h (F), demonstrando a diferença no sinal de doppler entre os grupos. Proximal a esquerda e distal a direita. São Paulo, 2021.	59
Figura 11 - Figura histológica corada em HE demonstrando a inflamação na membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2, GT acima e GC abaixo. Seta preta marcando células inflamatórias na membrana sinovial.....	78
Figura 12 - Figura histológica corada em HE demonstrando o aumento da vascularização na membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2, GT acima e GC abaixo. Seta preta marcando vasos na membrana sinovial.....	79

Figura 13 - Figura histológica corada em HE demonstrando o aumento no número de sinoviócitos da camada íntima da membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2, GT acima e GC abaixo. Seta preta marcando as camadas de sinoviócitos na membrana sinovial. 79

Figura 14 - Figura histológica corada em HE demonstrando o aumento do edema na membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2, GT acima e GC abaixo. Seta preta marcando áreas de edema na membrana sinovial, representadas pelo aumento de espaço entre as fibras e células no tecido. 80

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -. Indicações gerais da ozonioterapia (modificado de CAKIR, 2014).....	32
Tabela 2 - Injeção intra-articular – conceitos de tratamento (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012).....	37
Tabela 3 - Descrição dos critérios e pontuações utilizados para avaliação ultrassonográfica.	48
Tabela 4 - Sistema de graduação microscópica para membrana sinovial, com descrição dos itens e graus. Traduzido de McIlwraith et al. (2010).....	51
Tabela 5 . Articulações acometidas por OCD dos grupos tratado e controle.	54
Tabela 6 - Média e desvio padrão dos valores de FC nos grupos tratado e controle nos momentos 0 a 96h.....	55
Tabela 7 - Média e desvio padrão dos valores de FR nos grupos tratado e controle nos momentos 0 a 96h.....	55
Tabela 8 - Média e desvio padrão do EFD nos grupos tratado e controle nos momentos 0 a 96h.	56
Tabela 9 - Quantidade de animais apresentando escores de 0 a 5 nos momentos 0 a 96horas.	56
Tabela 10 - Altura máxima ou mínima da pelve (mm) para claudicações de membro pélvico ou vetor somatório da altura máxima e mínima da cabeça (mm) para claudicações do membro torácico dos animais do GT e GC no momento 0, média e desvio padrão, e também a quantidade de animais apresentando claudicação segundo o software.	57
Tabela 11 - Médias e desvio padrão dos aspectos analisados na ultrassonografia do GT nos diferentes momentos.....	58
Tabela 12 - Médias e desvio padrão dos aspectos analisados na ultrassonografia do GC nos diferentes momentos.....	58
Tabela 13 . Concentração de IL-1 (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle nos momentos 0 e 48h.	60
Tabela 14 . Concentração de IL-6 (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle nos momentos 0 e 48h.	61
Tabela 15 . Concentração de IL-4 (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	62
Tabela 16 . Concentração de IL-10 (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	63

Tabela 17. Concentração de TNF- α (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	64
Tabela 18. Concentração de PGE ₂ (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.	65
Tabela 19 - Concentração de substância P (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	66
Tabela 20. Concentração de CS (μ g/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	67
Tabela 21. Concentração de AH (μ g/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	68
Tabela 22 – Peso molecular do AH (KDa) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	69
Tabela 23. Contagem celular (cél/ μ l) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	70
Tabela 24 - Porcentagem de polimorfonucleares no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	71
Tabela 25- Concentração de proteína (g/dl) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	72
Tabela 26- Concentração de uréia (mg/dl) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.	73
Tabela 27- Capacidade antioxidante total (μ mol/l) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.	74
Tabela 28 – Capacidade oxidante total (μ mol/L) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.	74
Tabela 29 – Concentração de malonaldeído (μ mol/L) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.	75
Tabela 30 – Índice de ativação dos monócitos no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.	76
Tabela 31- Índice de ativação dos neutrófilos no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.	76
Tabela 32 - Média e desvio padrão da avaliação histológica da membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2 no GT.	77
Tabela 33 - Média e desvio padrão da avaliação histológica da membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2 no GC.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AH	Ácido Hialurônico
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
Cetavlon	Brometo de cetiltrimetilamônio
CO	Monóxido de carbono
CS	Condroitim sulfato
Da	Dalton
DCFH	Dicloro-diidro-fluoresceína-acetato
dl	Decilitro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFD	Escore facial de dor
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
g	Gramma
GAG	Glicosaminoglicano
GSH	Glutationa sintetase
GSR	Glutationa redutase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HO-1	Heme-oxigenase-1
IA	Intra-articular
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1β
IL-1Ra	Antagonista de receptor de interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IV	Intravenosa
kDa	Quilodalton
Keap-1	Preoteína kelch 1 associada a ECH
LOP	Produtos de lipoperoxidação
LS	Líquido sinovial
M	Molar
MAD	Malonaldeído

MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinase
ng	Nanograma
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
NF- κ B	Fator nuclear κ B
Nrf2	Fator nuclear eritróide-2 – relativo ao fator 2
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
OA	Osteoartrite
ON	Óxido nítrico
OSP	Proteína oxidativa de choque
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDA	1,3-diaminopropano-acetato
pg	Picograma
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Proteoglicanos
pH	Potencial de hidrogênio
PLD	Fosfolipase D
PKC	Proteína kinase C
PMA	phorbolmiristato acetato
PRP	Plasma rico em plaquetas
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RP	Reeducação postural
SOD	Superóxido desmutase
TAC	Capacidade antioxidante total
TGF- β	Fator de crescimento transformante β
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TOC	Capacidade oxidante total
TPC	Tempo de preenchimento capilar
VAS	Escala visual análoga

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1.	<i>ARTICULAÇÃO SINOVIAL</i>	22
2.2.	OSTEOCONDRITE DISSECANTE.....	24
2.2.1	Sinais clínicos da OCD.....	25
2.2.2	Diagnóstico da OCD.....	26
2.2.3	Tratamento da OCD.....	28
2.3.	<i>OZONIOTERAPIA</i>	29
2.3.1	Ozonioterapia na Medicina Veterinária.....	33
2.3.2	Ozonioterapia intra-articular.....	36
3.	JUSTIFICATIVA.....	40
4.	OBJETIVOS.....	41
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1.	ANIMAIS	42
5.2.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
5.3.	AVALIAÇÃO FÍSICA.....	45
5.4.	AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	47
5.5.	ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	49
5.6.	ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	49
5.7.	ANÁLISE DA MEMBRANA SINOVIAL.....	50
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
7.	RESULTADOS	54
7.1.	AVALIAÇÃO FÍSICA.....	55
7.2.	AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	57
7.3.	ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	60
7.4.	ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	73
7.5.	ANÁLISE DA MEMBRANA SINOVIAL.....	77

8. DISCUSSÃO	81
9. CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

A osteocondrite dissecante (OCD) é considerada uma falha ou ruptura na ossificação endocondral nas extremidades do osso em crescimento. Esta por sua vez pode seguir dois caminhos, produzir uma área de cartilagem hipertrofiada que se fragmenta da sua porção progenitora, geralmente na superfície articular, ou gerar uma porção de cartilagem no final do osso amadurecido que resulta em estrutura semelhante a cisto.

Nos equinos as articulações mais acometidas são a tibiotársica e metacarpo e/ou metatarsofalangeanas. Os sinais clínicos de efusão e claudicação podem surgir antes do primeiro ano de vida do animal, alguns na fase inicial de treinamento e outros permanecem assintomáticos por toda vida. São amplas as variedades de tratamento da OCD, como repouso, exercício controlado, terapia intra-articular e artroscopia, sendo esta última o tratamento de eleição atualmente, com bons resultados, mesmo em animais assintomáticos.

Na Medicina Veterinária, há busca incessante de formas complementares de tratamento economicamente viáveis e eficientes. A ozonioterapia é um exemplo, e já vem sendo amplamente utilizada na Medicina na Europa, na Ásia e em Cuba. Atualmente, tem despertado o interesse da Medicina Veterinária como alternativa ou complemento dos protocolos terapêuticos tradicionais pela sua eficiência e baixo custo. Ainda é escassa a literatura científica a respeito dos efeitos da ozonioterapia sobre variáveis bioquímicas na espécie equina, principalmente quando utilizada por via intra-articular. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar o comportamento clínico, ultrassonográfico e de biomarcadores articulares de equinos acometidos por OCD e tratados por artroscopia, associando a terapia intra-articular com gás ozônio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ARTICULAÇÃO SINOVIAL

Na articulação saudável, a cartilagem apresenta-se leitosa e opaca nas regiões mais espessas e com coloração azulada nas regiões mais finas, sendo formada essencialmente pela cartilagem hialina. Este tecido é constituído de moléculas de proteoglicanos, principalmente agregam, conferindo resistência à compressão, de colágeno, resistência à tensão, e de um fluido com livre movimentação carregando íons móveis, o líquido sinovial (LS) (BAXTER, 2011). Existem variações na espessura, densidade celular, composição da matriz e propriedades mecânicas dentro da mesma articulação, entre articulações e entre espécies, entretanto, todas articulações sinoviais consistem dos mesmos componentes, mesma estrutura geral e possui as mesmas funções (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a).

A cartilagem articular é dividida em quatro camadas:

1. Camada tangencial ou superficial – é formada por condrócitos achatados ou ovóides e fibras colágenas orientadas tangencialmente, formando uma barreira ao sistema imune. Uma vez lesada, haverá alteração das propriedades mecânicas e estruturais e estímulo para resposta imune inflamatória (BUCKWALTER; MANKIN, 1997b).
2. Camada intermediária ou de transição – contém condrócitos largos que podem ser únicos ou pareados e fibras colágenas orientadas de forma aleatória.
3. Camada radiada ou profunda – nesta camada os condrócitos estão arranjados em colunas verticais separadas por fibras colágenas organizadas radialmente.
4. Camada calcificada – composta por cartilagem mineralizada e condrócitos em vários estágios de degeneração.

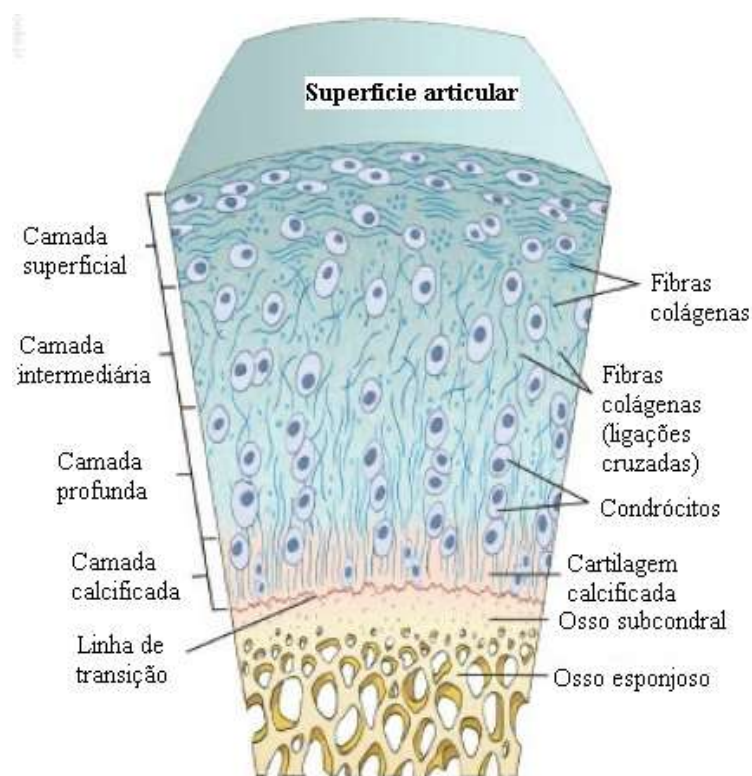


Figura 1- Figura ilustrando as várias camadas da cartilagem hialina. Traduzida de Baxter (2011).

A célula presente na cartilagem é o condrócito, esta por sua vez é arredondada e pode apresentar diferentes formas, tamanhos e, provavelmente, funções nas camadas cartilaginosas. Para manter a homeostase tecidual ele detecta alterações na composição da matriz, através da interação com fragmentos provenientes da degradação dos componentes, e responde com a síntese de macromoléculas, de tipos e em quantidades apropriadas (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a). Outro mecanismo que interfere na atividade do condrócito é a intensidade de carga sobre a articulação, que por sua vez provoca a deformação da matriz produzindo sinais mecânicos, elétricos e fisioquímicos, gerando estímulo celular (BUCKWALTER; LANE, 1996). A movimentação articular com carga equilibrada é necessária para nutrição, excreção de resíduos e estimulação dos condrócitos, mantendo a homeostasia e diminuindo a probabilidade de lesões (BUCKWALTER, 1995).

A matriz extracelular (MEC) é um complexo de colágenos, fibrilas, proteoglicanos (PG) amorfo, glicoproteínas e água que dão suporte aos condrócitos (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a). Os tipos de colágenos presentes na MEC são II, VI, IX, X e XI, sendo o principal o tipo II, com 90 a 95% do total. A organização das fibrilas em uma malha densa que se estende pelo tecido resulta em rigidez a tração e resistência da cartilagem articular, contribuindo com a coesão através da ligação mecânica com os grandes PGs. Os colágenos tipo II, IX e XI são os principais responsáveis pelas ligações cruzadas que conferem resistência. Já o tipo VI parece

cercar os condrócitos, sendo importante na adesão destes à matriz (MARCELINO; MCDEVITT, 1995).

Os PGs consistem de um núcleo de proteína ao qual estão covalentemente ligados uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) (POOLE et al., 1996), ocupando os espaços entre as fibrilas colágenas, conferindo maior resistência a compressão (BAXTER, 2011). Os principais GAGs encontrados na cartilagem são o ácido hialurônico (AH), condroitim sulfato (CS), keratam sulfato e dermatam sulfato (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a). A cartilagem articular contém duas classes principais de PGs: os grandes agregados de monômeros de PGs ou agregam, e os pequenos PGs, incluindo a decorim, biglicam e fibromodulim (POOLE et al., 1996), os quais se ligam a macromoléculas da matriz auxiliando na sua estabilização (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a). Os PGs conferem carga negativa a MEC, resultando em resistência físico-química e também afetando a permeabilidade da cartilagem (BAXTER, 2011).

Ainda constituindo a MEC temos as glicoproteínas, proteínas de ligação como a condronectina e fibronectina, que participam da adesão, respectivamente, de condrócitos à superfície do colágeno tipo II e das células a moléculas, superfícies, e por fim a proteína oligomérica de matriz cartilaginosa (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a).

A cartilagem não possui vasos e nervos, sendo que sua nutrição ocorre através da difusão de nutrientes provenientes do LS. A pressão intermitente exercida na cartilagem durante o movimento da articulação é necessária para que o líquido flua através da cartilagem, levando nutrientes para a célula e eliminando seus detritos (BAXTER, 2011).

Para que ocorra o movimento articular em harmonia, todos os componentes da cartilagem interagem, proporcionando as características mecânicas e físicas de: 1) uma matriz permeável e resistente à compressão, 2) uma rede fibrosa capaz de sustentar forças elevadas de pressão, 3) um líquido que flui quando sob pressão ou deformação e que ajuda na dissipação do estresse elevado no tecido e 4) uma pressão pelo inchaço que resulta em matriz inchada com água (BAXTER, 2011).

2.2. OSTEOCONDRITE DISSECANTE

A osteocondrose tem sido caracterizada como diferenciação anormal celular do condrócito e a formação de defeitos na MEC de crescimento das articulações dos potros (SPEIRS; ANDERSON; BOURKE, 1986; THOMASSIAN, 2005; VAN WEEREN, 2006). A

lesão primária da osteocondrose ocorre durante a fase de diferenciação e maturação do processo de ossificação (JEFFCOTT, 1991), alterando o processo que ocorre na zona hipertrófica da cartilagem, impedindo a mineralização e a invasão dos vasos sanguíneos na matriz cartilaginosa (DOUGLAS, 1992), com consequente nutrição inadequada para a função e desenvolvimento dos condrócitos (CARLSON; HILLEY; MEUTEN, 1989).

O fator de crescimento transformante (TGF)- β aparece como fator importante na hipertrofia e diferenciação dos condrócitos e sua expressão é diminuída nos locais de lesão (DOUGLAS, 2010). Essas disfunções celulares, da MEC e/ou da vascularização podem gerar retardo de crescimento da cartilagem, interrompendo a ossificação (SPEIRS; ANDERSON; BOURKE, 1986; VAN WEEREN, 2006), produzindo cartilagem espessa e junção osteocondral irregular, além de desarranjo nas colunas de condrócitos e necrose da camada basal (STRÖMBERG; REJNÖ, 1978; DOUGLAS, 1992; YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007). Esta área quando exposta à força biomecânica irregular e excessiva em um ponto, aliada a condições de deficiência na reparação, levam à fragilidade da MEC (HURTING; POOL, 1996), podendo resultar na separação da cartilagem em “flaps” ou fragmentos de cartilagem livres, com exposição do osso subcondral (THOMASSIAN, 2005; VAN WEEREN, 2006).

Os fragmentos cartilaginosos podem ser reabsorvidos, incorporados pela cápsula articular ou permanecer na articulação na forma de fragmento osteocondral, denominando a doença como OCD (MCILWRAITH; NIXON, 1996; THOMASSIAN, 2005). Alternativamente, a cartilagem espessada invagina com consequente reabsorção e formação de cisto subcondral (DOUGLAS, 1992; VAN WEEREN, 2006). O fator determinante para a forma de evolução da doença não está definido, entretanto, a localização anatômica parece ser fundamental, já que as lesões de OCD aparecem em regiões periféricas com força de atrito e os cistos osteocondrais em áreas centrais com forças compressivas (THOMASSIAN, 2005; VAN WEEREN, 2006).

2.2.1 Sinais clínicos da OCD

Nem todas as lesões apresentam sinais clínicos (FORTIER; NIXON, 2005). A exposição do osso subcondral à cavidade articular e a presença de fragmentos condrais ou osteocondrais livres na articulação atuam como fatores irritantes gerando efusão articular, dor e claudicação em graus variados (DOUGLAS, 1992; BRINK; DOLVIK; TVERDAL, 2009). A efusão articular é o sinal clínico mais comum (MCILWRAITH; FOERNER; DAVIS, 1991;

LAWS et al., 1993; RILEY et al., 1998; BERGIN et al., 2006; BRINK; DOLVIK; TVERDAL, 2009), e como muitas vezes os animais ainda estão em treinamento, sendo preparados para venda, essa pode ser a primeira queixa (LAWS et al., 1993).

Cavalos com OCD geralmente apresentam os primeiros sinais clínicos entre 4 meses e 2 anos de idade (RILEY et al., 1998) porém Beard et al. (1994) consideram que animais de até 5 anos de idade podem apresentar manifestações clínicas iniciais.

2.2.2 Diagnóstico da OCD

O diagnóstico é baseado nos achados clínicos e confirmado pelos exames de imagem, com alterações em locais predispostos a OCD (THOMASSIAN, 2005; VAN WEEREN, 2006). Os sinais radiográficos podem variar, porém normalmente encontra-se área de irregularidade no osso subcondral em contato com a superfície articular, associado a área radioluscente de densidade óssea, que representa a cartilagem mineralizada ou fragmento osteocondral (VAN WEEREN, 2006), sendo sempre recomendado o exame do membro contralateral devido ao frequente envolvimento bilateral (COLÓN et al., 2000). O exame ultrassonográfico apresenta maior sensibilidade para detecção de lesões não mineralizadas, porém possui limitações, como permitir apenas avaliação superficial da articulação e depender da eficiência do operador (RELAVE et al., 2009). Quando há claudicação presente, o bloqueio anestésico intra-articular alivia ou diminui a claudicação (VAN WEEREN, 2006).

A análise do líquido sinovial das articulações acometidas por OCD normalmente não apresenta alterações; moderados sinais inespecíficos de inflamação podem aparecer, se coletado após o exercício (EASTER; WATKINS, 1999). A quantidade de condroitim sulfato (CS) está aumentada em casos sintomáticos e assintomáticos de OCD, havendo também aumento da quantidade de ácido hialurônico (AH) de menor viscosidade, explicado pela clivagem do AH de alto peso em moléculas de menor peso (MACHADO et al., 2012).

Na articulação tibiotársica, as lesões são geralmente encontradas no aspecto cranial da crista intermédia e na porção distal da crista troclear lateral do talus (MCILWRAITH; FOERNER; DAVIS, 1991; HARRISON; EDWARDS, 1996; BERGIN et al., 2006). A alteração característica é uma fissura que separa o ápice da crista intermédia da tíbia do osso subjacente, gerando fragmento osteocondral livre ou aderido ao osso (HARRISON; EDWARDS, 1996). Na crista troclear lateral, as lesões variam desde achatamento até a separação de fragmento (HARRISON; EDWARDS, 1996). Ocasionalmente, lesões similares

são vistas no maléolo medial da tíbia (BERGIN et al., 2006). A posição radiográfica dorsomedial-plantarolateral oblíqua é a que permite melhor visualização dos fragmentos situados na crista intermédia da tíbia, como demonstrado na figura 2 (A) (HOPPE, 1984; GRONDAHL, 1991). Fragmentos que causam claudicação em animais mais velhos devem ser observados com atenção, pois a movimentação destes pode causar sinais clínicos agudos com efusão e claudicação, acompanhado de extensivo dano à cartilagem articular pela ação mecânica do próprio fragmento ou devido ao processo inflamatório (RICHARDSON, 2011).

Nas articulações metacarpo/metatarsofalangeana, as lesões na crista sagital do terceiro metacarpiano ou terceiro metatarsiano normalmente não são associadas à claudicação, sendo mais frequente a efusão articular em graus variados (RICHARDSON, 2011). Fragmentos pequenos e remodelados aparecem como opacidades no bordo dorso-proximal da primeira falange, como exemplificado na figura 2 (B), provavelmente como resultado de compressão do bordo proximal da primeira falange contra a porção distal do terceiro metacarpiano (YOVICH; MCILWRAITH, 1986; COLÓN et al., 2000). Os mecanismos de origem, dos fragmentos osteocondrais nessa articulação, ainda é obscuro e usualmente não envolve claudicação (RICHARDSON, 2011). Apesar de existir a possibilidade de tratamento conservativo, sugere-se retirar cirurgicamente os fragmentos em animais com perspectiva atlética favorável e equinos que serão comercializados (MACHADO, 2010; RICHARDSON, 2011).

Na região palmar ou plantar da primeira falange também encontramos fragmentos osteocondrais, como exemplificado na figura 2 (C), principalmente nos membros posteriores, podendo não causar sinais clínicos, exceto se submetidos a altos níveis de exercício (FORTIER; FOERNER; NIXON, 1995; RICHARDSON, 2011).

Normalmente as fraturas ocorrem no bordo plantar medial da primeira falange (70%) e as lesões bilaterais ocorrem em 18% dos animais, juntamente com fragmentação osteocondral da crista intermédia da tíbia em 18% dos animais e com múltiplos fragmentos em uma única articulação em 13% deles (FORTIER; FOERNER; NIXON, 1995).

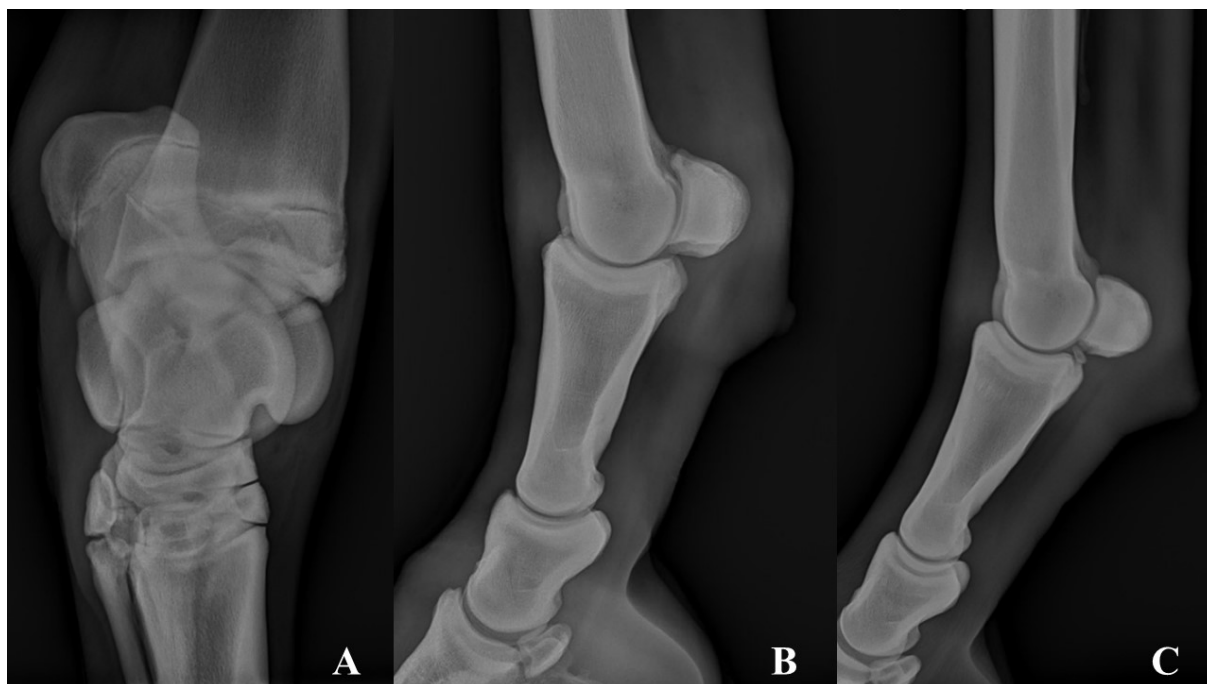


Figura 2 - Imagens radiográficas das articulações tibiotársica (A) e metacarpo/tarsofalangeana (B,C) exemplificando os locais mais comuns de apresentação da OCD. São Paulo, 2021.

2.2.3 Tratamento da OCD

Repouso em baia associado a plano de exercício controlado e fármacos anti-inflamatórios não esteroidais apresentam bons resultados para animais com claudicação moderada a severa (VAN WEEREN, 2006). A terapia conservativa para OCD na presença de fragmentos osteocondrais é normalmente seguida pelo desenvolvimento da doença articular degenerativa, sendo a maior complicação dos casos de OCD (FERKEL et al., 2008).

O tratamento cirúrgico, por artroscopia, com a remoção do fragmento e desbridamento do defeito subcondral tem sido a opção de escolha para o tratamento da OCD (FORTIER; FOERNER; NIXON, 1995), devendo ser realizado sempre que associado a claudicação (RICHARDSON, 2011) e/ou a efusão articular (BEARD et al., 1994). Laws et al. (1993) também consideram que em casos de efusão articular associada à presença do fragmento intra-articular deve-se indicar tratamento cirúrgico, pois a distensão da cápsula articular ou a sinovite podem limitar a performance ao causar diminuição do ângulo de flexão articular e consequentemente gerar alteração na movimentação. A intervenção cirúrgica realizando a remoção dos fragmentos intra-articulares visa prevenir a degeneração da cartilagem a longo prazo (HUNT; SHERMAN, 2003).

2.3. OZONIOTERAPIA

Van Mauren identificou pela primeira vez o odor do ozônio (O_3) em 1785 (ALTMAN, 2007), porém o gás foi descoberto apenas em 1840 pelo químico alemão Christian Friedrich Schonbein na Universidade de Basel na Suíça, enquanto trabalhava com pilhas voláteis na presença de oxigênio, recebendo o nome de ozônio na ocasião (BOCCI, 2005). Em 1860 o químico suíço Jacques-Louis Soret demonstrou que o O_3 era formado por três moléculas de oxigênio (ALTMAN, 2007).

As propriedades oxidantes e desinfetantes foram demonstradas pela primeira vez pelo químico irlandês Thomas Andrews (BOCCI, 2005). Em 1856 o gás foi utilizado para desinfetar centros cirúrgicos em hospitais, e em 1860 a primeira planta de tratamento de água foi construída em Mônaco (ALTMAN, 2007), sendo que hoje existem mais de três mil tratamentos de água municipais utilizando o O_3 no mundo (BOCCI, 2005). Graças ao conceito de Werner von Siemens, de que o ozônio deriva do oxigênio quando há descarga elétrica, os primeiros aparelhos de ozonioterapia puderam ser desenvolvidos com o tubo de super indução (*Siemens's tube*), consistindo de dois tubos interposto de placas de eletrodo em alta voltagem, que pode gerar ozônio na presença de oxigênio (BOCCI, 2005).

A primeira aplicação médica do O_3 parece ter sido realizada pelo cirurgião-chefe do exército alemão em 1915 na primeira guerra mundial. O ozônio medicinal foi utilizado para tratar gangrena pós-traumática, pés congelados e úlceras de decúbito em soldados alemães (BOCCI, 2005), sendo utilizado ainda para prevenir infecção local de procedimentos médicos e controlar infecção de feridas (MERIN et al., 2007). O grande impulso para ozonioterapia foi a criação dos primeiros geradores de O_3 pelo físico Joachim Hansler, permitindo o maior avanço do seu uso médico (ELVIS; EKTA, 2011).

No plano da segurança, em 1980 a Sociedade Médica Alemã de Ozonioterapia elaborou estudo para avaliar a segurança da técnica. Dele participaram 644 profissionais, envolvendo 384.775 pacientes, em que foram realizados 5.579.238 tratamentos. Este estudo mostrou que esta terapia médica é segura, com apenas 0,0007% de risco de complicações. O risco de morte associado à técnica é de apenas 0,0001%, sendo que na literatura médica, existem apenas 7 casos de óbito relatados (RAMALHO, 2017).

A ozonioterapia consiste na utilização do ozônio medicinal, gás solúvel altamente oxidante e com efeito analgésico através de diversos mecanismos. Vários estudos e

experimentos clínicos tem demonstrado efeitos positivos como redução da dor e inflamação, melhora na função e efeitos benéficos no trofismo de ossos e cartilagem, aumentando vascularização e reparo da cartilagem e osso subcondral.

O O_3 em altas concentrações é tóxico, porém há uma “janela terapêutica” com doses variando de 2 a 80 $\mu\text{g/ml}$ que geram efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios, bactericidas, antivirais, antifúngicos, analgésicos, entre outros (SCHWARTZ; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2012). Quando administrado em concentrações menores que 10 $\mu\text{g/ml}$ no sangue, o gás é prontamente neutralizado pelos antioxidantes sanguíneos, sendo biologicamente ineficiente por não atingir o limiar terapêutico (SAGAI; BOCCI, 2011).

O objetivo da ozonioterapia é provocar estresse oxidativo agudo controlado e adequado, não sendo placebo, e transitório, sem gerar estresse oxidativo crônico, gerando estímulo e ativação do sistema imune por meio de pequenos e repetidos choques oxidativos (BOCCI, 2005). É de extrema importância não ultrapassar a capacidade antioxidante do organismo para não causar toxicidade e inflamação (BOCCI, 2005).

Uma das grandes dificuldades do estudo dessa terapia deve-se ao fato de que esta pró-droga se dissolve em poucos minutos no plasma e desaparecer, gerando mensageiros essenciais em suas ações terapêuticas, as espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), responsável pelos efeitos imediatos, e uma mistura de produtos de lipidioperoxidação (LOPs), responsável pelos efeitos tardios (SAGAI; BOCCI, 2011). Estes produtos aumentam a capacidade auto-regulatória, ou seja, ocorre estímulo dos mecanismos naturais responsáveis pela proteção das células e do organismo, ao contrário das doses altas que geram processo inflamatório e tem efeito bactericida (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012).

O ozônio provoca diversas ações no organismo como (SAGAI; BOCCI, 2011; JANI et al., 2012; SCHWARTZ; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2012):

- melhora na oxigenação e circulação sanguínea para os tecidos isquêmicos devido ao efeito do óxido nítrico (ON) e do monóxido de carbono (CO), aumento de glicolização, plasticidade e desvio à direita da curva de dissociação do oxigênio-hemoglobina do eritrócito;
- aumento geral no metabolismo devido a melhor oxigenação, causando melhora na utilização da glicose, maior produção de adenosina trifosfato (ATP), melhor metabolismo proteico e efeito direto sobre os lipídios insaturados, oxidando-os e ao mesmo tempo induzindo mecanismos de reparação;
- melhora da angiogênese e, possivelmente, na implantação da célula-tronco da medula óssea;

- aumento das enzimas celulares antioxidantes: glutathiona peroxidase (GSH), glutathiona redutase (GSR), catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD);
- indução moderada do sistema imune, ativando os neutrófilos e a liberação de citocinas, e aumentando a liberação de fatores de crescimento através da ativação plaquetária;
- efeito analgésico e anti-inflamatório: diminuição da produção de mediadores inflamatórios, inativação dos metabolitos da dor através da oxidação, auxílio na reparação das lesões ao melhorar a microcirculação, eliminação das toxinas e resolução dos distúrbios fisiológicos dolorosos;
- excelente atividade desinfetante, quando utilizado topicamente;
- sensação de bem-estar, provavelmente devido à estimulação do sistema neuroendócrino através da liberação de hormônios e neurotransmissores.

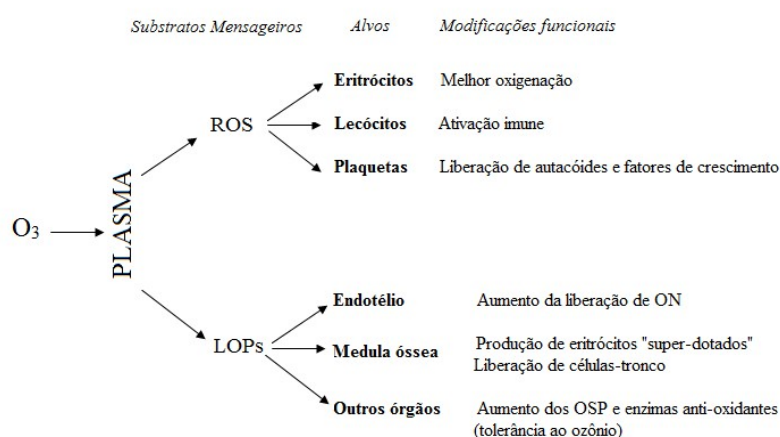


Figura 3 - Resumo dos principais efeitos biológicos durante a exposição do sangue à mistura O₃/O₂, ex vivo, e depois da sua administração ao paciente (traduzido de BOCCI, 2006b).

A administração de ozônio é bastante segura com poucos efeitos adversos relatados. Ela é absolutamente contraindicada em casos de deficiência de enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, e tem contra-indicações relativas em hipertireoidismo não controlado, nos primeiros trimestres de prenhez, em casos de leucemia, trombocitopenia, pacientes tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina, instabilidade cardiovascular e alergia ao ozônio (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012). Apesar dos seus efeitos antimicrobianos, há na literatura alguns relatos de infecção após a aplicação do O₃. Menéndez, Garcia, Peláez (2014) relataram abscedação paravertebral e intra-abdominal por *Staphylococcus aureus* sensível à cloxacilina após o tratamento de lombalgia com ozonioterapia

associada à corticóide. Seyman et al. (2012) relataram artrite séptica por *Pseudomonas aeruginosa* após tratamento de articulação femurotibiopatelar.

Devido aos seus diversos efeitos no organismo, a ozonioterapia tem sido estudada e utilizada em afecções como a osteomielite (OGUZ et al., 2011), doença pulmonar obstrutiva crônica (BORRELLI; BOCCI, 2014), hepatite (XI-BING et al., 2010), cistite (BAYRAK et al., 2014; NEIMARK et al., 2014), artrite reumatóide (CHANG et al., 2005; CHEN et al., 2013), osteoartrite (OA) (CARDELLI et al., 2008; YU et al., 2010; MAWSOUF et al., 2011; MISHRA et al., 2011; CALUNGA et al., 2012; DAIF, 2012; VAILLANT et al., 2013; CAMELIA et al., 2014), dor lombar (DE NÊUTON et al., 2013; FIORELA; SCHWARTZ, 2013; APUZZO, 2014), esclerose múltipla (LINTAS et al., 2013), peritonite (SOUZA et al., 2010), em defeitos ósseos (KAZANCIOGLU; EZIRGANLI; AYDIN, 2013; OZDEMIR et al., 2013), doença arterial coronariana (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2012), entre outras.

Tabela 1 - Indicações gerais da ozonioterapia (modificado de CAKIR, 2014).

Especialização	Enfermidade
Dermatologia	Herpes Zoster e simplex, acne, eczema, lipodistrofia, micose, psoríase dermatite atópica
Medicina interna	Hepatite, diabetes, aterosclerose, hipertensão arterial, osteoartrite, asma, bronquite crônica, gastrite, úlcera gástrica, doença de Crohn, constipação crônica, hipotireoidismo
Nefrologia/Diálise	Adjuvante no tratamento de patologias isquêmico-metabólicas
Neurologia	Depressão, cefaléia vasomotora, doenças neuro-vasculares, enxaquecas
Odontologia	Tratamento de cavidades, desinfecção de cavidades durante a cirurgia e no pós-operatório, periodontite e afta
Reumatologia	Conflitos disco-radiculares, hérnia de disco, reumatismo articular lumbago, artrite reumatóide
Angiologia	Insuficiência venosa, úlcera diabética, coronaropatia, gangrena, úlcera pós-flebite, vasculopatia periférica
Ginecologia	Infeção bacteriana por protozoa ou micose, cisto de Bartholin, vaginite, menopausa, inflamação pélvica crônica, infertilidade
Imunologia	Imuno-modulador, doenças autoimunes, adjuvante no tratamento de pacientes submetidos a radioterapia

A ozonioterapia pode ser administrada por diversas vias como a auto-hemoterapia, intravenosa direta (IV), água ou soluções fisiológicas ozonizadas, insuflações retais ou vaginais, intra-articular (IA), prolo/escleroterapia, óleo ozonizado por via tópica ou oral, auricular, intra-peritoneal, subcutâneo, entre outras (BOCCI, 2006; JANI et al., 2012). A auto-

hemoterapia maior é realizada retirando-se de 100 a 225 ml de sangue, mistura-se externamente com o mesmo volume de O₃ durante 5 minutos, com concentrações variando de 10 a 80 µg/ml, e reinfunde no paciente lentamente. Já a menor retira-se 10 ml de sangue e ozoniza-se na seringa com o mesmo volume do gás, homogeneiza a mistura e aplica-se por via intramuscular (BOCCI, 2005).

2.3.1 Ozonioterapia na Medicina Veterinária

Existem vários estudos com O₃ medicinal na Medicina humana e em animais de laboratório já, na Medicina Veterinária, tem-se aumentado o número de estudos. Na literatura há alguns estudos com equinos (ALVES et al., 2004; BALLARDINI, 2006; GARCIA LIÑEIRO et al., 2009; VENDRUSCOLO et al., 2018; JARAMILLO et al., 2020), bovinos (OGATA; NAGAHATA, 2000; ZOBEL et al., 2012, 2014; ZOBEL; TKALČIĆ, 2013; POLAT et al., 2015; MALDONADO et al., 2017; ESCANDÓN et al., 2020), pequenos ruminantes (DJURICIC; VALPOTIC; SAMARDZIJA, 2015) e cães (HAN et al., 2007; SILVA JÚNIOR et al., 2020).

Alves et al. (2004) testaram o efeito da solução fisiológica ozonizada após lesão de isquemia e reperfusão experimental, observando menor desprendimento epitelial da mucosa, infiltrado de neutrófilos, hemorragia e edema. Outro estudo utilizou a solução fisiológica ozonizada em equinos hípidos após a sensibilização com auto-hemoterapia maior na dose de 30µg/ml. Um grupo recebeu 500 ml da solução na dose final de 35 µg/kg, enquanto outro recebeu um litro a cada três dias, totalizando oito aplicações com dose final de 70 µg/kg (HADDAD et al., 2009). Os autores observaram diminuição dos valores de glicemia a partir da primeira aplicação, aumento do fibrinogênio e diminuição discreta da gama-glutamyltransferase.

Ballardini (2006) testou o efeito da auto-hemoterapia maior em equinos e observou melhora no desempenho atlético de animais hípidos, normalização de quadros de trombocitopenia, anemia e leucocitose, após terapia com 500 ml de sangue. Já Tsuzuki et al. (2015) avaliaram o efeito de uma aplicação de auto-hemoterapia maior em equinos de corrida em início de treinamento sobre a capacidade antioxidante, observando aumento no potencial antioxidante biológico e menor estresse oxidativo nos animais tratados até 14 dias depois da aplicação.

No tratamento de lombalgias, Garcia Liñero et al. (2009) descreveram 15 casos de lombalgia toracolombar tratados com quatro aplicações semanais na periferia da lesão, obtendo ausência da dor à palpação e melhora ou resolução da claudicação em 100% dos casos, além de melhora no desempenho atlético em 88% dos animais. Já Ballardini (2005) tratou quatro equinos de trote com aplicações subcutâneas de O₃ na concentração de 75 mg/ml semanalmente durante três a quatro semanas, obtendo remissão da andadura rígida e da dor à palpação muscular. Em outro estudo (VIGLIANI; BONIPERTI; SCUDO, 2005), 30 equinos atletas foram tratados para lombalgias causadas por alterações toracolombares. O tratamento consistiu de duas aplicações com intervalo de 10 dias de 15 ml da mistura O₂/O₃ na concentração de 30 µg/ml. Após a primeira aplicação houve diminuição da dor em coluna torácica e lombar em 44% e 78% dos animais, respectivamente, sendo que ao final 72% e 93% apresentaram melhora clínica.

Com o objetivo de testar a segurança da ozonioterapia retal em equinos Jaramillo et al. (2020) dividiu 16 cavalos em dois grupos: controle, que recebeu 1l de oxigênio na ampola retal; e tratado que recebeu 10 sessões de 1l de ozônio medicinal em doses escalonadas, 10µg/ml por duas aplicações, 15µg/ml por duas aplicações e 20µg/ml pelas seis restantes. Sendo realizado sempre previamente ao tratamento o esvaziamento da ampola retal. Amostras de sangue foram obtidas semanalmente, iniciando previamente a primeira aplicação e finalizando uma semana depois para realização de hemograma, perfil renal, hepático, fibrinogênio e *burst* oxidativo por citometria de fluxo, além do exame físico diário. Não se observou diferença estatística no exame físico, bioquímico, fibrinogênio e *burst* oxidativo. A contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e volume globular aumentaram significativamente em relação ao controle. A única alteração observada foi o aumento no número de defecações após a aplicação do ozônio, concluindo-se que a ozonioterapia intrarretal é segura nas doses empregadas e pode melhorar indiretamente a oxigenação e metabolismo dos tecidos.

Desta vez com infecções atípicas de celiotomias, Ramírez et al. (2013) relataram dois casos tratados com gás, salina e óleo ozonizado, com boa resolução do quadro clínico. No primeiro houve crescimento de *Escherichia coli* e *Actinomyces* spp, e no segundo de *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius* e *Enterococcus faecium*. No acompanhamento clínico observou-se desprendimento do tecido necrosado seguido de boa granulação da ferida e epitelização.

Vendruscolo et al. (2018) testaram a segurança de duas doses (20 e 40µg/ml) de ozônio intra-articular usando como controle o oxigênio. Os resultados após o tratamento com 3

aplicações semanais, totalizando 10 tratamentos permitiram afirmar que o O₃ foi seguro em ambas as doses.

No tratamento de mastites em vacas, obteve-se resolução do quadro em 60% dos casos, com melhora clínica dos animais e das análises do leite, mostrando-se como alternativa viável e de baixo custo (OGATA; NAGAHATA, 2000).

Em casos de urovagina houve diminuição no número de inseminações artificiais e menor descarte de vacas no grupo tratado com solução fisiológica ozonizada. Tal resultado provavelmente ocorreu devido ao efeito bactericida e anti-inflamatório do O₃, melhorando o ambiente para a fecundação com maior eficácia que a solução com antibiótico utilizada (ZOBEL et al., 2012).

O tratamento com ozônio intrauterino no pós-parto imediato, 6 e 24h após, foi capaz de reduzir significativamente o número de dias vazios (22,56 dias a menos) e de inseminações artificiais (0,74 inseminações) (ZOBEL et al., 2014), sendo observado em outro estudo recente (ESCANDÓN et al., 2020) com utilização da ozonioterapia no pós-parto melhora significativa na citologia, menor número de endometrite subclínica, número de inseminações até prenhez e aumento do número de prenhez a primeira inseminação. Ainda no tratamento de afecções uterinas, desta vez em endometrites subclínicas (MALDONADO et al., 2017), 84 vacas foram divididas em 2 grupos um tratado com 60 ml de água destilada ozonizada na concentração de 45µg/ml (n=50) e no outro grupo foi administrado 500mg de cefaprina benzatina (n=34), todos por via intrauterina. Observou-se diminuição significativa na porcentagem de polimorfonucleares na citologia as 72h e na porcentagem de prenhez após a primeira inseminação, sendo melhores no grupo tratado com ozonioterapia.

Em vacas subférteis sem sinais de metrite, que não tiveram prenhez positiva após duas inseminações Polat et al. (2015) testaram a aplicação intrauterina de spray de ozônio (n=30) e rifaximina spray (n=23), sendo inseminadas no próximo estro. Concluiu-se que o ozônio é tão efetivo quanto a rifaxima spray.

Vacas com retenção de placenta foram separadas em 5 grupos: A) ozonioterapia intrauterina e cefalexina sistêmica, B) ozonioterapia intrauterina, C) cefalexina parenteral e antibióticos intrauterinos, D) cefalexina parenteral e E) prostaglandinas parenterais com intervalos de 11 dias. Os grupos tratados com ozonioterapia tiveram menor quantidade de dias vazias, diminuição no número de inseminações artificiais, diminuição de dias com febre, maior porcentagem de animais com prenhez e menor quantidade de animais descartados por infertilidade comprado aos demais grupos (ZOBEL; TKALČIĆ, 2013). Em cabras com ou sem retenção de placenta houve resultados similares nos índices de prenhez tanto no grupo tratado

com antibiótico quanto com O₃, indicando possível alternativa com menor custo e diminuindo o problema de resistência microbiana (DJURICIC; VALPOTIC; SAMARDZIJA, 2015).

Em cães com hérnias discais tratadas com aplicações intradiscas de O₃ na dose de 32 µg/ml guiadas por fluoroscopia, houve redução de 2,69-13,89% dependendo do grau de calcificação do disco (HAN et al., 2007). Todos os animais voltaram a andar e após 20 meses do tratamento não houve recidivas. Desta vez com utilização intra-articular de AH reticulado puro ou associado a ozonioterapia em articulações coxofemorais, observou-se melhor análise cinemática (SILVA JÚNIOR et al., 2020).

2.3.2 Ozonioterapia intra-articular

A aplicação da ozonioterapia em casos de OA tem sido amplamente estudada em casos clínicos humanos (CARDELLI et al., 2008; MISHRA et al., 2011; CALUNGA et al., 2012; DAIF, 2012; CAMELIA et al., 2014), gerando alguns protocolos de tratamento conforme demonstrado na tabela 2 (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012).

Na literatura há apenas um estudo envolvendo a aplicação intra-articular de O₃ medicinal em equinos (VENDRUSCOLO et al., 2018), testando a segurança de duas doses (20 e 40µg/ml) de ozônio intra-articular usando como controle o oxigênio. Os resultados após o tratamento com 3 aplicações semanais, totalizando 10 tratamentos, não se observou alterações significativas das citocinas, eicosanóides inflamatórios e GAGs, apenas da proteína em um momento. Houve aumento pontual dos escores de ultrassom e claudicação, sendo detectadas apenas através do aparelho *Lameness Locator*. Esses resultados permitiram afirmar que o O₃ foi seguro em ambas as doses. Há ainda um estudo em displasia coxofemoral de cães (SILVA JÚNIOR et al., 2020) no qual dividiu-se 14 animais, sendo tratados com AH reticulado e AH reticulado associado ozônio, na mesma seringa, na concentração de 45µg/ml, sendo acompanhados mensalmente por 90 dias. Houve diferença entre os grupos apenas na análise cinemática, havendo diferença entre os momentos no exame ortopédico e de claudicação, e sem diferença nos exames radiográficos e goniometria. Vale ressaltar que o ozônio pode causar a quebra do AH, através das EROs, sendo recomendado aplicar primeiro o gás e segundos depois o AH para diminuir as chances de quebra da molécula, sendo que também pode-se considerar a concentração de 45µg/ml alta para casos de OA.

Tabela 2 - Injeção intra-articular – conceitos de tratamento (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012).

Indicação	Forma de aplicação	Concentração de ozônio	Volume	Quantidade de ozônio	Frequência de tratamento
Artrose	Intra-articular	7-20 µg/ml	1-20 ml	7-400 µg	1-2 vezes por semana
	Peri-articular	2-11 µg/ml	2-5 ml	4-55 µg	1-2 vezes por semana
Art FTP	Intra-articular	10-20 µg/ml	5-20 ml	50-400 µg	1-2 vezes por semana
Art do ombro	Intra-articular	10-20 µg/ml	5-20 ml	50-400 µg	1-2 vezes por semana
Art da falange	Intra-articular	10-20 µg/ml	1-2 ml	10-40 µg	1-2 vezes por semana

Quando o ozônio é aplicado por via intra-articular, gera EROs e LOPs responsáveis pelos efeitos de: a) inibição/inativação da liberação de enzimas e citocinas pró-inflamatórias; b) estimulação da proliferação de condrócitos (provavelmente via H_2O_2 – EROs) e fibroblastos, aumentando a produção da MEC e da cartilagem articular; c) inibição da liberação de bradicinina e citocinas pro-inflamatórias gerando reabsorção do edema e diminuição da dor; d) liberação de interleucina (IL)-1Ra e outros receptores e antagonistas capazes de neutralizar citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-8, IL-12, IL-15 e fator de necrose tumoral (TNF)- α ; e) liberação de citocinas imunossupressivas (fator de crescimento transformante (TGF)- β e IL-10), que diminuem a inflamação (ILIAKIS et al., 2001; PAOLONI et al., 2009). Dentre os diversos fatores de crescimento, TGF- β 1 modula a expressão de integrinas e estimula a síntese de proteínas da matriz, como o colágeno e os GAGs (TRIPPEL, 1995; QI; SCULLY, 1997; GRIMAUD; HEYMANN; RÉDINI, 2002; JANI et al., 2012). Este processo ocorre em duas fases no LS. Na primeira fase há inibição da inflamação, diminuindo a PGE_2 e citocinas pró-inflamatórias através da diminuição da fosfolipase A_2 , inibição da cicloxigenase I e II, e redução da caliceína e bradicinina. Ele pode, ainda, diminuir a liberação de serotonina e metaloproteínases (MMPs), como collagenase, agreganase e gelatinase, evitando a destruição da cartilagem articular (BOCCI, 2005; BURIC; RIGOBELLO; HOOPER, 2014). Na segunda fase, o O_3 age aumentando as enzimas antioxidantes, proteínas oxidativas de choque (OSP), como a heme-oxigenase-1 (HO-1), citocinas inibitórias (IL-4, IL-10 e TGF- β), estimulando a neoangiogênese, a síntese de ON e liberação de endorfinas, de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e cortisol. Esse panorama age no processo de reparo articular através da estimulação de condrócitos, fibroblastos e células tronco que sintetizam PGs, GAGs e colágeno (BOCCI, 2005).

A diminuição na expressão de MMP-13 e receptor semelhante a activina kinase (ALK5) foi observada por Oladazimi, Farzanegi e Azarbayejani (2020) em estudo em ratos com OA

induzida. Os ratos foram divididos em 8 grupos de tratamento, modelo experimental, células-tronco mesenquimais (MSCs), ozônio, exercício, MSCs+ozônio, MSCs+exercício, ozônio+exercício e MSCs+ozônio+exercício. O último grupo obteve o melhor resultado, porém quando analisadas as terapias separadamente o melhor resultado foi obtido pela ozonioterapia. Ainda com o mesmo modelo experimental (REZAIE et al., 2020), porém observando-se a expressão de receptores canabinóides (CB-1) e de ácido gama-aminobutírico (GABA), observou-se melhores resultados com o grupo MSCs+ozônio+exercício, sendo que as associações com ozônio obtendo as melhores expressões e quando observados isoladamente, a ozonioterapia também foi o melhor tratamento.

Yu et al. (2010) induziram a OA em 40 ratos, que foram divididos em grupo controle sem lesão (A), grupo controle com lesão e sem tratamento (B), grupo tratado com ar (C), grupo tratado com 35 µg/ml de O₃ (D) e grupo tratado com 70 µg/ml de O₃ (E). No grupo D observou-se cartilagem articular mais regular, com menor perda da coloração de Masson. Já no grupo E os escores foram semelhantes ao grupo B, demonstrando que a dose utilizada gerou processo inflamatório. Vaillant et al. (2013) observaram menor dano articular, diminuição da concentração de TNF-α e dos níveis de RNAm para TNF-α e IL-1β e redução no estresse oxidativo articular no grupo tratado com O₃ após indução de inflamação articular.

Em estudo clínico em humanos (MISHRA et al., 2011), pacientes com OA na articulação femorotibiopatelar foram tratados com três aplicações de O₃ de 30 µg/ml (10 ml) e 2 ml de lidocaína a 2%, obtendo 80% de sucesso na primeira avaliação e melhorando para 90% após seis meses, com maior satisfação do paciente e diminuição nos escores de WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index). Resultado semelhante foi observado em outro estudo com 98 pacientes geriátricos com OA na mesma articulação; avaliou-se nesse estudo a escala visual análoga, índice de Lequesne, teste TUG, instrumento de pesquisa de saúde SF-36, WOMAC e mensuração de dor geriátrica, não havendo melhora significativa com o tratamento apenas no teste de TUG (LOPES DE JESUS et al., 2017a). No entanto, outro estudo envolvendo a mesma articulação (CAMELIA et al., 2014) comparou a fisioterapia com a ozonioterapia (2-5 µg/ml com 40-50ml de volume por 12 sessões) e não observou nenhuma diferença, provavelmente, pela baixa concentração de O₃ utilizada.

Dois artigos científicos comparam a aplicação IA de ozônio com aplicações IA de AH em pacientes humanos de 45 a 80 anos (GIOMBINI et al., 2016; RAEISSADAT et al., 2018), e outros dois comparando com o uso de plasma rico em plaquetas (DUYMUS et al., 2016; DERNEK; KESIKTAS, 2019). O ozônio foi eficiente em promover diminuição da dor e melhora na função articular nos quatro estudos, mostrando-se na maioria das vezes eficaz

similar às outras terapias, e também incrementando os resultados benéficos quando utilizado em associação, como a diminuição dos episódios de inflamação pós aplicação de plasma rico em plaquetas (DERNEK; KESIKTAS, 2019). Contudo, seus efeitos não alcançaram mais que seis meses.

A associação de duas vias de aplicação de O₃, intrarretal (25-40 µg/ml) e intra-articular (20 µg/ml), foi testada por Calunga et al. (2012), que obteve redução dos hidroperóxidos totais e proteína de produtos de oxidação avançada e melhora na avaliação da VAS. Ao final do experimento as concentrações de SOD e de GRH estavam semelhantes ao controle saudável e 57% dos pacientes não apresentavam limitações da movimentação articular.

Há na literatura meta-análises (ARIAS-VÁZQUEZ et al., 2019; NOORI-ZADEH et al., 2019; OLIVIERO; GIORDANO; MAFFULLI, 2019) referente a utilização do ozônio intra-articular em OA de femurotibiopatelar em humanos avaliando o sucesso do tratamento através das escalas VAS e WOMAC, relatando que a maioria dos estudos clínicos randomizados são de baixa qualidade com viés, os protocolos utilizados variam bastante quanto a concentração, volume, posologia e tempo de tratamento empregados, compara-se com diferentes tratamentos como o plasma rico em plaquetas (PRP), AH, soro autólogo condicionado (ACS), sendo difícil ter conclusões robustas sobre os resultados. As observações foram que a ozonioterapia tem um bom efeito durante 1 a 3 meses após o tratamento, voltando depois as escalas iniciais de dor, sendo efetivo na melhora de dor crônica e com melhores resultados em OAs de graus 1 e 2.

Várias pesquisas foram conduzidas utilizando-se ozonioterapia em animais de laboratório e humanos, contudo, ainda não foram publicados estudos focando a utilização clínica do O₃ em articulações sinoviais de equinos. Como já é conhecida a segurança desta terapia frente a sua utilização articular em equinos (VENDRUSCOLO et al., 2018), faz-se necessário agora estudos clínicos para conhecer seus benefícios nas diversas afecções articulares.

3. JUSTIFICATIVA

A ozonioterapia surgiu como opção acessível e segura para o tratamento de diversas afecções em humanos e, apesar de amplamente difundida, seu emprego acontece a despeito de lacunas no conhecimento dos métodos ideais de administração em equinos, bem como de seus mecanismos de ação. Os artigos em humanos enfatizam a redução substancial da dor e melhora da função. O mecanismo de ação pelo qual o ozônio causa analgesia e melhora clínica ainda precisa ser mais estudado e não é completamente claro. Estas lacunas, somadas à ausência de estudos verificando os múltiplos aspectos dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante da aplicação de ozônio medicinal em articulações de equinos motivaram a realização deste trabalho.

4. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório e de modulação do estresse oxidativo do ozônio medicinal intra-articular em equinos submetidos a artroscopia para retirada de fragmentos osteocondrais, por meio do exame físico, ultrassonográfico, do líquido sinovial e análise histopatológica da membrana sinovial.

Objetivos específicos

- Identificar redução de dor articular após uso da ozonioterapia por meio de exame físico e escala facial de dor;
- Identificar redução de inflamação articular após uso da ozonioterapia por meio de exame ultrassonográfico;
- Quantificar o neuropeptídeo substância P no LS;
- Quantificar as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-10, IL-4 e TNF- α) e eicosanoide prostaglandina E₂ (PGE₂) do LS;
- Detectar, quantificar e comparar as concentrações de proteína, AH e CS, bem como peso molecular do AH no LS;
- Mensurar atividade antioxidante através da capacidade antioxidante total, capacidade oxidante total e malonaldeído no LS, bem como quantificar as EROs geradas (estresse oxidativo) por meio da citometria de fluxo;
- Relacionar o aspecto microscópico da membrana sinovial e a expressão de citocinas e biomarcadores.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o protocolo de número 5661280717.

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica, no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, no Laboratório Especializado em Análises Científicas (LEAC) e no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária da FMVA - Unesp Campus Araçatuba.

5.1. ANIMAIS

Foram utilizadas 31 articulações de equinos com OCD, de 26 animais diferentes, compostas por articulações tibiotársicas, metacarpo ou metatarsofalangeanas, referidos para o Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário da FMVZ- USP para realização de artroscopia e retirada de fragmento proveniente de OCD.

Os animais ficaram alocados em baias no Departamento de Cirurgia- FMVZ/USP recebendo feno de *coast cross* controlado e água *ad libidum*.

Os animais que apresentavam mais de duas articulações acometidas foram excluídos do estudo, assim como animais que apresentavam quadro de osteoartrite em estágio avançado associado a OCD. Para a divisão nos diferentes grupos alocou-se quantidade iguais de articulações tibiotársicas e metacarpo/tarsofalangeanas. Além disso, articulações com escores ultrassonográficos semelhantes foram distribuídas entre os grupos de forma randomizada.

5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os animais receberam antibioticoprofilaxia com amicacina na dose de 15 mg/kg/SID/IV durante 5 dias, e para controle da dor pós-operatória foi realizada aplicação de tramadol 3mg/kg/TID e dipirona de resgate (22mg/kg). Após prévia avaliação as articulações foram divididas em dois grupos:

- **Grupo T (GT):** Grupo tratado – foi realizada ao final do procedimento cirúrgico lavagem da articulação com o gás ozônio na concentração de 20 µg/ml durante 5 minutos, após 48 horas foi coletado líquido sinovial e aplicado 5ml de ozônio seguida de 2 ml de ácido hialurônico.

- **Grupo C (GC):** Grupo controle – foi realizada ao final do procedimento cirúrgico lavagem da articulação com gás carbônico durante 5 minutos, após 48 horas foi coletado líquido sinovial e aplicado 2 ml de ácido hialurônico (fig 4).



Figura 4 - Momento da coleta de líquido sinovial após artroscopia (A) seguida de aplicação de ácido hialurônico (B) de animal do grupo controle. São Paulo, 2021.

O O₃ foi gerado imediatamente antes da aplicação com auxílio de um gerador da marca Ozone & Life®, regulando-se o fluxo de O₂ e o dosador da descarga elétrica, e equipados com filtro Millex GS® para filtrar eventuais impurezas provenientes do cilindro de oxigênio. Para a cirurgia um extensor de equipo foi fixado diretamente à cânula de artroscopia por 5 minutos (fig 5). Para a infiltração, foi acondicionado em uma seringa de 5 ml sem látex da marca Terumo®, mantida na posição vertical para evitar eventual vazamento do gás até a aplicação (fig 6).

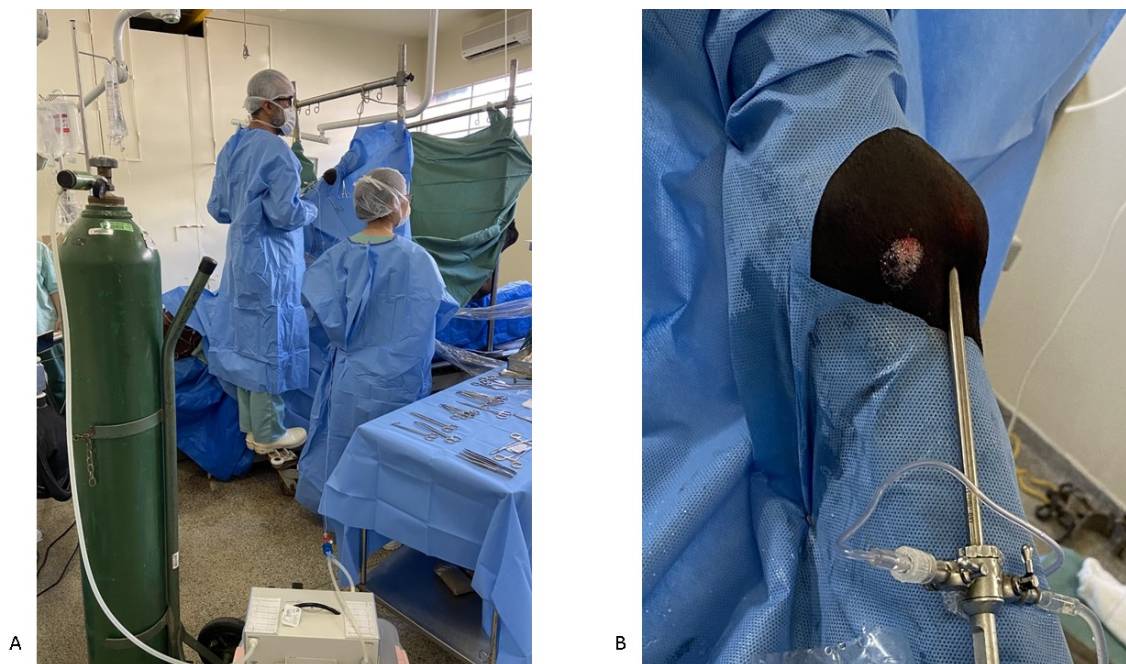


Figura 5 - Lavagem articular com gás ozônio através de instilação do gás saindo diretamente do gerador (A). Imagem focalizando a articulação com a entrada do gás através da cânula de artroscopia e saída formando as bolhas (B). São Paulo, 2021.



Figura 6 - Infiltração com gás ozônio no momento 48 horas, após coleta e antes da aplicação de ácido hialurônico no grupo tratado. São Paulo, 2021.

5.3. AVALIAÇÃO FÍSICA

A avaliação física consistiu na aferição das frequências cardíaca (FC), respiratória (FR) e escala facial de dor (EFD) segundo Dalla Costa et al.(2014), por avaliador cego, e foi realizada no momento 0 e diariamente até o final do experimento (96 horas), conforme demonstrado na figura 7.

<p>Posicionamento das orelhas</p>  <p>Ausente (0) Moderadamente presente (1) Obviamente presente (2)</p> <p>As orelhas são mantidas em pé e viradas para trás. Como resultado, o espaço entre as orelhas pode parecer relativamente maior comparado ao basal.</p>	<p>Fechamento dos olhos</p>  <p>Ausente (0) Moderadamente presente (1) Obviamente presente (2)</p> <p>A pálpebra pode estar parcial ou completamente fechada. Qualquer fechamento palpebral que reduza o tamanho dos olhos por mais da metade deve ser considerado “obviamente presente” ou “2”.</p>
<p>Tensão acima da área dos olhos</p>  <p>Ausente (0) Moderadamente presente (1) Obviamente presente (2)</p> <p>A contração dos músculos na área acima dos olhos aumenta a visualização das estruturas ósseas subjacentes. Se a crista do osso temporal estiver claramente visível deve ser considerado “obviamente presente” ou “2”.</p>	<p>Tensão da musculatura mastigatória</p>  <p>Ausente (0) Moderadamente presente (1) Obviamente presente (2)</p> <p>A tensão dos músculos mastigatórios é claramente visível como aumento da tensão acima da boca. Se os músculos mastigatórios estiverem claramente proeminentes e perceptíveis o escore deve ser considerado “obviamente presente” ou “2”.</p>
<p>Tensão na boca e queixo pronunciado</p>  <p>Ausente (0) Moderadamente presente (1) Obviamente presente (2)</p> <p>A tensão na boca é claramente visível quando o lábio superior é deslocado para trás e o lábio inferior deixa o queixo pronunciado.</p>	<p>Narinas tensas e achatamento do perfil</p>  <p>Ausente (0) Moderadamente presente (1) Obviamente presente (2)</p> <p>As narinas parecem tensas e levemente dilatadas, o perfil da narina fica mais plano e os lábios alongam.</p>

Figura 7 - Escala facial de dor (EFD) Grimace com imagens e explicação para cada uma das 6 unidades de ação facial. Cada unidade é avaliada quanto a ausência (escore 0), moderadamente presente (1) e obviamente presente (2). Traduzido de Dalla Costa et al. (2014).

A avaliação de dor articular ocorreu nos momentos 0, 48 e 96 horas consistindo de:

- A - inspeção (aumento de volume, postura antálgica em estação).
- B - palpação (calor, dor, consistência)
- C - dinâmica (presença de claudicação): foi detectada, avaliada e quantificada pelo equipamento Lameness Locator TM, no momento 0 ao trote com o intuito de homogeneizar os grupos. Antes e após a cirurgia artroscópica também a dinâmica foi avaliada por meio de inspeção visual ao passo.

A presença de claudicação nos cavalos foi avaliada de forma objetiva no momento 0 por meio da utilização de equipamento¹ capaz de indicar o membro de origem e quantificar a claudicação. O equipamento é composto por sistema via *bluetooth*, que recebe informações de três sensores sem fio, não invasivos, colocados na cabeça (acelerômetro), face dorsal do membro torácico direito (giroscópio) e pelve (acelerômetro) (fig. 8). Os movimentos captados são convertidos em vetores e interpretados pelo programa, que atribui um número ao vetor resultante. Para os membros torácicos, o vetor de somatória não pode exceder $\pm 8,5$, e para os pélvicos a amplitude total da movimentação da pelve não pode exceder ± 3 .



Figura 8 - Animal sendo avaliado com auxílio do equipamento Lameness Locator com sensores posicionados na cabeça, pelve e membro torácico direito (destacados nos círculos vermelhos) conectados ao *tablet* para conversão e interpretação das informações. São Paulo, 2021.

¹LamenessLocator®

5.4. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

A avaliação ultrassonográfica foi realizada antes do procedimento cirúrgico (M0h), 48 (M48h) e 96 horas (M96h) após o mesmo. Os exames foram realizados com o equipamento de ultrassom ESAOTE MyLab 30 VET, com transdutor eletrônico linear multifrequencial de 7,5 a 12 MHz, as imagens salvas e identificadas para posterior análise por dois avaliadores cegos. Utilizou-se para pontuação os escores adaptados de Silva et al. (2019), variando de 0 a 27, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Descrição dos critérios e pontuações utilizados para avaliação ultrassonográfica.

Aspecto do líquido sinovial (ALS)	Pontuação
Normal (anecóico)	0
Discretamente alterado (predominantemente anecóico/raros pontos hiperecogênicos)	1
Alterado (líquido heterogêneo com pontos anecóicos)	2
Presença de fibrina/evidentes pontos hiperecogênicos, predominantemente heterogêneo	3
Quantidade de líquido sinovial (QLS)	Pontuação
Normal	0
Discretamente aumentado	1
Aumentado	2
Efusão intensa	3
Aspecto da cápsula articular (ACpA)	Pontuação
Normal	0
Discretamente alterada	1
Alterada (claramente espessada e com irregularidade/poucas proliferações na inserção)	2
Alteração intensa (espessada, heterogênea, pontos de calcificação, com intensa proliferação na inserção)	3
Aspecto de ligamentos periarticulares (ALPA)	Pontuação
Normal	0
Discretamente alterado	1
Alterado (claramente heterogêneo e com proliferações na origem/inserção)	2
Alteração intensa	3
Vascularização e sinovite (VS)	Pontuação
Nenhuma	0
Discreta (poucos vasos visíveis, sinóvia discretamente hipertrofiada)	1
Moderada (vascularização evidente, congestão e sinóvia hipertrofiada)	2
Acentuada	3
Aspecto da cartilagem articular (ACA)	Pontuação
Normal	0
Discretamente irregular	1
Descontínua e rugosa	2
Difícil visualização, erosões, fragmentos	3
Superfície subcondral (SS)	Pontuação
Normal	0
Irregular com lesões focais	1
Claramente Irregular	2
Depressões, erosões, fragmentos	3
Aspecto da plica (AP)	Pontuação
Normal	0
Discretamente alterada	1
Alterada (heterogênea e hipertrofiada)	2
Alteração intensa	3
Presença de osteófitos (PO)	Pontuação
Nenhum	0
Projeção discreta	1
Projeção evidente	2
Projeção acentuada	3

5.5. ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

As amostras do líquido sinovial (LS) foram colhidas previamente ao início do procedimento cirúrgico e 48 horas após. Após cada coleta, as amostras de LS foram imediatamente centrifugadas² a 4°C e 2000 G, durante 15 minutos. O sobrenadante foi aliquotado em tubos de 2 ml e congelado a -80°C para futuras análises.

A contagem total de células nucleadas foi realizada em câmara de Neubauer³, com alíquotas de líquido sinovial *in natura*. Para o diferencial celular foram confeccionados esfregaços com LS *in natura* e corados com Rosenfeld.

A dosagem da proteína total foi realizada pelo método do biureto, com a utilização do analisador bioquímico automático. A análise da concentração de ureia foi realizada através do mesmo método e foi utilizada como fator de correção para efusão articular.

A quantificação das citocinas IL-1 beta, IL-6 e IL-10, IL-4 e TNF- α foi realizada por meio do kit MILLIPLEX® MAP (Equine Cytokine/Chemokine Panel) da EMD Millipore Corporation, baseada na tecnologia Luminex xMAP®, com amostras previamente tratadas durante 1 hora a 37°C com hialuronidase testis (100Ui/ml) na diluição de 10 μ l para 200 μ l de amostra.

A concentração do neuropeptídeo substância P e do eicosanoide prostaglandina E2 (PGE₂) no LS foram mensuradas por ELISA por meio de *Kits* comerciais⁴, validados anteriormente para amostras de LS equino por Vendruscolo et al.(2018).

A identificação e quantificação de ácido hialurônico (AH) e condroitim sulfato (CS) foi realizada conforme descrito por Machado et al. (2012).

A determinação do peso do ácido hialurônico foi realizada através de eletroforese em gel de ágar a 1% conforme descrito por Lee e Cowman (1994) e modificada posteriormente como descrito por Vendruscolo et al.(2018).

5.6. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

A capacidade antioxidante total (TAC) foi determinado pelo método descrito por Erel (2004) e os resultados expressos em μ mol equivalentes de Trolox/L. A capacidade antioxidante total (TOC) foi quantificado pelo método descrito por Erel (2005) e os resultados expressos em

² Centrífuga 5417 R - Eppendorf

³Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor

⁴Monoclonal - Cayman Chemical, Ann Arbor, MI

μmol equivalentes de peróxido de hidrogênio/L. A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação das espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Hunter & Nlemadim (1985), com auxílio de uma leitora de ELISA na absorbância de 540nm e expressos como malonaldeído (MDA) em $\mu\text{mol/L}$. Assim como para a análise das citocinas, as amostras foram previamente tratadas durante 1 hora a 37°C com hialuronidase testis (100Ui/ml) na diluição de 10 μl para 200 μl de amostra.

Para análise do burst oxidativo por citometria de fluxo, após a coleta do LS, as amostras *in natura* foram divididas em alíquotas para análises subsequentes segundo Vendruscolo et al. (2018). Os resultados foram expressos como o índice de ativação representado pela razão geomean PMA/geomean Burst basal.

5.7. ANÁLISE DA MEMBRANA SINOVIAL

Durante o procedimento cirúrgico foi coletada amostra de membrana sinovial em três momentos: logo após estabelecido os portais da ótica e de trabalho, após o final do procedimento cirúrgico e após a lavagem articular com gás.

As amostras foram acondicionadas em *eppendorfs* com solução de formol e lâminas na coloração de hematoxilina e eosina foram confeccionadas para avaliação da inflamação da membrana sinovial segundo McIlwraith et al. (2010) por avaliador cego, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Sistema de graduação microscópica para membrana sinovial, com descrição dos itens e graus. Traduzido de McIlwraith et al. (2010).

Parâmetro	Grau	Descrição
Infiltrado celular (Linfócitos e algumas células plasmáticas)	0	Sem células mononucleares no corte
	1	Pequenas áreas ocasionais de células mononucleares por todo o corte
	2	Leve presença de células mononucleares em 25% do corte
	3	Moderada presença de células mononucleares em 25-50% do corte
	4	Marcada presença de células mononucleares em mais de 50% do corte
Vascularização	0	Normal
	1	Discretamente aumentada em locais focais pelo corte
	2	Leve aumento no número e dilatação dos vasos em locais focais pelo corte
	3	Moderado aumento no número e dilatação dos vasos em até 50% do corte
	4	Marcado aumento no número e dilatação dos vasos em mais de 50% do corte
Hiperplasia íntima	0	Ausente
	1	Vilos com 2-4 camadas de células da íntima no corte
	2	Vilos com 4-5 camadas de células da íntima em 25-50% do corte
	3	Vilos com 4-5 camadas de células da íntima em até 50% do corte
	4	Vilos com 5 ou mais camadas de células da íntima em mais de 50% do corte
Edema Subíntima	0	Sem edema
	1	Discreto edema detectado no corte
	2	Leve edema em até 25% do corte
	3	Moderado edema em 25-50% do corte
	4	Marcado edema em mais de 50% do corte
Fibrose da Subítima	0	Normal
	1	Discreto aumento da fibrose no corte
	2	Leve aumento da fibrose em até 25% do corte
	3	Moderado aumento da fibrose em 25-50% do corte
	4	Marcado aumento da fibrose em mais de 50% do corte

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis dependentes foram descritas de acordo com os fatores grupo (“tratamento”) e tempo (“momento”). Para as variáveis quantitativas, os seguintes parâmetros foram descritos: número de animais (n), mínimo (min), máximo (max), mediana (median), intervalo interquartil (iqr), média (mean), desvio-padrão (sd), erro padrão da média (se), e intervalo de confiança da média (ci). Para as variáveis qualitativas os parâmetros descritos foram: número e frequência de unidades experimentais observadas em cada nível da variável dependente por grupo e tempo.

O software R 3.6.3 e a biblioteca lme4 (Bates, Maechler e Bolker, 2012) foram utilizados na análise de modelo linear com efeitos mistos (e modelo linear generalizado misto), a fim de investigar a relação entre as variáveis dependentes, e os fatores grupo (ozonioterapia e placebo) e tempo (momentos). Os fatores grupo e tempo foram inseridos no modelo como efeitos fixos (com um termo de interação), e o fator animal foi incluído como efeito aleatório. A inspeção dos gráficos quantil-quantil dos resíduos e os teste de Shapiro-wilk e Levene com nível de significância de 5% foram utilizados para avaliar a presença de desvio significativo da normalidade e homocedasticidade. Os valores de *p* foram obtidos por meio do teste de razão de verossimilhança, via ANOVA do modelo completo com e sem o efeito em questão, conforme exemplificado abaixo. Os efeitos principais de grupo, tempo ou interação grupo*tempo, quando presentes, serão detalhados por meio do teste de Tukey. Nos casos em que houve significativo desvio da normalidade e homocedasticidade, a transformação numérica foi utilizada. O teste *t* para amostra independentes foi utilizado para avaliar possíveis diferenças entre as médias dos grupos no *baseline* (M0).

Exemplo de construção de modelos encaixados para a variável FC

Modelo 1: $FC = \alpha + \text{Grupo} * \text{Tempo} + \varepsilon$

Modelo 2: $FC = \alpha + \text{Grupo} + \text{Tempo} + \varepsilon$

Modelo 3: $FC = \alpha + \text{Grupo} + \varepsilon$

Modelo 4: $FC = \alpha + \text{Tempo} + \varepsilon$

Modelo 5: $FC = \alpha + \varepsilon$

Nos casos em que as variáveis dependentes, mesmo após transformação numérica, não atenderam às premissas necessárias, ou apresentaram significativo desbalanceamento (diferenças entre grupos no momento zero), ANCOVA ou modelos não-paramétricos foram utilizados. No atinente à ANCOVA, as medidas obtidas após a intervenção foram utilizadas como variável dependente, e as medidas obtidas no *baseline* (M0), foram inseridas no modelo como covariável, a fim de testar o real efeito do tratamento sobre a variável dependente,

ajustando-se para eventuais diferenças no momento zero. Os resíduos do modelo foram avaliados com relação à possíveis desvios significativos da normalidade e homocedasticidade e observou-se também a homogeneidade dos parâmetros de regressão e dispersão da variável dependente em relação à covariável.

Em algumas variáveis (ex. TAC, TOC), houve significativo desvio das premissas assumidas para a realização do modelo linear misto ou ANCOVA, e portanto, optou-se por testar a diferença entre os “deltas” dos grupos tratado e controle. Isto é, fez-se a comparação das diferenças entre os momentos 48 e 0 para cada tratamento, conforme esquematizado a seguir:

Hipótese nula: $H_0: \Delta_{\text{tratado}} = \Delta_{\text{controle}}$

$$\Delta_{\text{tratado}} = \sum (x_{\text{posT}} - x_{\text{preT}}) / n$$

$$\Delta_{\text{controle}} = \sum (x_{\text{posC}} - x_{\text{preC}}) / n$$

x_{posC} : valor da variável dependente no momento 48, grupo controle.

x_{preC} : valor da variável dependente no momento 0, grupo controle.

x_{posT} : valor da variável dependente no momento 48, grupo tratado.

x_{preT} : valor da variável dependente no momento 0, grupo tratado.

n : número de animais (casos completos).

Nas variáveis em que os modelos ANCOVA ou a comparação dos deltas foi utilizada, as articulações que apresentaram dados faltantes em algum dos momentos foram excluídas da amostra (análise de casos completos ou “listwise deletion”). Nas variáveis analisadas por meio de modelos lineares mistos, apenas os dados faltantes foram desconsiderados, e o restante das observações utilizadas. As observações que apresentaram valores maiores que três intervalos interquartis acima do terceiro quartil ou menor que três intervalos interquartis abaixo do primeiro quartil foram consideradas *outliers* e a análise foi feita com e sem esses valores. O nível de significância adotado foi igual a 5%.

7. RESULTADOS

As 31 articulações dos animais utilizados no presente estudo encontram-se descritas na tabela abaixo, compostas de articulações metacarpofalangeanas (MCF), metatarsofalangeanas (MTF) e tibiotársicas (TT), direita (D) e esquerda (E) (tabela 5).

Tabela 5. Articulações acometidas por OCD dos grupos tratado e controle.

Animais	Articulação	Grupo
1	TTD	TRATADO
2	TTE	TRATADO
3	MTFE	TRATADO
4	MTFE	TRATADO
5	MTFD	TRATADO
6	TTE	TRATADO
7	MTFE	TRATADO
8	TTE	TRATADO
9	TTD	TRATADO
10	MTFE	TRATADO
11	TTE	TRATADO
12	TTE	TRATADO
13	MTFD	TRATADO
14	MTFE	TRATADO
15	MCFD	TRATADO
16	TTD	CONTROLE
17	MTFD	CONTROLE
18	MTFD	CONTROLE
19	MTFE	CONTROLE
20	MTFD	CONTROLE
21	TTD	CONTROLE
22	MTFD	CONTROLE
23	TTD	CONTROLE
24	TTE	CONTROLE
25	MTFE	CONTROLE
26	MTFD	CONTROLE
27	MCFD	CONTROLE
28	MCFD	CONTROLE
29	MTFD	CONTROLE
30	TTE	CONTROLE
31	TTD	CONTROLE

7.1. AVALIAÇÃO FÍSICA

A FC do GT apresentou diminuição em relação ao momento inicial, enquanto no GC houve aumento, não retornando aos valores iniciais até o final do experimento (tabela 6). Na análise do modelo linear misto não houve interação grupo*tempo ($p=0,18$), diferença entre os grupos ($p=0,11$) ou momentos ($p=0,65$).

Tabela 6 - Média e desvio padrão dos valores de FC nos grupos tratado e controle nos momentos 0 a 96h.

Grupo	M0h	M24h	M48h	M72h	M96h
GT	37±5,4	34±5,6	32±6,6	33±5,0	33±3,4
GC	32±7,5	33±3,8	34±5,5	31±4,4	34±4,7

A FR no GT sofreu alterações ao longo do experimento, iniciando e terminando com a mesma média, assim como o GC (tabela 7). Para corrigir a assimetria desta variável utilizou-se transformação logarítmica, revelando na análise de modelo linear misto diferença estatística entre os grupos ($p=0,048$), não havendo diferença entre os momentos ($p=0,677$) e interação grupo*tempo ($p=0,233$).

Tabela 7 - Média e desvio padrão dos valores de FR nos grupos tratado e controle nos momentos 0 a 96h.

Grupo	M0h	M24h	M48h	M72h	M96h
GT	17±3,3	16±4,8†	17±3,0†	19±4,8†	17±4,1†
GC	18±3,9	18±5,4†	21±9,2†	18±3,5†	18±3,9†

Médias seguidas de † apresentam diferença estatística entre os grupos.

Na avaliação do EFD houve aumento dos escores em ambos os grupos com 24h e 48h, seguido de diminuição nos demais momentos, sendo que no GT voltou ao escore inicial e manteve-se pelo menos 1 escore abaixo do GC nos momentos 24h a 72h e 2 escores no momento 96 (tabela 8). Para avaliação estatística agrupou-se o número de animais apresentando o mesmo EFD (tabela 9 e figura 9). Na análise do modelo linear misto houve diferença entre os grupos ($p=0,0024$). O modelo de regressão ordinal permite fazer previsões, sendo que o coeficiente para o grupo tratado é -1,0, podendo-se inferir que o tratamento diminuiu a dor, ou seja, após o tratamento as classificações em escores mais baixos são mais prováveis.

Transformando o coeficiente do modelo linear para obter o *odds ratio* (OR) e mensurar a associação entre o tratamento e o EFD obtemos um OR de 0,4.

Tabela 8 - Média e desvio padrão do EFD nos grupos tratado e controle nos momentos 0 a 96h.

Grupo	M0h	M24h	M48h	M72h	M96h
GT	0±0	2±0,69†	2±0,47†	1±0,45†	0±0,50†
GC	0±0	3±0,79†	3±0,74†	2±1,06†	2±0,88†

Médias seguidas de † apresentam diferença estatística entre os grupos.

Tabela 9 - Quantidade de animais apresentando escores de 0 a 5 nos momentos 0 a 96 horas.

EFD	M0h		M24h		M48h		M72h		M96h	
	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC
0	13	13	0	0	0	0	1	0	8	0
1	0	0	1	1	4	2	10	6	5	7
2	0	0	5	4	9	3	2	2	0	3
3	0	0	7	4	0	5	0	4	0	3
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	4	0	3	0	1	0	0

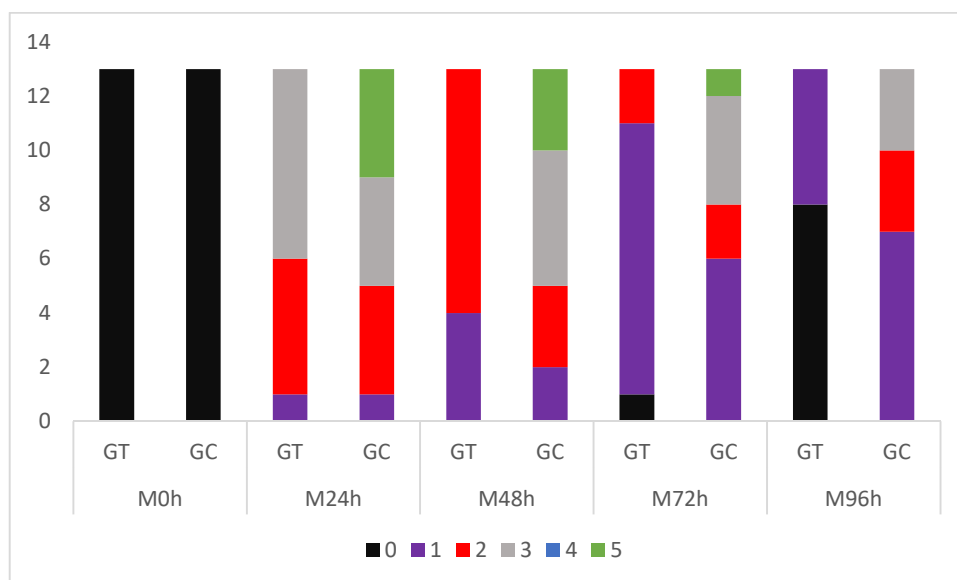


Figura 9 - Quantidade de animais apresentando os escores de 0 a 5 nos momentos 0h a 96h.

Os animais no GT não precisaram de resgates analgésicos contra 5 animais do GC, e no momento 48 horas alguns animais apresentaram sensibilidade a palpação, sendo que no GC houve maior número de animais com sensibilidade do que no GT (8/15 no GC e 3/15 no GT).

Em relação a claudicação, ambos os grupos apresentaram mesma quantidade de animais com claudicação e de intensidade semelhante, os resultados individuais das alturas máximas e mínimas da pelve ou o vetor somatório da cabeça são apresentados na tabela 8. Ao passo nos demais momentos não houve animais apresentando claudicação, estes não foram trotados no pós-operatório pelo risco de deiscência dos pontos.

Tabela 10 - Altura máxima ou mínima da pelve (mm) para claudicações de membro pélvico ou vetor somatório da altura máxima e mínima da cabeça (mm) para claudicações do membro torácico dos animais do GT e GC no momento 0, média e desvio padrão, e também a quantidade de animais apresentando claudicação segundo o software.

	TRATADO CONTROLE	
Animais	M0h	M0h
	0,0	5,5
	5,5	5,8
	4,4	3,8
	0,0	0,0
	9,4	3,0
	2,9	2,6
	1,6	3,7
	1,4	3,3
	1,9	0,0
	4,7	2,1
	3,2	0,0
	1,2	0,0
	1,1	11,3
	3,8	2,4
	1,3	
Média	2,8	3,1
DP	2,5	3,1
Claudicantes	5	5

7.2. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Na avaliação ultrassonográfica a soma dos escores encontrava-se semelhante entre os grupos no momento 0 havendo diminuição de maior magnitude no GT do que no GC, nos momentos 48 e 96h respectivamente (tabela 11 e 12). As principais diferenças ocorreram no ACA e SS, pois como todos apresentavam fragmentos no momento 0h, sendo avaliados com

escore máximo, e nos demais momentos não apresentavam, houve diminuição nos escores. Também se observou alterações consistentes nos escores de ALS, QLS, ACpA, VS e AP. No GT houve retorno aos escores iniciais da avaliação VS com diferença significativa entre os grupos ($p=0,03$), como demonstrado nas tabelas 11 e 12 e na figura 2. Houve efeito principal do tempo, as médias de US nos momentos 48 e 96h foram significativamente menores do que o momento 0 ($p<0,0001$). Não houve efeito da interação grupo*tempo ou efeito do grupo ($p>0,05$).

Tabela 11 - Médias e desvio padrão dos aspectos analisados na ultrassonografia do GT nos diferentes momentos.

MOMENTO	ALS	QLS	ACpA	ALPA	VS	ACA	SS	AP	PO	SOMA
0h	0,41±0,54	1,05±0,55	0,59±0,35	0,23±0,54	1,32±0,47	3,00±0,00	3,00±0,00	0,68±0,86	0,95±0,50	11,11±2,30a
48h	0,36±0,43	1,27±0,51	1,00±0,54	0,23±0,55	1,59±0,57	0,77±0,32	1,45±0,54	0,82±0,97	0,95±0,54	8,29±2,96b
96h	0,54±0,56	1,12±0,62	0,92±0,45	0,30±0,56	1,31±0,43	0,84±0,32	1,58±0,40	0,78±1,01	0,93±0,45	8,31±2,95b

Legenda: aspecto do líquido sinovial (ALS), qualidade do líquido sinovial (QLS), aspecto da cartilagem articular (ACpA), aspecto dos ligamentos periarticulares (ALPA), vascularização e sinovite (VS), aspecto da cartilagem articular (ACA), superfície subcondral (SS), aspecto da plica (AP) e presença de osteófitos (PO). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística entre momentos ($p<0,05$).

Tabela 12 - Médias e desvio padrão dos aspectos analisados na ultrassonografia do GC nos diferentes momentos.

MOMENTO	ALS	QLS	ACpA	ALPA	VS	ACA	SS	AP	PO	SOMA
0h	0,32±0,66	0,95±0,63	0,54±0,56	0,14±0,37	0,95±0,55	3,00±0,00	3,00±0,00	0,77±0,64	0,86±0,65	11,40±2,44a
48h	0,41±0,63	1,36±0,44	0,91±0,56	0,14±0,37	1,86±0,40	0,86±0,35	1,59±0,37	0,95±0,70	0,86±0,69	9,63±2,50b
96h	0,45±0,40	1,41±0,37	0,91±0,58	0,14±0,41	1,64±0,50	0,91±0,40	1,59±0,32	1,05±0,79	0,91±0,69	9,67±2,60b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística entre momentos ($p<0,05$).

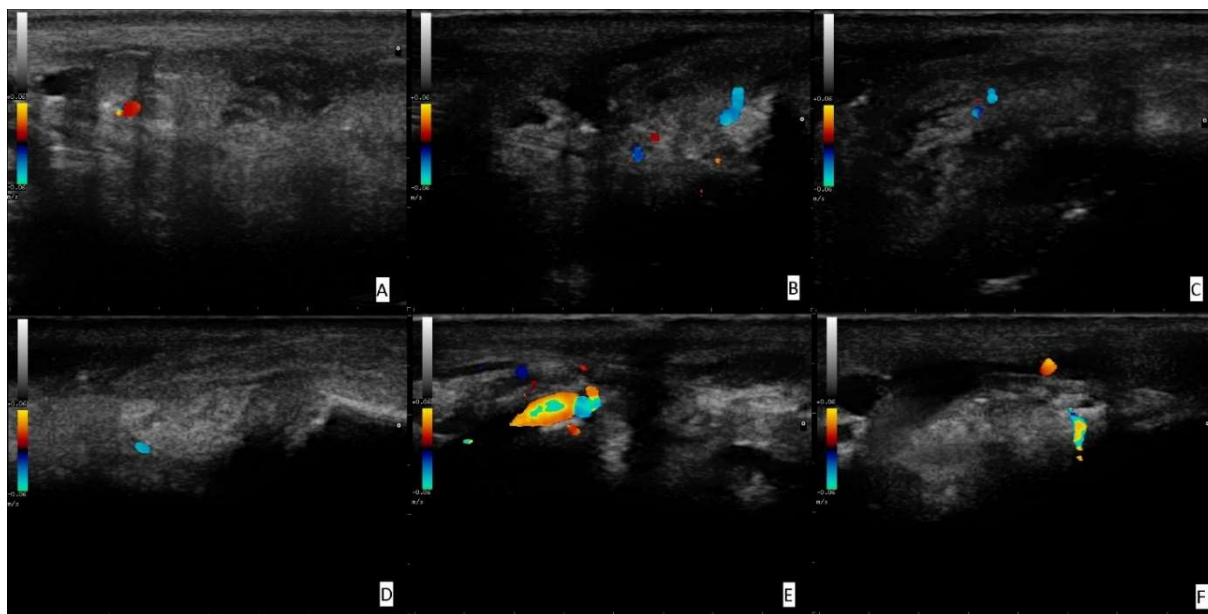


Figura 10 - Imagem ultrassonográfica do doppler realizadas no recesso palmar proximal de um animal do grupo tratado nos momentos 0h (A), 48h (B) e 96h (C) e no grupo controle nos momentos 0h (D), 48h (E) e 96h (F), demonstrando a diferença no sinal de doppler entre os grupos. Proximal a esquerda e distal a direita. São Paulo, 2021.

Quanto a concordância entre os avaliadores nos momentos 0, 48 e 96h houve significativa consistência ($p < 0,001$, para todos os momentos) e não houve concordância absoluta ($p = 0,104$ para o 0h, $p = 0,146$ para o 48h e $p = 0,157$ para o 96h). A inspeção do gráfico de Bland-Altman permite notar que um dos avaliadores avaliou sistematicamente as imagens com escores mais baixos, porém as classificações seguiram os mesmos critérios, pois há concordância na forma como as imagens foram ordenadas. Em resumo, há uma baixa variabilidade das diferenças entre os escores obtidos pelos avaliadores (erro), e uma considerável diferença nos próprios valores (viés).

7.3. ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

Na análise de líquido sinovial as concentrações de IL-1 aumentaram dois grupos com diferença estatística no GC ($p=0,0383$), e sem diferença significativa no delta dos grupos ($p=0,50$), mesmo após a exclusão dos *outliers* ($p=0,28$) (tabela 13).

Tabela 13. Concentração de IL-1 (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE			
	0	48	Delta	0	48	Delta
	12,91	5,55	-7,36	12,44	15,66	3,22
	2,77	8,49	5,72	11,25	9,05	-2,20
	11,25	9,05	-2,20	41,41	115,00	73,59
	14,99	14,99	0,00	20,78	20,78	0,00
	14,99	11,25	-3,74	71,70	68,87	-2,83
	25,72	13,68	-12,04	105,00	224,00	119,00
	17,05	43,62	26,57	20,99	28,57	7,58
	21,47	51,56	30,09	6,19	9,68	3,49
	8,24	18,55	10,32	5,76	5,98	0,22
	6,19	29,39	23,20	5,76	6,64	0,88
	58,76	89,91	31,16	2,33	5,58	3,25
	125,50	224,50	99,00	5,80	5,18	-0,62
				5,79	6,11	0,32
	3,90	5,98	2,08	5,63		
	3,56	4,84	1,28	5,01	5,38	0,37
				4,44	5,38	0,94
MÉDIA	23,38	37,95	14,58	20,64a	35,45b	13,81
DP	32,64	58,75	28,16	28,83	60,47	34,66

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p<0,05$).

A IL-6 aumentou em relação ao M0 em ambos os grupos, sendo maior no GC, porém sem diferença significativa ($p=0,081$), mas após exclusão dos *outliers* o delta do GT foi significativamente menor ($p=0,03$), assim como houve diferença entre os momentos dentro dos grupos (GT $p=0,0013$ e GC $p=0,0007$) (tabela 14).

Tabela 14. Concentração de IL-6 (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE			
0	48	Delta	0	48	Delta	
5,31	62,28	56,97	9,50	48,67	39,17	
3,39	37,13	33,74	7,55	79,43	71,88	
8,33	21,10	12,77	9,15	1008,00	998,85	
6,79	103,00	96,21	9,15	318,00	308,85	
			9,15	331,00	321,85	
12,71	7,55	-5,16	10,29	46,69	36,40	
8,33	38,76	30,43	5,00	391,00	386,00	
5,15	8,79	3,64	4,48	13,93	9,46	
3,91	158,00	154,10	17,70	20,67	2,97	
5,75	20,85	15,10	7,79	34,51	26,72	
9,34	11,85	2,52	3,12	235,50	232,39	
7,91	25,81	17,91	8,22	9,36	1,15	
5,01	76,78	71,77	7,26	45,27	38,01	
7,37	12,53	5,17	8,13			
5,16	21,55	16,39	16,57	396,50	379,93	
			6,60	283,50	276,91	
MÉDIA	6,75a	43,28b	36,54†	8,73a	217,47b	208,70†
DP	2,47	43,36	44,57	3,82	264,32	264,26

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p<0,05$).

Médias seguidas de † apresentam diferença estatística entre os grupos.

A IL-4 também aumentou em ambos os grupos sendo maior no GT, com diferença significativa entre os momentos (GT $p=0,0038$ e GC $p=0,0445$) e sem diferença estatística no delta dos grupos, mesmo após exclusão dos *outliers* ($p=0,22$) (tabela 15).

Tabela 15. Concentração de IL-4 (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE		
0	48	Delta	0	48	Delta
7,17	9,88	2,71	30,97	30,97	0,00
10,38	11,62	1,25	25,81	24,80	-1,01
29,92	18,90	-11,02	41,74	60,02	18,28
30,97	30,97	0,00	28,89	39,54	10,65
28,89	35,21	6,32	61,21	55,34	-5,87
39,54	53,03	13,49	54,52	100,26	45,74
37,36	63,58	26,22	18,44	18,78	0,35
35,94	60,80	24,87	4,72	6,17	1,45
21,46	38,32	16,86	7,17	30,63	23,46
8,71	13,95	5,24	9,29	48,16	38,87
86,37	128,00	41,63	13,32	18,50	5,18
46,57	70,69	24,12	32,79	25,72	-7,07
			26,43	31,26	4,83
29,91	43,65	13,74	19,26		
27,82	29,22	1,40	23,73	30,63	6,91
			22,40	22,39	-0,01
MÉDIA	31,50a	43,41b	11,91	26,29a	36,21b
DP	19,69	31,32	13,83	15,81	22,76
					9,45
					15,69

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p<0,05$).

A IL-10 aumentou significativamente em relação ao M0 em ambos os grupos, com concentrações maiores no GT ($p=0,0041$ e GC $p=0,0214$), porém não houve diferença significativa no delta ($p=0,67$), mesmo após a exclusão dos *outliers* (tabela 16).

Tabela 16. Concentração de IL-10 (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE		
0	48	Delta	0	48	Delta
421,50	167,50	-254,00	118,00	311,00	193,00
19,65	72,46	52,81	46,29	59,47	13,18
38,98	42,17	3,19	27,15	87,41	60,26
37,41	70,86	33,45	53,17	55,84	2,67
37,41	118,00	80,59	58,56	89,26	30,70
77,83	25,78	-52,05	147,00	783,50	636,50
32,87	82,96	50,09	19,00	45,83	26,84
27,67	159,00	131,33	21,01	20,19	-0,82
41,03	421,50	380,47	14,78	54,15	39,37
28,05	52,85	24,80	34,17	61,76	27,59
66,82	78,61	11,79	61,70	170,50	108,81
39,24	154,50	115,26	75,53	59,02	-16,52
36,50	1439,50	1403,00	52,37	48,45	-3,92
42,44	107,00	64,56	56,26		
34,41	87,93	53,52	65,31	152,00	86,70
			51,47	142,00	90,53
MÉDIA	65,45a	205,37b	139,92	56,36a	142,69b
DP	99,57	354,16	372,06	34,99	191,77
					161,74

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p<0,05$).

O TNF- α aumentou nos GT ($p=0,0058$) e diminuiu no GC ($p=0,7536$), após a remoção dos *outliers*, havendo diferença no delta dos grupos ($p=0,01$) (tabela 17).

Tabela 17. Concentração de TNF- α (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE			
0	48	Delta	0	48	Delta	
1,97	1,09	-0,89	4,83	3,11	-1,72	
0,57	1,64	1,08	4,83	1,82	-3,01	
5,16	4,20	-0,96	4,20			
3,63	4,83	1,20	4,20	6,25	2,05	
4,83	6,25	1,42	4,83	4,83	0,00	
2,01	3,63	1,62	4,94			
3,63	7,89	4,26	2,28	1,95	-0,33	
1,07	2,75	1,68	1,27	1,41	0,15	
1,20	1,63	0,43	1,14	1,99	0,85	
1,06	1,20	0,14	1,20	2,54	1,34	
3,19	5,96	2,78	2,34	1,20	-1,14	
2,32	4,32	2,00	1,77	1,99	0,22	
1,48			1,85	2,15	0,30	
1,88	2,29	0,41	1,95			
1,62	2,24	0,62	3,19	1,62	-1,57	
			1,86	1,52	-0,34	
MÉDIA	2,37a	3,56b	1,13†	2,92	2,49	-0,25†
DP	1,40	2,10	1,37	1,47	1,47	1,36

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p<0,05$).

Médias seguidas de † apresentam diferença estatística entre os grupos.

A concentração de PGE₂ diminuiu com 48h no GT (p=0,95) enquanto aumentou no GC (p=0,003). Utilizou-se transformação logarítmica para corrigir a assimetria da variável (tabela 18). A análise do modelo linear misto revelou que houve diferença entre os grupos (p=0,004) e momentos (p=0,028).

Tabela 18. Concentração de PGE₂ (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.

TRATADO			CONTROLE			
0	48	Delta	0	48	Delta	
39,03	84,33	45,31	19,44	84,49	65,06	
34,11	45,81	11,70	34,08	35,19	1,10	
187,93	195,02	7,09	34,35	447,90	413,55	
55,43	141,91	86,47	134,23	246,37	112,14	
49,83	175,67	125,84	49,82	149,32	99,50	
58,64	50,29	-8,35	45,61	45,28	-0,33	
274,25	110,84	-163,41	93,04	265,22	172,18	
195,10	67,00	-128,10	53,30	85,00	31,70	
98,05	58,49	-39,56	85,00	35,52	-49,47	
	18,96	18,96	36,05	73,77	37,72	
62,63		-62,63	63,08	183,40	120,32	
33,38	40,24	6,86	24,16	55,54	31,38	
259,41	95,26	-164,15	25,03	33,16	8,13	
22,27	21,78	-0,48	22,21		-22,21	
68,73	47,56	-21,18	143,98	176,76	32,78	
			28,77	122,27	93,50	
MÉDIA	102,77	82,37	-19,04†	55,76a	135,94b	71,69†
DP	87,52	55,31	83,06	39,00	114,98	108,28

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo (p<0,05).

Médias seguidas de † apresentam diferença estatística entre os grupos.

A substância P por sua vez aumentou em ambos os grupos de forma semelhante (tabela 19). Utilizou-se a transformação logarítmica para corrigir a assimetria na variável. Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$), havendo apenas diferença entre os momentos ($p<0,0001$).

Tabela 19 - Concentração de substância P (pg/ml) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE			
0	48	Delta	0	48	Delta	
21,31	48,77	27,46	14,25	45,30	31,05	
21,64	56,49	34,85	52,32	42,02	-10,30	
19,07	32,68	13,61	15,88	50,70	34,82	
23,47	92,57	69,10	16,25	62,42	46,17	
15,80	38,93	23,13	7,87	61,45	53,58	
20,74	29,38	8,64	62,57	102,18	39,61	
15,60	35,28	19,68	35,84	30,51	-5,33	
12,09	18,28	6,19	4,75	22,79	18,04	
13,88	42,18	28,30	11,37	13,97	2,60	
8,24	33,18	24,94	25,51	12,75	-12,76	
16,25	18,26	2,01	11,63	62,83	51,20	
12,45	16,25	3,80	8,64	20,20	11,57	
6,58	44,31	37,73	8,55	25,46	16,91	
8,70	13,85	5,15	11,60			
9,11	24,79	15,68	15,15	41,05	25,90	
			22,69	42,17	19,49	
MÉDIA	15,00a	36,35b	21,35	20,30a	42,39b	21,50
DP	5,44	19,99	17,45	16,51	23,64	21,60

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p<0,05$).

A concentração de CS aumentou com 48h em ambos os grupos, sendo maior no GC ($p=0,0023$ e GT $p=0,0007$), porém não se observou diferença significativa entre os grupos ($p=0,094$) (tabela 20).

Tabela 20. Concentração de CS ($\mu\text{g/ml}$) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE		
0	48	Delta	0	48	Delta
72,05	206,28	134,23	48,15	142,17	94,02
47,51	260,33	212,82	34,03	323,12	289,09
58,52	19,91	-38,60	78,65	231,50	152,86
66,07	173,71	107,64	43,64	79,99	36,35
38,42	108,44	70,01	44,42	217,32	172,90
67,99	163,49	95,51	100,55	412,41	311,86
73,43	51,95	-21,48	28,51	111,82	83,31
51,05	63,34	12,30	19,20	46,01	26,81
47,72	210,22	162,50	58,89	495,39	436,50
67,03	92,49	25,46	105,11	383,53	278,42
66,90	308,46	241,56	45,78	202,02	156,24
55,29	285,75	230,46	28,65	298,63	269,98
38,81	210,46	171,64	151,09	304,74	153,65
44,82	295,30	250,49	58,05		
74,62	385,95	311,33	74,74	499,15	424,41
			140,57	496,20	355,63
MÉDIA	58,01a	189,07b	131,06	66,25a	282,93b
DP	12,63	106,86	107,25	39,65	152,71
				152,71	132,76

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p<0,05$).

Houve diminuição na concentração de ácido hialurônico com 48h nos dois grupos, não sendo significativa entre os grupos ($p=0,56$) e momentos ($p>0,05$) (tabela 21). Já seu peso molecular diminuiu nos dois grupos sendo mais acentuada no GC ($p=0,0248$ e GT $p=0,0362$), porém sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,56$) (tabela 22).

Tabela 21. Concentração de AH ($\mu\text{g/ml}$) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE		
0	48	Delta	0	48	Delta
212,32	272,42	60,10	430,36	289,33	-141,03
416,55	353,47	-63,08	285,62	472,85	187,23
515,98	460,17	-55,81	592,63	645,14	52,52
443,70	444,77	1,07	659,29	643,89	-15,40
461,56	337,12	-124,44	376,90	381,86	4,95
232,49	452,99	220,50	328,27	404,52	76,25
366,06	333,59	-32,47	383,15	500,03	116,89
476,76	476,64	-0,12	217,35	151,48	-65,87
550,35	443,97	-106,38	478,91	264,19	-214,72
431,21	487,87	56,67	443,32	506,65	63,33
454,28	429,17	-25,10	262,55	272,70	10,15
554,89	363,01	-191,88	213,52	464,12	250,60
464,26	686,69	222,43	401,02	419,55	18,54
154,06	237,21	83,16	326,98		
355,53	265,41	-90,12	368,40	149,10	-219,30
			411,52	195,53	-215,99
MÉDIA	406,00	402,97	386,24	384,06	-6,12
DP	121,40	113,28	121,89	160,52	143,76

Tabela 22 – Peso molecular do AH (KDa) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE			
0	48	Delta	0	48	Delta	
3643	3972	328	3188	2894	-294	
3861	3724	-137	3691	4089	397	
1932	1874	-58	5031	3950	-1081	
5552	5401	-151	2092	1833	-259	
5353	3670	-1684	4220	3093	-1127	
5131	5115	-16	3659	3643	-16	
2523	2564	41	3953	4049	96	
4089	3991	-98	6807	7000	193	
4723	2877	-1845	4400	1363	-3037	
6766	6667	-99	3870	2195	-1675	
4069	4150	81	6956	6891	-65	
4129	3707	-422	3076	2655	-421	
7310	6398	-912	2679	1995	-684	
4340	4870	530	4340			
3908	3192	-716	3073	3255	182	
			3224	1346	-1878	
MÉDIA	4488,63a	4144,80b	-343,83	4016,11a	3350,01b	-644,51
DP	1409,83	1344,43	678,79	1331,39	1722,60	956,36

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p < 0,05$).

As contagens celulares aumentaram em ambos os grupos e em maior proporção no GC, porém após exclusão dos *outliers* não houve diferença entre o delta dos grupos tratado e controle ($p=0,135$), apenas diferença entre os momentos dentro dos grupos (GT e GC $p=0,0007$) (tabela 23).

Tabela 23. Contagem celular (cél/ μ l) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE			
0	48	Delta	0	48	Delta	
200	3250	3050	70	14070	14000	
305	6375	6070	1900	9000	7100	
953	9100	8147	408	7650	7242	
325	2450	2125	670	2200	1530	
138	6060	5922	248	7400	7152	
65	3500	3435	40	11100	11060	
25	1600	1575	1900	17125	15225	
500	6700	6200	258	4050	3792	
30	22000	21970	60	3609	3549	
175	3000	2825	335	2633	2298	
95	10100	10005	225	116450	116225	
110	20200	20090	595	116450	115855	
248	9300	9052	190	9870	9680	
855	6860	6005	63			
268	4480	4212	75	18600	18525	
			155	13350	13195	
MÉDIA	286,13a	7665,00b	7378,87	449,50a	23570,47b	23095,20
DP	281,54	6046,40	6084,06	595,95	38040,60	38059,65

Na contagem diferencial houve aumento na quantidade de polimorfonucleares nos dois grupos ($p < 0,05$), sem diferença significativa ($p = 0,725$) (tabela 24).

Tabela 24 - Porcentagem de polimorfonucleares no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE			
	0	48	Delta	0	48	Delta
	7	70	63	4	76	72
	5	85	80	35	65	30
	11	26	15	5	70	65
	10	80	70	8	25	17
	4	27	23	5	30	25
	3	55	52	4	90	86
	3	35	32	10	33	23
	4	46	42	8	20	12
	4	80	76	6	45	39
	10	12	2	2	15	13
	5	67	62	11	83	72
	8	76	68	5	30	25
	4	27	23	3	26	23
	2	34	32	2		
	4	24	20	8	58	50
				10	56	46
Média	5,6a	49,6b	44,0	7,9a	48,1b	39,9
DP	2,9	24,9	24,9	7,8	24,6	24,0

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p < 0,05$).

A proteína do LS aumentou significativamente nos dois grupos de forma semelhante (GT $p=0,0009$ e GC $p=0,0023$), não havendo diferença estatística entre os grupos ($p=0,89$) (tabela 25).

Tabela 25- Concentração de proteína (g/dl) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE		
0	48	Delta	0	48	Delta
1,27	2,39	1,12	0,81	2,51	1,7
1,11	2,26	1,15	4,08	2,99	-1,09
1,05	2,15	1,1	0,46	2,75	2,29
0,61	2,59	1,98	0,53	1,72	1,19
0,65	2,23	1,58	0,95	2,33	1,38
2,02	1,32	-0,7	2	4,28	2,28
1,01	2,59	1,58	1,42	1,76	0,34
1,04	1,92	0,88	0,42	1,26	0,84
1,07	3,49	2,42	0,68	1,44	0,76
0,68	1,7	1,02	1,27	1,99	0,72
1,11	2,63	1,52	0,47	4,29	3,82
1,27	3,28	2,01	0,56	2,18	1,62
0,52	3,04	2,52	0,58	1,17	0,59
0,57	2,23	1,66	0,91		-0,91
0,68	2,16	1,48	0,93	3,15	2,22
			1,95	3,88	1,93
Média	1,0a	2,4b	1,1a	2,5b	1,2
DP	0,4	0,6	0,9	1,0	1,2

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre momentos do mesmo grupo ($p<0,05$).

Apesar da diminuição na concentração de ureia entre 0 e 48h, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,771$) e momentos (tabela 26).

Tabela 26- Concentração de uréia (mg/dl) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48h.

TRATADO			CONTROLE			
	0	48	Delta	0	48	Delta
	35,2	39,4	4,2	41,3	40,8	-0,5
	36,9	38,3	1,4	30,4	31,5	1,1
	47,9	45,1	-2,8	37,7	30,2	-7,5
	33,8	36,5	2,7	36,7	16,4	-20,3
	30,4	29,3	-1,1	27,5	27,8	0,3
	40,9	39	-1,9	32,5	35,3	2,8
	29,3	24,1	-5,2	35,2	40,1	4,9
	31,2	29,2	-2	35,1	31	-4,1
	30,4	32,9	2,5	33,8	37,3	3,5
	37,6	38,3	0,7	37,7	37,4	-0,3
	37,2	37,8	0,6	50,5	56,6	6,1
	39,8	37,6	-2,2	28,2	26,1	-2,1
	44,4	38,5	-5,9	36,1	40,5	4,4
	39,8	43,1	3,3	49,2		
	29,5	26,3	-3,2	31,3	30,8	-0,5
				35,1	36,1	1
Média	36,3	35,7	-0,6	36,1	34,5	-0,7
DP	5,7	6,0	3,1	6,5	8,9	6,5

7.4. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

A concentração de TAC aumentou com 48h nos dois grupos (GT $p=0,0066$ e GC $p=0,0438$), de mesma magnitude, não havendo diferença significativa no delta dos grupos ($p=0,88$) (tabela 27). Já a concentração de TOC aumentou em ambos os grupos, maior no GT ($p=0,0049$), porém sem diferença significativa no delta dos grupos ($p=0,38$) (tabela 28). As concentrações de MDA foram semelhantes no GT, com aumento no GC sem diferença estatística ($p=0,0775$), sem diferença estatística no delta dos grupos ($p=0,078$) (tabela 29).

Tabela 27- Capacidade antioxidante total ($\mu\text{mol/l}$) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.

TRATADO			CONTROLE		
0	48	Delta	0	48	Delta
0,02	0,30	0,28	0,00	0,21	0,21
0,00	0,23	0,23	0,00	0,00	0,00
0,00	0,29	0,29	0,00	0,00	0,00
0,00	0,18	0,18	0,00		0,00
0,00	0,23	0,23	0,00	0,38	0,38
0,10	0,08	-0,02	0,19	0,00	-0,19
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,09	0,09	0,00	0,01	0,01
0,07	0,26	0,19	0,03	0,25	0,22
0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,17
0,02	0,15	0,13	0,02	0,15	0,13
0,00	0,02	0,02	0,00	0,30	0,30
0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,13
0,00	0,00	0,00	0,00		
0,00	0,19	0,19			
MÉDIA	0,01a	0,13b	0,12	0,02a	0,13b
DP	0,03	0,11	0,11	0,05	0,13
					0,15

Médias seguidas de letras apresentam diferença estatística entre os momentos do mesmo grupo ($p < 0,05$)

Tabela 28 – Capacidade oxidante total ($\mu\text{mol/L}$) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.

TRATADO			CONTROLE		
0	48	Delta	0	48	Delta
2,05	130,91	128,86	1,16	154,75	153,59
0,00	134,94	134,94	132,61	136,29	3,68
0,00	142,84	142,84	0,00	54,51	54,51
1,45	110,20	108,75	0,00		
0,00	136,63	136,63	3,93	151,23	147,30
119,01	0,00	-119,01	142,21	142,68	0,47
0,00	20,70	20,70	64,83	38,11	-26,72
42,49	107,86	65,37	0,00	48,69	48,69
0,00	97,56	97,56	98,58	43,13	-55,45
3,33	0,00	-3,33	43,37	119,10	75,73
3,14	134,96	131,82	0,00	153,38	153,38
86,63	105,82	19,19	0,00	56,00	56,00
0,00	142,34	142,34	0,00	27,22	27,22
14,13	105,70	91,57	5,78		
7,06	81,16	74,10			
MÉDIA	18,62a	96,77b	78,16	35,18a	93,76b
DP	36,40	50,07	72,88	52,87	52,66
					69,81

Médias seguidas de letras apresentam diferença estatística entre os momentos do mesmo grupo ($p < 0,05$)

Tabela 29 – Concentração de malonaldeído ($\mu\text{mol/L}$) no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.

TRATADO			CONTROLE			
0	48	Delta	0	48	Delta	
7,71	9,36	1,66	7,43	15,17	7,74	
10,47	19,32	8,85	12,96	35,36	22,40	
10,19	6,60	-3,59	9,09	7,71	-1,38	
6,60	20,98	14,38	6,88			
12,96	15,17	2,21	8,81	14,62	5,81	
14,06	14,86	0,80	35,91	9,36	-26,54	
9,64	7,15	-2,49	11,85	18,77	6,91	
9,92	6,05	-3,87	8,53	11,02	2,49	
12,41	10,47	-1,94	4,94	7,71	2,77	
10,19	9,64	-0,55	6,60	12,96	6,36	
15,17	17,11	1,94	11,85	11,58	-0,28	
19,32	12,13	-7,19	6,88	18,49	11,61	
9,36	11,85	2,49	7,98	8,26	0,28	
8,26	9,92	1,66	12,41			
12,96	7,43	-5,53				
MÉDIA	11,28	11,87	0,59	10,87	14,25	3,18
DP	3,27	4,68	5,49	7,62	7,68	11,35

O índice de ativação dos monócitos aumentou nos dois grupos, com delta maior no GC ($p=0,0248$), porém sem diferença significativa ($p=0,77$) (tabela 30). O índice de ativação de neutrófilos aumentou significativamente em ambos os grupos em relação ao momento 0 (GT $p=0,0016$ e GC $p=0,0023$), com delta semelhante entre os grupos, sem diferença estatística ($p=0,70$) (tabela 31).

Tabela 30 – Índice de ativação dos monócitos no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.

TRATADO			CONTROLE		
0	48	Delta	0	48	Delta
1,81	2,78	0,97	4,92	1,37	-3,56
1,43	3,22	1,79	1,59	5,93	4,34
2,61	1,73	-0,89	1,57	0,96	-0,61
1,70	2,24	0,53	2,10	1,04	-1,06
1,51	1,75	0,24	0,54	1,91	1,37
1,18	2,38	1,20	2,11	6,79	4,68
1,29	2,47	1,18	3,00	2,45	-0,55
1,46	1,14	-0,32	2,07	1,28	-0,80
1,58	2,92	1,34	1,33	1,11	-0,23
1,64	1,61	-0,03	1,23	1,64	0,41
2,27	3,85	1,58	1,77	7,57	5,80
1,39	6,08	4,69	2,10	1,99	-0,11
1,96	4,22	2,26	1,00	1,20	0,20
1,88	1,78	-0,10	1,49		
2,66	2,02	-0,64	1,47	11,77	10,30
			1,46	4,89	3,44
Média	1,76	2,68	0,92	1,86a	3,46b
DP	0,45	1,27	1,40	0,99	3,23
					3,51

Médias seguidas de letras apresentam diferença estatística entre os momentos do mesmo grupo ($p < 0,05$)

Tabela 31- Índice de ativação dos neutrófilos no LS dos grupos tratado e controle das diferentes articulações nos momentos 0 e 48.

TRATADO			CONTROLE			
0	48	Delta	0	48	Delta	
10,16	27,50	17,34	5,83	2,22	-3,61	
4,03	26,15	22,12	6,97	7,93	0,97	
2,41	4,23	1,82	0,62	2,47	1,85	
9,80	18,43	8,63	2,14	4,58	2,44	
1,53	12,25	10,72	0,42	12,22	11,80	
1,40	6,03	4,63	0,79	37,91	37,12	
1,02	9,02	8,00	5,47	9,02	3,55	
2,33	3,63	1,29	1,68	8,59	6,91	
0,90	19,34	18,44	0,74	8,08	7,34	
11,27	9,32	-1,96	3,77	8,02	4,25	
3,39	24,38	20,99	1,43	28,28	26,85	
2,49	33,30	30,81	1,51	15,66	14,16	
2,26	27,61	25,35	0,97	1,89	0,92	
1,35	11,22	9,87	1,42			
1,43	2,67		1,55	40,85	39,30	
			1,59	25,17	23,58	
Média	3,72a	15,67b	12,72	2,31a	14,19b	11,83
DP	3,58	10,19	9,92	2,05	12,80	13,62

Médias seguidas de letras apresentam diferença estatística entre os momentos do mesmo grupo ($p < 0,05$)

7.5. ANÁLISE DA MEMBRANA SINOVIAL

No momento M0, tanto no GC como no GT, observamos aumento na quantidade e volume das vilosidades, com a presença de várias camadas de sinoviócitos (animais que apresentaram 2, 3 e 4 camadas). Em algumas vilosidades observou-se aumento da espessura na sua extremidade, eram áreas com proliferação acentuada da membrana, revestida por uma camada hiperplásica de sinoviócitos. Dentro das vilosidades haviam vários vasos com diferentes calibres e células inflamatórias ao redor. Na base das vilosidades foi observada uma camada maior de tecido conjuntivo frouxo que foi substituído por tecido de granulação (conjuntivo fibroso proliferado e proliferação vascular), com presença de células inflamatórias, distribuídas difusamente ou em focos disseminados. Em outras regiões, os vilos eram delgados, com no máximo duas camadas de sinoviócitos morfológicamente bem caracterizados, revestindo tecido conjuntivo denso com poucas células inflamatórias, a maioria com distribuição perivascular.

Em ambos os grupos o M1 apresentou características semelhantes ao M0, com aumento discreto no edema e nas células inflamatórias difusas no tecido e perivascular. No M2 do GC, observou-se vasos dilatados (aumento de 0,91 no escore), com hipertrofia da membrana sinovial, aumento da camada de sinoviócitos (aumento de 1 no escore), acompanhada de edema difuso na membrana sinovial em relação ao M0, sendo que a inflamação se manteve constante em relação ao M1. Já no M2 do GT, observou-se vasos dilatados em relação ao M0, células inflamatórias difusas e perivascular semelhantes ao M0, aumento no edema difuso no tecido em relação ao M0 e M1, sendo que a hipertrofia teve discreto aumento em relação ao M0 e diminuição em relação ao M1. Conforme demonstrado nas tabelas e imagens abaixo (tabelas 32 e 33).

Tabela 32 - Média e desvio padrão da avaliação histológica da membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2 no GT.

MOMENTO	INF	VAS	HIP	EDE	FIB	SOMA
0	2,80±0,94	3,07±0,96	1,93±0,88	2,60±0,74	3,40±0,73	13,80±2,93a
1	2,60±0,91	3,07±0,80	2,33±0,90	2,73±0,80	3,40±0,74	14,13±2,72a
2	2,87±0,83	3,60±0,63	2,27±1,03	2,93±0,88	3,40±0,74	15,07±2,81b

Legenda: Infiltrado de células (INF), vascularização (VAS), hiperplasia íntima (HIP), edema subíntima (EDE), fibrose da subíntima (FIB). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística entre momentos ($p < 0,05$).

Tabela 33 - Média e desvio padrão da avaliação histológica da membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2 no GC.

MOMENTO	INF	VAS	HIP	EDE	FIB	SOMA
0	2,36±0,60	2,91±0,62	2,09±0,77	2,73±0,63	3,55±0,73	13,64±1,96a
1	2,73±0,63	3,45±0,63	2,45±0,89	2,82±0,73	3,55±0,60	15,00±2,21a
2	2,73±0,73	3,82±0,60	3,09±1,15	3,18±1,09	3,55±0,62	16,40±3,00b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística entre momentos ($p < 0,05$).

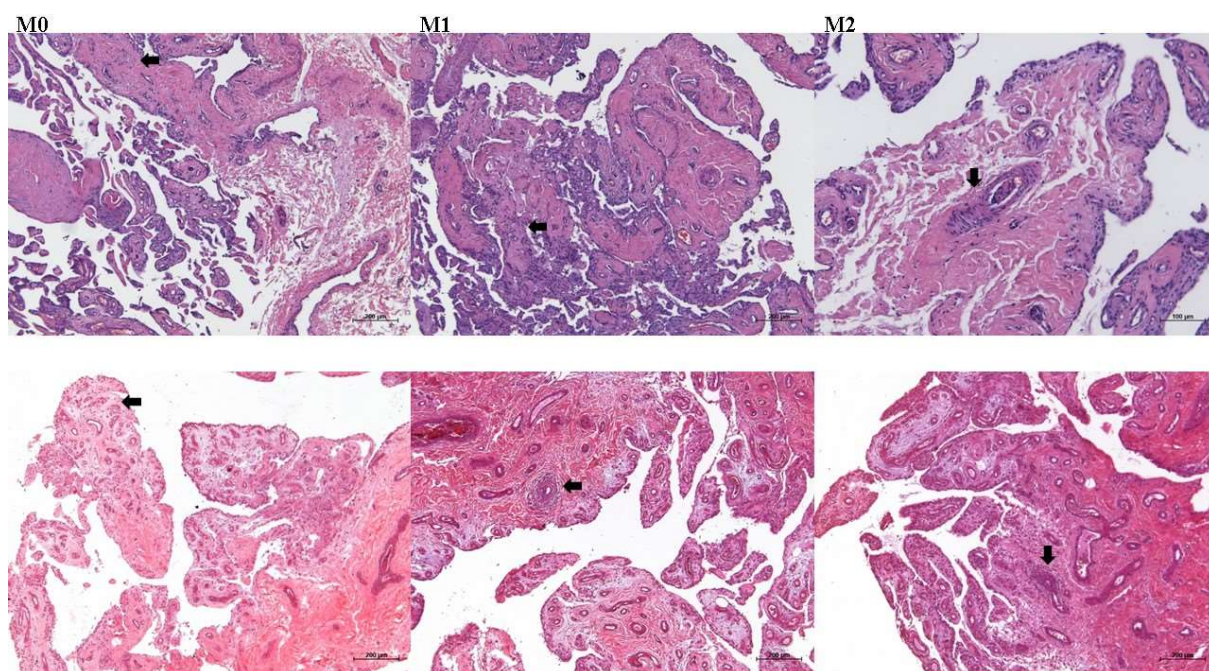


Figura 11 - Figura histológica corada em HE demonstrando a inflamação na membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2, GT acima e GC abaixo. Seta preta marcando células inflamatórias na membrana sinovial.

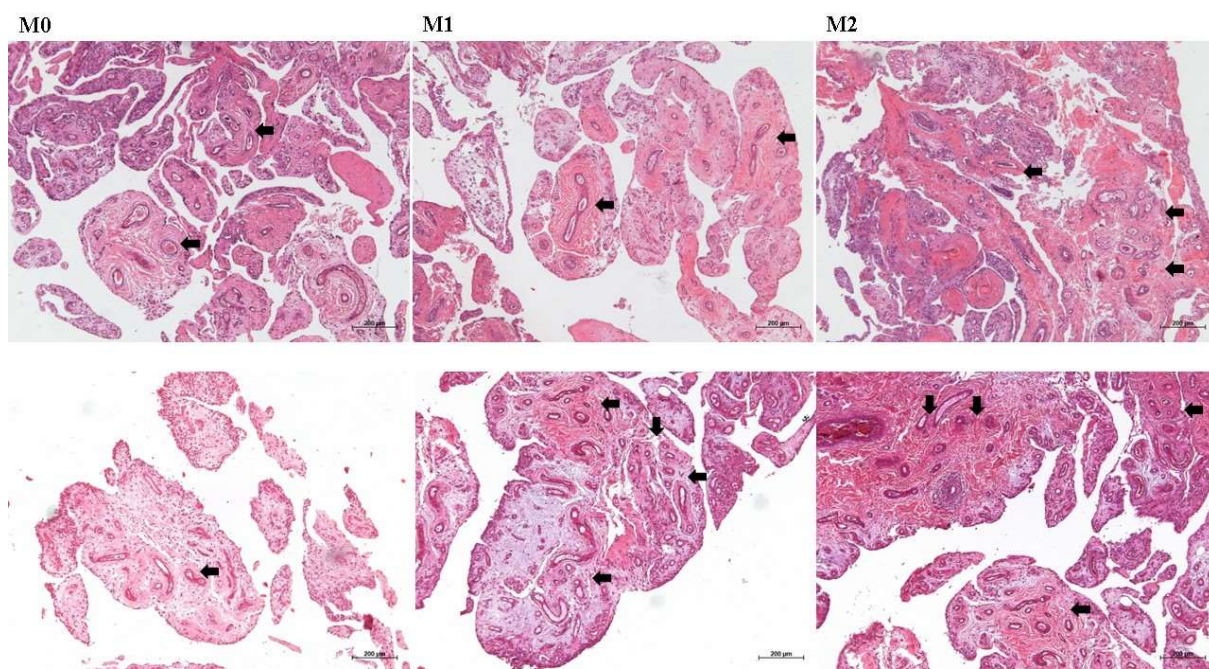


Figura 12 - Figura histológica corada em HE demonstrando o aumento da vascularização na membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2, GT acima e GC abaixo. Seta preta marcando vasos na membrana sinovial.

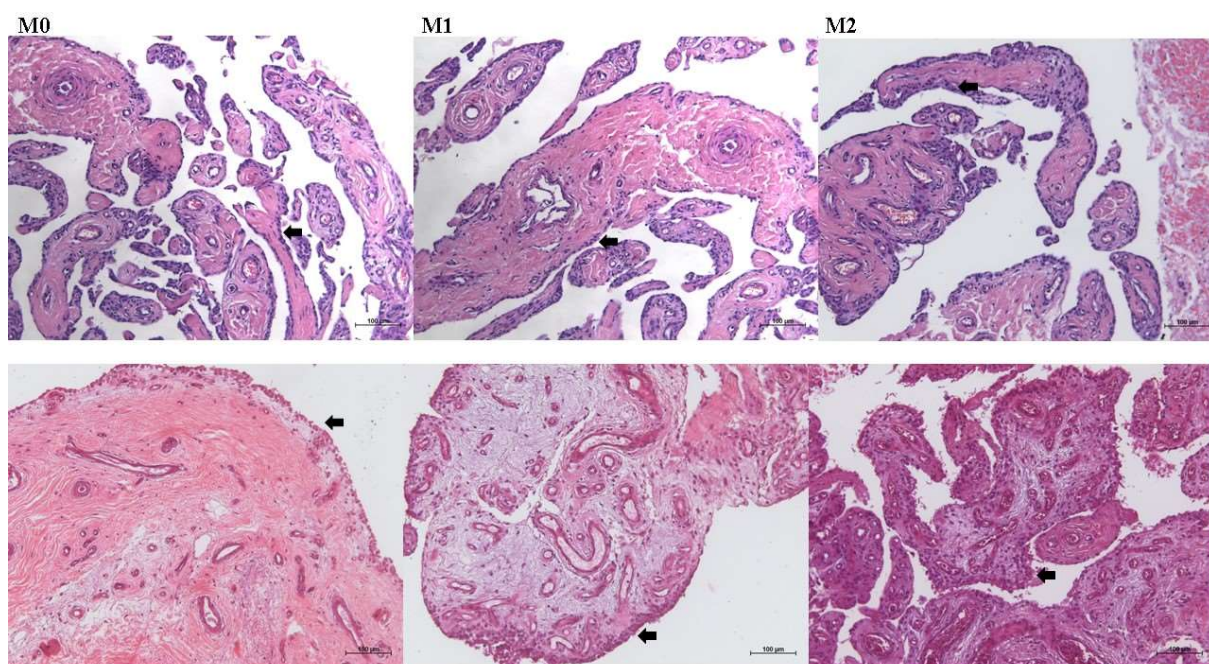


Figura 13 - Figura histológica corada em HE demonstrando o aumento no número de sinoviócitos da camada íntima da membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2, GT acima e GC abaixo. Seta preta marcando as camadas de sinoviócitos na membrana sinovial.

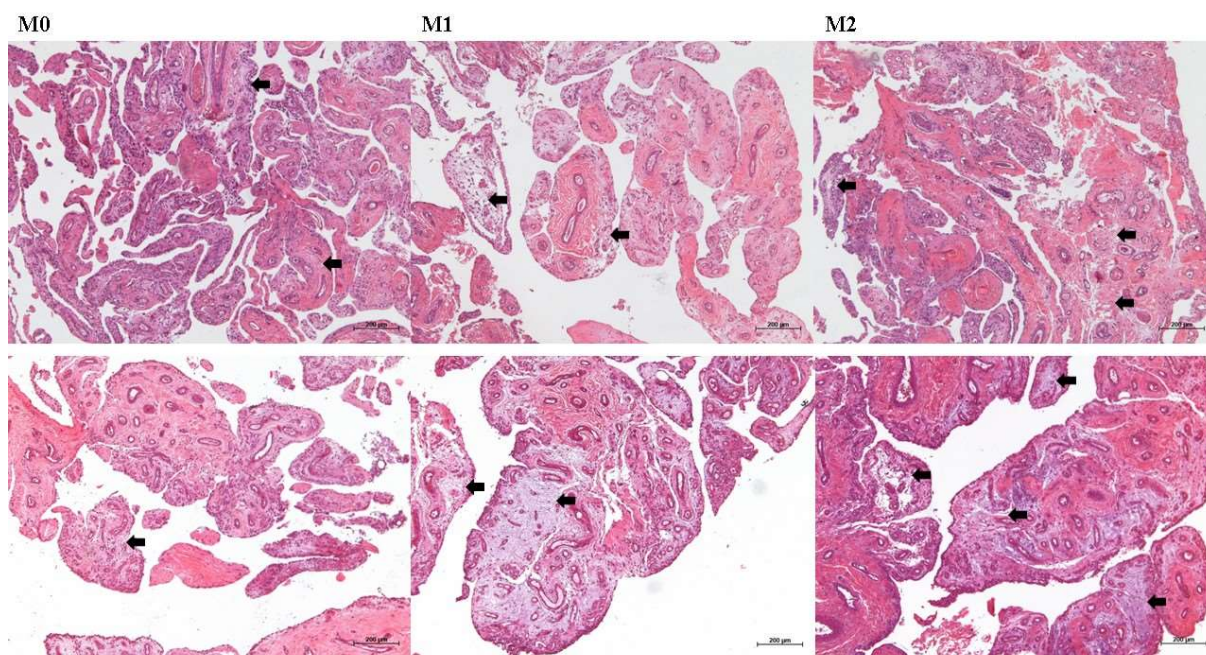


Figura 14 - Figura histológica corada em HE demonstrando o aumento do edema na membrana sinovial nos momentos 0, 1 e 2, GT acima e GC abaixo. Seta preta marcando áreas de edema na membrana sinovial, representadas pelo aumento de espaço entre as fibras e células no tecido.

Na análise do modelo linear misto não houve diferença entre os grupos ($p=0,974$), havendo diferença entre os momentos 0 e 2 ($p=0,0006$). Na análise das variáveis em separado não houve diferença entre os grupos e momentos ($p>0,05$).

8. DISCUSSÃO

Não existe ainda na literatura atual estudos que envolvam a ozonioterapia como opção de tratamento de alterações articulares de equinos, sendo que o único na literatura abordou somente a segurança da técnica em articulações sinoviais híginas (VENDRUSCOLO et al., 2018). Em equinos os protocolos utilizados para afecções articulares são retirados de artigos em humanos e animais de laboratório relacionados a OA, capsulite, sinovite; agudos ou crônicos (CHANG et al., 2005; CARDELLI et al., 2008; YU et al., 2010; MAWSOUF et al., 2011; MISHRA et al., 2011; CALUNGA et al., 2012; DAIF, 2012; CHEN et al., 2013; VAILLANT et al., 2013; CAMELIA et al., 2014; LOPES DE JESUS et al., 2017b).

As articulações acometidas por OCD utilizadas no experimento foram referidas para cirurgia em sua maioria por apresentarem fragmentos em exames radiográficos de rotina e compra sem apresentar outros sinais clínicos. O sinal clínico mais comum foi efusão articular associada ou não a claudicação, sendo detectada pelo software Lameness Locator em 33% dos casos e graduadas como leve.

Na avaliação da FC e FR dos dois grupos observou-se diferença nos valores, com efeito do tratamento na FR, e observamos menor EFD, com maior probabilidade de escores mais baixos após o tratamento, sensibilidade a palpação e necessidade de resgates analgésicos no GT, demonstrado potencial efeito analgésico da ozonioterapia como demonstrado em estudos em humanos (LOPES DE JESUS et al., 2017b). Provavelmente as diferenças não foram maiores devido a utilização dos resgates analgésicos realizados no GC, mantendo os animais mais confortáveis.

Diversos estudos em humanos utilizando a ozônio medicinal em quadros de osteoartrite demonstram melhoras nos escores VAS e WOMAC, melhora na função, diminuição da necessidade de analgésicos e melhor qualidade de vida dos pacientes, porém normalmente de curta duração quando comparado a tratamentos como AH e plasma rico em plaquetas (HASHEMI et al., 2015; DUYMUS et al., 2017; LOPES DE JESUS et al., 2017b; BABAEI-GHAZANI et al., 2018; RAEISSADAT et al., 2018). O presente estudo é de curta duração e confirma o potencial efeito analgésico da ozonioterapia no controle da dor pós-operatória, com diminuição no EFD e na sensibilidade a palpação e menor necessidade de resgates analgésicos.

A ultrassonografia ganhou muito espaço e participação no diagnóstico, controle e monitoramento da resposta ao tratamento de afecções articulares, por ser pouco invasiva (MÖLLER et al., 2008) e também por permitir observar alterações precocemente, antes que elas apareçam no exame radiográfico (RASERA et al., 2007).

Nos exames de articulações com OCD podemos observar associados a presença do fragmento intra-articular, irregularidade e/ou remodelamento do osso subcondral e da cartilagem articular, aumento da quantidade de LS, que pode ter alterações em sua ecogenicidade com pontos hipereflexivos (sugestivos de pequenos fragmentos cartilagíneos), aumento na quantidade e tamanho da membrana sinovial, que também pode ter sua ecogenicidade alterada e apresentar *doppler* positivo, isso tudo a depender do quanto o fragmento está estimulando a inflamação articular (KIDD; LU; FRAZER, 2014).

Há na literatura estudos correlacionando o sinal de *doppler* positivo com inflamação ativa da membrana sinovial, e este com quadros progressivos de osteoartrite e artrite reumatóide, por estimular a liberação de diversas citocinas e eicosanoides pró-inflamatórios culminando com a progressão da doença, sendo ainda muito útil na avaliação de resposta a tratamentos, tanto sistêmicos quanto intra-articulares (TEH et al., 2003; KOSKI et al., 2006; PORTA et al., 2012; NAREDO et al., 2015; SARMANOVA et al., 2016). Nas avaliações ultrassonográficas neste estudo as principais alterações observadas foram no sinal de *doppler*, sinovite, aumento da quantidade de líquido sinovial, espessamento da plica sinovial e da cápsula articular, sinais estes compatíveis com inflamação aguda da articulação (KIDD; LU; FRAZER, 2014), com diminuição destas alterações ao longo do tratamento no GT, indicando possível efeito anti-inflamatório do ozônio medicinal, contudo só foi possível alcançar diferença estatística no item vascularização e sinovite.

Em quadros de inflamação articular, como osteoartrite e sinovite, há aumento da contagem celular e da concentração de proteína, o que ocorreu no pós-operatório em ambos os grupos, mas em menor proporção nas contagens celulares no GT. A quantidade normal de leucócitos é de até 1000 cel/ μ L, sendo 90% mononucleares e 10% polimorfonucleares (KAY et al., 2008), colocando as médias dos dois grupos dentro dos referenciais normais no início do experimento e compatível com quadros articulares inflamatórios no M48, ou seja, com aumento da celularidade e da quantidade de células polimorfonucleares, (HAWKINS et al., 1995; FRISBIE et al., 2007), podendo inferir que a artroscopia gerou inflamação articular, sendo parcialmente controlada no GT. As concentrações de proteína também aumentaram mas de forma semelhante com média final acima do considerado normal na literatura de 2 g/dl (MCILWRAITH et al., 1979), ao contrário da ureia que manteve-se constante, demonstrando que não houve diluição das amostras.

Há na literatura diferentes concentrações de PGE₂ consideradas alteradas, enquanto Bertone, Palmer e Jones (2001) consideram concentrações acima de 22,5 pg/mL um bom a excelente preditor de OA, outros estudos observaram médias de 28,5 a 65,06 pg/mL em

articulações hígidas (MORAES et al., 2015; MOREIRA et al., 2015; VENDRUSCOLO et al., 2018). No presente estudo as concentrações médias no M0 no GT foi de 102,77 pg/ml, correspondendo a OA segundo todos autores, e 55,76 pg/ml no GC, compatível com OA segundo Bertone, Palmer e Jones (2001). No M48 a média de todos os grupos se enquadravam dentro das concentrações compatíveis com OA (LAMPRECHT; WILLIAMS, 2012), sendo que no GC a concentração média foi para 135,94 pg/ml, aumento de aproximadamente 2,4 vezes, já no GT houve diminuição para 82,37 pg/ml, uma diferença de 20,4 pg/ml, corroborando com o relatado na literatura pós tratamento com ozonioterapia (BOCCI, 2005; BURIC; RIGOBELLO; HOOPER, 2014). Este resultado demonstra efeito anti-inflamatório e antálgico do ozônio IA, por conseguir controlar as concentrações desse eicosanoide, que é considerado um dos principais mediadores inflamatórios e de dor (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006).

Os efeitos antinoceptivos do ozônio ocorrem através de uma série de mecanismos. Dentre eles a estimulação direta do receptor A1, ocorrendo associados com fatores inflamatórios, e ativação do subconjunto de fibras C. Após a exposição ao ozônio ocorre ainda a diminuição da liberação de substância P e fator de crescimento neural, sendo que o último também tem sua ação inibida, o que reduz a resposta a substância P. Além desses mecanismos, a inibição da resposta inflamatória em resposta a ozonioterapia também diminui diretamente a dor (OGUZ; YILDIZGOREN, 2020). Contrário ao esperado e relatado na literatura houve aumento nas concentrações de substância P no GT de magnitude semelhante ao GC.

Na OA temos ações de várias citocinas de caráter pro-inflamatório, dentre elas a IL-1, IL-6 e TNF- α (LEY et al., 2011; SCANZELLO; GOLDRING, 2012), e anti-inflamatório, como a IL-4 e IL-10 (HART et al., 1995). Houve aumento nas concentrações de IL-1 no GT e GC, sendo maiores no GC e de e TNF- α no GT. A concentração de TNF- α manteve-se dentro do considerado normal no M0 e M48, ao contrário da IL-1, que apresentou concentração acima do considerado normal nos dois momentos, em ambos os grupos, compatível com inflamação articular (BERTONE; PALMER; JONES, 2001). Ao contrário do relatado na literatura não observou-se diminuição destas interleucinas, havendo inclusive aumento significativo no TNF- α no GT (ILIAKIS et al., 2001; PAOLONI et al., 2009).

Já a concentração de IL-6 aumentou em ambos os grupos, porém em menor escala no GT, acompanhando as contagens celulares como relatado na literatura (BERTONE; PALMER; JONES, 2001). A IL-6 é considerada um excelente preditor de doença articular, sendo que segundo Bertone, Palmer e Jones (2001) em articulações normais não ocorre sua detecção e considera alterado concentrações acima de 2,25 pg/mL. Porém em outro estudo mais recente

com articulações hígidas observou-se concentrações médias de 3,48 pg/mL em articulações hígidas (VENDRUSCOLO et al., 2018). Mas independente do estudo, as médias dos dois grupos estavam acima do considerado normal já no M0, aumentando de 6,75 para 43,28 pg/mL no M48h, com delta de 36,54, no GT; e de 8,73 para 217,47 pg/mL, com delta de 208,70, no GC. Observa-se claramente valores significativamente menores desta IL as 48h no GT indicando ação da ozonioterapia sobre a IL-6, uma excelente biomarcador de inflamação aguda, corroborando com a literatura (ILIAKIS et al., 2001; PAOLONI et al., 2009).

Em relação as citocinas anti-inflamatórias, a IL-4 e IL-10 auxiliam na diminuição das concentrações da IL-1 e TNF- α (HART et al., 1995), diminuindo também a PGE₂ nos casos mediados por TNF- α (TAKAFUJI; MCILWRAITH; HOWARD, 2002), atuando ainda na modificação dos macrófagos de M1 para M2 (MURRAY et al., 2014; JAIN; TRAN; AMIJI, 2015), propiciando ambiente propício para reparação articular. No presente estudo observou-se aumento na IL-4, em ambos os grupos, acompanhado de aumento na IL-10, sendo mais acentuado no GT, embora sem diferença estatística, corroborando com o observado na literatura com aumento das citocinas anti-inflamatórias em uma segunda fase de ação da ozonioterapia no ambiente articular, auxiliando no processo de reparação da lesão (BOCCI, 2005; BURIC; RIGOBELLO; HOOPER, 2014).

O CS já é comprovadamente um bom biomarcador de metabolismo da cartilagem articular, havendo aumento em suas concentrações em casos de lesão, devido a ativação de MMPs responsáveis pela clivagem da MEC, resultando na maior liberação dos seus fragmentos no LS (ALWAN et al., 1991; PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; MCILWRAITH, 2005; MORAES et al., 2015; MOREIRA et al., 2015; VENDRUSCOLO et al., 2018). Houve aumento nos dois grupos após o insulto cirúrgico, sendo de 3,26 vezes no GT e de 4,27 vezes no GC, sugerindo tendência de controle da destruição da MEC. Embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa, demonstra tendência de potencial efeito condroprotetor da ozonioterapia, provavelmente devido ao controle mais eficiente da inflamação articular, bloqueando a cascata inflamatória e consequentemente a liberação e ativação das MMPs, conforme relatado por Oladazimi, Farzanegi e Azarbajani (2020). Dentre as MMPs destaca-se a collagenase, agrecanase e gelatinase, como as principais responsáveis pela destruição da MEC da cartilagem articular (BOCCI, 2005; BURIC; RIGOBELLO; HOOPER, 2014).

Outro GAG muito utilizado como biomarcador de metabolismo da cartilagem articular é o AH, havendo resultados diferentes na literatura, com alguns autores não observando alterações significativas de suas concentrações com a inflamação articular (MORAES et al.,

2015; MOREIRA et al., 2015; VENDRUSCOLO et al., 2018) e outro indicando diminuição de sua concentração (FULLER et al., 2001). No presente estudo houve diminuição no GT e GC, sem diferença estatística, compatível com os estudos de Moraes et al. (2015), Moreira et al. (2015) e Vendruscolo et al.(2018), mas também com o de Fuller et al. (2001), pois houve diminuição mas não estatística. Um fator comprovadamente relacionado a inflamação articular é a quebra do AH de alto peso molecular em fragmentos de menor peso, sendo o principal responsável pela diminuição da viscosidade do LS na OA (BAXTER, 2011), isso ocorre principalmente pela ação das EROs produzida pelas células brancas polimorfonucleares durante seu *burst* respiratório (TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994). Por esse motivo quando utiliza-se a associação da ozonioterapia com a aplicação de AH deve-se aplicar primeiramente o gás, para que ele reaja com os tecidos, e depois o AH, evitando assim a quebra da molécula aplicada. No presente estudo a atividade antioxidante e anti-inflamatória do tratamento com ozônio propiciou o controle da diminuição do peso molecular do AH, embora a diferença não tenha sido estatística.

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de neutralizar os intermediários reativos ou reparar o consequente dano por uma defesa antioxidante ineficiente (SURESH et al., 2009). O estresse oxidativo por sua vez causa danos a todos os componentes celulares, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (YILMAZ, 2012). No ambiente articular as EROs podem resultar no dano oxidativo de vários componentes, incluindo colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico (OSTALOWSKA et al., 2006). A ozonioterapia intra-articular vem como uma alternativa terapêutica para reverter o estresse oxidativo articular aumentando a quantidade de enzimas antioxidantes (BOCCI, 2005).

Não há na literatura artigos demonstrando a concentração de TAC e TOC do líquido sinovial, apenas as concentrações séricas, em pacientes humanos com OA de joelho (BAGHERIFARD et al., 2020) e em equinos em treinamento (FAZIO et al., 2016; MAMI et al., 2019; BIS-WENCEL et al., 2020). As concentrações diferem bastante entre estas espécies com concentrações mais baixas em humanos e com grande diferença entre os artigos em equinos. Esperava-se inibição do aumento do TOC no GT assim como aumento da concentração de TAC, que não ocorreu. Porém o estudo envolvendo pacientes humanos com OA e saudáveis não encontrou diferença significativa na concentração de TAC e TOC entre os grupos (BAGHERIFARD et al., 2020), havendo apenas diferença na relação TOC/TAC, capaz de distinguir pacientes com OA dos saudáveis com sensibilidade de 87,1% e especificidade de

80%, sendo que a relação acima de 0,46 identificava 100% dos pacientes grau I, enquanto era negativa em 27,3%, 16,7% e 16,7% dos pacientes com grau II, III e IV, respectivamente.

O ozônio ao reagir com os ácidos graxos poli-insaturados dá origem aos LOPs, dentre eles o radical lipoperoxil, hidroperóxidos, isoprostanos, ozonídeos, alcalenos, 4-hidroxinonenal (4-HNE) e MDA, que por sua vez ativarão a transcrição dos elementos de resposta antioxidante (ARE) através do fator nuclear eritroide-2 relacionado (Nrf2), aumentando a transcrição de uma série de enzimas antioxidantes (GRANGEAT et al., 2020). Nas amostras de LS deste estudo as concentrações de MAD foram semelhantes as séricas encontradas por Michalska, Nowicka e Wessely-Szponder (2020) em equinos com OA crônica ($9,2 \pm 3,25$) e aguda ($11,29 \pm 6,06$), sendo que no GT a ozonioterapia foi capaz de manter as concentrações semelhantes, havendo aumento no GC, embora não tenha sido estatisticamente significativa.

Ainda no estudo de Michalska, Nowicka e Wessely-Szponder (2020) observou-se que os neutrófilos sanguíneos dos equinos cometidos por OA crônica e aguda liberavam maior quantidade de todas as enzimas estudadas, elastase, fosfatase alcalina e mieloperoxidase, em comparação ao grupo controle, havendo inclusive correlação das enzimas com o grau de claudicação. Essas alterações eram mais significativas nos casos agudos devido a maior atividade dos neutrófilos, compatíveis com os casos do presente estudo, nos quais houve insulto agudo através da artroscopia, e confirmado através do *burst* oxidativo dos neutrófilos com aumento em todos os grupos do índice de ativação com 48h, demonstrando maior atividade dessas células no pós-cirúrgico.

Outra célula com importante papel na OA é o macrófago. Em condições saudáveis eles promovem a integridade sinovial através da atividade fagocítica (limpeza de material estranho, debris teciduais e esferocitose) e secreção no LS citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (ORLOWSKY; KRAUS, 2015; FICHADIYA et al., 2016). Quando as funções homeostáticas são sobrecarregadas, os macrófagos sinoviais aumentam a inflamação, recrutando outras células imunes para responder a demanda aumentada por reparação e volta a homeostase (MANFERDINI et al., 2016). Os macrófagos podem ser ativados em um grande espectro de fenótipos, de acordo com o estímulo ambiental, com as células desempenhando resposta pro-inflamatória clássica (M1) ou pro-reparativa (M2) (MURRAY et al., 2014).

Ex vivo a condrogênese das células sinoviais progenitoras é impedida pelos macrófagos classicamente ativados (M1) da sinóvia osteoartrítica, enquanto os macrófagos ativados alternativamente (M2) são necessários para condrogênese eficiente (FICHADIYA et al., 2016). A inflamação nas articulações artríticas é diminuída por macrófagos M2, melhorando os sinais clínicos e histológicos da doença articular (BELLAC et al., 2014; JAIN; TRAN; AMIJI, 2015).

Resumidamente, estes achados sugerem que o aumento na resposta dos macrófagos M2 em articulações doentes pode prover o mecanismo para resolver a inflamação articular e restaurando o ambiente sinovial saudável com melhor capacidade de reparação tecidual (MENARIM et al., 2020). A ozonioterapia consegue agir no ambiente articular auxiliando na modulação dos macrófagos para que as células se implantem e sobrevivam, permitindo a recuperação das estruturas danificadas (GRANGEAT et al., 2020). No presente estudo não se observou aumento estatisticamente significativo no índice de sua ativação, mas ambiente propício para macrófagos M2 com aumento da IL-4 e 10 que estão entre as responsáveis por essa mudança de fenótipo (MURRAY et al., 2014; JAIN; TRAN; AMIJI, 2015).

9. CONCLUSÃO

A utilização do ozônio medicinal ao final do procedimento artroscópico em casos de osteocondrite dissecante mostrou efeito anti-inflamatório e analgésico, diminuindo a concentração de marcadores inflamatórios e de catabolismo cartilágneo. Além disso, proporcionou melhores escores na avaliação física dos cavalos, auxiliando no período pós-operatório.

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, N. **The Oxygen Prescription: The Miracle Of Oxidative Therapies**. 1ª Edição ed. [s.l: s.n.]
- ALVES, G. E. S. et al. Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 433–437, 2004.
- ALWAN, W. H. et al. Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 1, p. 44–47, 1991.
- APUZZO, D. An observational retrospective/horizontal study to compare oxygen-ozone therapy and/or global postural re-education in complicated chronic low back pain. **Functional Neurology**, v. 29, n. 1, p. 1–9, 2014.
- ARIAS-VÁZQUEZ, P. I. et al. Short-Term Therapeutic Effects of Ozone in the Management of Pain in Knee Osteoarthritis: A Meta-Analysis. **PM&R**, v. 11, n. 8, p. 879–887, 2019.
- BABAEI-GHAZANI, A. et al. The effects of ultrasound-guided corticosteroid injection compared to oxygen-ozone (O2-O3) injection in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. **Clinical Rheumatology**, v. 37, p. 2517–2527, 2018.
- BAGHERIFARD, A. et al. The value of serum total oxidant to the antioxidant ratio as a biomarker of knee osteoarthritis. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 38, p. 118–123, 2020.
- BALLARDINI, E. Oxygen-Ozone Therapy for Spinal Muscle. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 4, p. 70–73, 2005.
- BALLARDINI, E. Changes in Haemochromocytometric Values in Horses after Ozone Auto-haemotransfusion. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 5, p. 47–52, 2006.
- BAXTER, G. M. **Adams & Stashak's Lameness in horses**. 6ª edição ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011.
- BAYRAK, O. et al. Chemical cystitis developed in experimental animals model: Topical effect of intravesical ozone application to bladder. **Urology annals**, v. 6, n. 2, p. 122–6, abr. 2014.
- BEARD, W. L. et al. Postoperative racing performance in standardbreds and thoroughbreds with osteochondrosis of the tarsocrural joint: 109 cases (1984-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 10, p. 1655–9, 1994.
- BELLAC, C. L. et al. Macrophage matrix metalloproteinase-12 dampens inflammation and neutrophil influx in arthritis. **Cell Reports**, v. 9, n. 2, p. 618–632, 2014.
- BERGIN, B. J. et al. Oral hyaluronan gel reduces post operative tarsocrural effusion in the yearling Thoroughbred. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 4, p. 375–378, 2006.
- BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. **Veterinary Surgery**, v. 30, n. 6, p. 528–538, 2001.
- BIS-WENCEL, H. et al. Effect of defined, seasonally variable exercise on oxidative status markers (TOS, TAS) in jumping horses. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 76, n. 7, p. 394–399, 2020.
- BOCCI, V. **Ozone: A New Medical Drug**. 1ª edição ed. Dordrecht: Springer, 2005.
- BOCCI, V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 216, n. 3, p. 493–504, 1 nov. 2006.
- BORRELLI, E.; BOCCI, V. Oxygen ozone therapy in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease : An integrative approach. v. 2, n. 2, p. 9–13, 2014.
- BRINK, P.; DOLVIK, N. I.; TVERDAL, A. Lameness and effusion of the tarsocrural joints after arthroscopy of osteochondritis dissecans in horses. **The Veterinary record**, v. 165, n. 24, p. 709–12, 2009.
- BUCKWALTER, J. A. Activity vs. rest in the treatment of bone, soft tissue and joint injuries. **The Iowa orthopaedic journal**, v. 15, p. 29–42, 1995.
- BUCKWALTER, J. A.; LANE, N. E. Aging, Sports, and Osteoarthritis. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 4, n. 3, p. 276–87, 1996.

- BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 79, n. 4, p. 600–11, 1997a.
- BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 79, n. 4, p. 612–32, 1997b.
- BURIC, J.; RIGOBELLO, L.; HOOPER, D. Five and ten year follow-up on intradiscal ozone injection for disc herniation. **International journal of spine surgery**, v. 8, p. 17, 2014.
- CAKIR, R. General Aspects of Ozone Therapy. In: FAIK ATROSHI (Ed.). **Pharmacology and Nutritional Intervention in the Treatment of Disease**. [s.l.] InTech, 2014. p. 159–177.
- CALUNGA, J. L. et al. Application of Ozone Therapy in Patients with Knee Osteoarthritis. **Ozone: Science & Engineering**, v. 34, n. 6, p. 469–475, nov. 2012.
- CAMELIA, C. et al. The role of ozone therapy in maintaining the articular function and in relieving the pain for patients with knee osteoarthritis. **ARS Medica Tomitana**, v. 1, n. 76, p. 25–29, 2014.
- CARDELLI, R. et al. Osteoarthritis of the Hip Treated by Intra-Articular Infiltration of Oxygen-Ozone and Hyaluronic Acid (Hyalubrix). **International Journal of Ozone Therapy**, v. 7, p. 66–69, 2008.
- CARLSON, C. S.; HILLEY, H. D.; MEUTEN, D. J. Degeneration of Cartilage Canal Vessels Associated With Lesions of Osteochondrosis in Swine. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 1, p. 47–54, 1989.
- CHANG, J. D. S. et al. Ameliorative effect of ozone on cytokine production in mice injected with human rheumatoid arthritis synovial fibroblast cells. **Rheumatology international**, v. 26, n. 2, p. 142–51, dez. 2005.
- CHEN, H. et al. The effect of intra-articular injection of different concentrations of ozone on the level of TNF- α , TNF-R1, and TNF-R2 in rats with rheumatoid arthritis. **Rheumatology international**, v. 33, n. 5, p. 1223–7, maio 2013.
- COLÓN, J. L. et al. Qualitative and quantitative documentation of the racing performance of 461 Thoroughbred racehorses after arthroscopic removal of dorsoproximal first phalanx osteochondral fractures (1986-1995). **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 6, p. 475–481, 2000.
- DAIF, E. T. Role of intra-articular ozone gas injection in the management of internal derangement of the temporomandibular joint. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 113, n. 6, p. e10-4, jun. 2012.
- DALLA COSTA, E. et al. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92281. doi:10.1371/journal.pone.0092281, 2014.
- DE NÊUTON, F. et al. Effects of ozone applied by spinal endoscopy in patients with chronic pain related to failed back surgery syndrome: a pilot study. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 9, p. 1759–66, 2013.
- DERNEK, B.; KESIKTAS, F. N. Efficacy of combined ozone and platelet-rich-plasma treatment versus platelet-rich-plasma treatment alone in early stage knee osteoarthritis. **Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation**, v. 32, n. 2, p. 305–311, 2019.
- DJURICIC, D.; VALPOTIC, H.; SAMARDZIJA, M. The Intrauterine Treatment of the Retained Foetal Membrane in Dairy Goats by Ozone: Novel Alternative to Antibiotic Therapy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 236–239, 2015.
- DOUGLAS, J. The pathogenesis and clinical manifestations of equine osteochondrosis. **Veterinary medicine**, v. 87, n. 8, p. 826–833, 1992.
- DOUGLAS, J. Pathogenesis of Osteochondrosis. In: ELSEVIER (Ed.). **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse: Second Edition**. [s.l.: s.n.]p. 617–625.

- DUYMUS, T. M. et al. Choice of intra-articular injection in treatment of knee osteoarthritis: platelet-rich plasma, hyaluronic acid or ozone options. **Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA**, 2016.
- DUYMUS, T. M. et al. Choice of intra-articular injection in treatment of knee osteoarthritis: platelet-rich plasma, hyaluronic acid or ozone options. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 25, n. 2, p. 485–492, 2017.
- EASTER, J. L.; WATKINS, J. P. Osteochondrosis and physitis. In: COLAHAN, P.T.; MAYHEW, I.G.; MERRIT, A.M.; MOORE, J. . (Ed.). **Equine Medicine and Surgery**. 5th Edition ed. St Louis: Mosby, 1999. p. 1475–1482.
- ELVIS, A.; EKTA, J. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 66, 2011.
- EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277–285, 2004.
- EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103–1111, 2005.
- ESCANDÓN, B. M. et al. Intrauterine therapy with ozone reduces subclinical endometritis and improves reproductive performance in postpartum dairy cows managed in pasture-based systems. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 2523–2528, 2020.
- FAZIO, F. et al. Relationship of Some Oxidative Stress Biomarkers in Jumper Horses After Regular Training Program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 47, p. 20–24, 2016.
- FERKEL, R. D. et al. Arthroscopic Treatment of Chronic Osteochondral Lesions of the Talus: Long-term Results. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 9, p. 1750–1762, 2008.
- FICHADIYA, A. et al. Characterizing heterogeneity in the response of synovial mesenchymal progenitor cells to synovial macrophages in normal individuals and patients with osteoarthritis. **Journal of Inflammation**, v. 13, n. 12, p. 0–11, 2016.
- FIORELA, C.; SCHWARTZ, A. Ozone and Ozonated Growth Factors in the Treatment of Disc Herniation and Discartrosis. **Revista Española de Ozonioterapia**, v. 3, n. 1, p. 21–33, 2013.
- FORTIER, L. A.; FOERNER, J. J.; NIXON, A. J. Arthroscopic removal of axial osteochondral fragments of the plantar/palmar proximal aspect of the proximal phalanx in horses: 119 cases (1988-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 1, p. 71–4, 1995.
- FORTIER, L. A.; NIXON, A. J. New Surgical Treatments for Osteochondritis Dissecans and Subchondral Bone Cysts. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 21, n. 3, p. 673–690, 2005.
- FRISBIE, D. D. et al. Induced Osteoarthritis. **Blood**, v. 68, n. 3, p. 290–296, 2007.
- FULLER, C. J. et al. Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, n. 1, p. 49–55, 2001.
- GARCIA LIÑEIRO, J. A. et al. Eco guide oxygen peroxidum injection (ozone therapy) as treatment of intervertebral lesions in horses. Description of the evolution of 15 cases. In: Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association, September 2009, **Anais...**2009.
- GIOMBINI, A. et al. Comparison between intrarticular injection of hyaluronic acid, oxygen ozone, and the combination of both in the treatment of knee osteoarthritis. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 30, n. 2, p. 621–5, 2016.
- GRANGEAT, A. et al. Ozone therapy with local cellular immune modulation and disc progenitor cell implant is safe, effective and efficient. **Open Journal of Orthopedics and Rheumatology**, v. 5, n. 1, p. 024–033, 2020.

- GRIMAUD, E.; HEYMANN, D.; RÉDINI, F. Recent advances in TGF- β effects on chondrocyte metabolism: Potential therapeutic roles of TGF- β in cartilage disorders. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 3, p. 241–257, 2002.
- GRONDAHL, A. M. The incidence of osteochondrosis in the tibiotarsal joint of norwegian standardbred trotters - A radiographic study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 11, n. 5, p. 272–274, 1991.
- HADDAD, M. A. et al. Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 539–546, 2009.
- HAN, H. J. et al. Fluoroscopic-guided intradiscal oxygen-ozone injection therapy for thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs. **In Vivo**, v. 21, n. 4, p. 609–614, 2007.
- HARRISON, L. J.; EDWARDS, G. B. Radiographic investigation of osteochondrosis. **Equine Veterinary Education**, v. 8, n. 3, p. 172–176, 1996.
- HART, P. H. et al. Comparison of the suppressive effects of interleukin-10 and interleukin-4 synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. **Immunology**, v. 84, n. 4, p. 536–542, 1995.
- HASHEMI, M. et al. The Effects of Prolotherapy With Hypertonic Dextrose Versus Prolozone (Intraarticular Ozone) in Patients With Knee Osteoarthritis. **Anesth Pain Med.d.**, v. 5, n. 5, p. 5–8, 2015.
- HAWKINS, D. L. et al. Effect of tumor necrosis factor antibody on synovial fluid cytokine activities in equine antebrachiocarpal joints injected with endotoxin. **American journal of veterinary research**, v. 56, n. 10, p. 1292–9, 1995.
- HOPPE, F. Radiological investigations of osteochondrosis dissecans in Standardbred Trotters and Swedish Warmblood horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 5, p. 425–429, 1984.
- HUNT, S. A.; SHERMAN, O. Arthroscopic treatment of osteochondral lesions of the talus with correlation of outcome scoring systems. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 19, n. 4, p. 360–367, 2003.
- HUNTER, M. I. S.; NLEMADIM, B. C.; AL, H. E. T. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. v. 10, n. 12, p. 1645–1652, 1985.
- HURTING, M. B.; POOL, R. R. Pathogenesis of osteochondrosis. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. (Ed.). **Joint Disease in the Horse**. 1^o Edition ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 335–357.
- ILIAKIS, E. et al. Rationalization of the Activity of Medical Ozone on Intervertebral Disc A Histological and Biochemical Study. **The Neuroradiology Journal**, v. 14, n. 1 Suppl, p. 23–30, 1 mar. 2001.
- JAIN, S.; TRAN, T. H.; AMIJI, M. Macrophage repolarization with targeted alginate nanoparticles containing IL-10 plasmid DNA for the treatment of experimental arthritis. **Biomaterials**, v. 61, p. 162–177, 2015.
- JANI, P. et al. Ozone therapy: the alternative medicine of future. **Indian Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 2, n. 4, p. 196–203, 2012.
- JARAMILLO, F. M. . et al. Effects of transrectal medicinal ozone in horses – clinical and laboratory aspects. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 1, p. 56–64, 2020.
- JEFFCOTT, L. B. Osteochondrosis in the horse - searching for the key to pathogenesis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 5, p. 331–338, 1991.
- KAY, A. T. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of intra-articular injection of triamcinolone acetonide, mepivacaine hydrochloride, or both on lipopolysaccharide-induced lameness in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 12, p. 1646–1654, 2008.

- KAZANCIOGLU, H. O.; EZIRGANLI, S.; AYDIN, M. S. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 24, n. 6, p. 2141–6, nov. 2013.
- KIDD, J.; LU, K. G.; FRAZER, M. L. **Atlas of Equine Ultrasonography**. 1ª edição ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2014.
- KOSKI, J. M. et al. Power Doppler ultrasonography and synovitis: Correlating ultrasound imaging with histopathological findings and evaluating the performance of ultrasound equipments. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 12, p. 1590–1595, 2006.
- LAMPRECHT, E. D.; WILLIAMS, C. A. Biomarkers of antioxidant status, inflammation, and cartilage metabolism are affected by acute intense exercise but not superoxide dismutase supplementation in horses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.
- LAWS, E. G. et al. Racing performance of Standardbreds after conservative and surgical treatment for tarsocrural osteochondrosis. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 3, p. 199–202, 1993.
- LEE, H. G.; COWMAN, M. K. An Agarose Gel Electrophoretic Method for Analysis of Hyaluronan Molecular Weight Distribution. **Analytical Biochemistry**, v. 219, n. 2, p. 278–287, jun. 1994.
- LEY, C. et al. Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 β , and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures. **Connective Tissue Research**, v. 52, n. 4, p. 290–300, 2011.
- LINTAS, G. et al. Time and time-frequency analysis of near-infrared signals for the assessment of ozone autohemotherapy long-term effects in multiple sclerosis. In: 35th Annual International Conference of the IEEE EMBS, **Anais...**2013.
- LOPES DE JESUS, C. C. et al. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–16, 2017a.
- LOPES DE JESUS, C. C. et al. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0179185, 2017b.
- MACHADO, T. **Análise clínica e estrutural de processos de osteoartrite dissecante da articulação tibiotársica de equinos**. 2010. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.
- MACHADO, T. S. L. et al. Synovial fluid chondroitin sulphate indicates abnormal joint metabolism in asymptomatic osteochondritic horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 4, p. 404–411, 2012.
- MALDONADO, H. M. . et al. Uso de la ozonoterapia para el control de la endometritis subclínica postparto en vacas lecheras. **MASKANA**, v. 8, p. 105–108, 2017.
- MAMI, S. et al. Evaluation of Biological Indicators of Fatigue and Muscle Damage in Arabian Horses After Race. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 78, p. 74–78, 2019.
- MANFERDINI, C. et al. From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. **Arthritis Research & Therapy**, v. 18, n. 83, p. 0–13, 2016.
- MARCELINO, J.; MCDEVITT, C. A. Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1249, n. 2, p. 180–188, 1995.
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. et al. Effects of ozone therapy on haemostatic and oxidative stress index in coronary artery disease. **European journal of pharmacology**, v. 691, n. 1–3, p. 156–62, 15 set. 2012.
- MAWSOUF, M. N. et al. Effect of ozone therapy on redox status in experimentally induced arthritis. **Revista Española de Ozonioterapia**, v. 1, n. 1, p. 32–43, 2011.

- MCILWRAITH, C. W. et al. Experimentally induced arthritis of the equine carpus: clinical determinations. **American journal of veterinary research**, v. 40, n. 1, p. 11–20, 1979.
- MCILWRAITH, C. W. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 5, p. 473–482, 2005.
- MCILWRAITH, C. W. et al. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. SUPPL. 3, p. S93–S105, 2010.
- MCILWRAITH, C. W.; FOERNER, J. J.; DAVIS, D. M. Osteochondritis dissecans of the tarsocrural joint: results of treatment with arthroscopic surgery. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 3, p. 155–162, 1991.
- MCILWRAITH, C. W.; NIXON, A. J. Joint resurfacing: attempts at repairing articular cartilage defects. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. (Ed.). **Joint Disease in the Horse**. 1^o Edition ed. [s.l: s.n.]p. 317–334.
- MENARIM, B. C. et al. Macrophage Activation in the Synovium of Healthy and Osteoarthritic Equine Joints. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. November, p. 1–14, 2020.
- MENÉNDEZ, P.; GARCÍA, A.; PELÁEZ, R. Paravertebral and intra-abdominal abscess due to oxygen-ozone therapy for lower back pain. **Revista española de cirugía ortopédica y traumatología**, v. 58, n. 2, p. 125–7, 2014.
- MERIN, O. et al. Ozone Administration Reduces Reperfusion Injury in an Isolated Rat Heart Model. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 22, n. 4, p. 339–342, 2007.
- MICHALSKA, J.; NOWICKA, B.; WESSELY-SZPONDER, J. Relationship Between Neutrophil Activity, Oxidative Stress, Acute Phase Response, and Lameness Grade in Naturally Occurring Acute and Chronic Joint Disorders in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 88, p. 102972, 2020.
- MISHRA, S. K. et al. Original Paper Role of intra-articular ozone in osteo-arthritis of knee for functional and symptomatic improvement. **Indian Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 22, n. 2, p. 65–69, 2011.
- MÖLLER, I. et al. Ultrasound in the study and monitoring of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. SUPPL. 3, p. 4–7, 2008.
- MORAES, A. P. L. et al. Short- and long-term effects of platelet-rich plasma upon healthy equine joints: Clinical and laboratory aspects. **The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne**, v. 56, n. 8, p. 831–8, 2015.
- MOREIRA, J. J. et al. Autologous processed plasma: Cytokine profile and effects upon injection into healthy equine joints. **Journal of Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 47–55, 2015.
- MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.
- NAREDO, E. et al. Predictive value of Doppler ultrasound-detected synovitis in relation to failed tapering of biologic therapy in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 54, n. 8, p. 1408–1414, 2015.
- NEIMARK, A. I. et al. Microcirculation and structural reorganization of the bladder mucosa in chronic cystitis under conditions of ozone therapy. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 156, n. 3, p. 399–405, 2014.
- NOORI-ZADEH, A. et al. Intra-articular ozone therapy efficiently attenuates pain in knee osteoarthritic subjects: A systematic review and meta-analysis. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 42, p. 240–247, 1 fev. 2019.
- OGATA, A.; NAGAHATA, H. Intramammary Application of Ozone Therapy to Acute Clinical Mastitis in Dairy Cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 7, p. 681–686, 2000.
- OGUZ, E. et al. Evaluation and comparison of the effects of hyperbaric oxygen and ozonized oxygen as adjuvant treatments in an experimental osteomyelitis model. **The Journal of surgical research**, v. 171, n. 1, p. 61–8, 2011.

- OGUZ, H.; YILDIZGOREN, M. T. Ozone therapy for the treatment of recurrent pigmented villonodular synovitis of the knee. **Medical Gas Research**, v. 10, n. 3, p. 142–143, 2020.
- OLADAZIMI, S.; FARZANEGI, P.; AZARBAYEJANI, M. A. Evaluation of ALK5 and MMP13 Expression in the Cartilage Tissue of Rats with Osteoarthritis Rats and Effects of Exercise Training, Ozone and Mesenchymal Stem Cell Therapies on Expression of these Genes. **Medical Laboratory Journal**, v. 14, n. 1, p. 50–56, 2020.
- OLIVIERO, A.; GIORDANO, L.; MAFFULLI, N. The temporal effect of intra-articular ozone injections on pain in knee osteoarthritis. **British Medical Bulletin**, v. 132, n. 1, p. 33–44, 2019.
- ORLOWSKY, E. W.; KRAUS, V. B. The Role of Innate Immunity in Osteoarthritis: When Our First Line of Defense Goes on the Offensive. **Journal of Rheumatology**, v. 42, n. 3, p. 363–371, 2015.
- OSTALOWSKA, A. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 2, p. 139–145, 2006.
- OZDEMIR, H. et al. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. **Journal of periodontal research**, v. 48, n. 6, p. 722–6, dez. 2013.
- PALMER, J. L.; BERTONE, A. L.; MCCLAIN, H. Assessment of Glycosaminoglycan Concentration in Equine Synovial Fluid as a Marker of Joint Disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 205–212, 1995.
- PAOLONI, M. et al. Intramuscular oxygen-ozone therapy in the treatment of acute back pain with lumbar disc herniation: a multicenter, randomized, double-blind, clinical trial of active and simulated lumbar paravertebral injection. **Spine**, v. 34, n. 13, p. 1337–44, 1 jun. 2009.
- PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 229–240, 2006.
- POLAT, B. et al. Comparison of Intrauterine Ozone and Rifaximine Treatment in Cows with Subclinical Endometritis. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 21, n. 5, p. 773–776, 2015.
- POOLE, A. R. et al. Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 14, n. 5, p. 681–689, 1996.
- PORTA, F. et al. The role of doppler ultrasound in rheumatic diseases. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 51, n. 6, p. 976–982, 2012.
- QI, W.-N.; SCULLY, S. P. Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by transforming growth factor-B1. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 4, p. 483–490, jul. 1997.
- RAEISSADAT, S. A. et al. Intra-articular ozone or hyaluronic acid injection: Which one is superior in patients with knee osteoarthritis? A 6-month randomized clinical trial. **Journal of Pain Research**, v. Volume 11, p. 111–117, 2018.
- RAMALHO, C. Análise Econômico-Financeira do Uso da Ozonioterapia Como Parte do Tratamento de Patologias. n. 2, 2017.
- RAMÍREZ, E. M. M. et al. Administración tópica de ozono en dos casos de infección atípica de incisiones abdominales. **Recursos Educativos**, v. 5, n. 3, p. 183–188, 2013.
- RASERA, L. et al. Alterações radiográficas e ultra-sonográficas iniciais em osteoartrite experimental equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 634–640, 2007.
- RELAVE, F. et al. Comparison of radiography and ultrasonography to detect osteochondrosis lesions in the tarsocrural joint: A prospective study. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 34–40, 2009.
- REZAIE, M. et al. The Effect of Exercise, Ozone, and Mesenchymal Stem Cells Therapy on

- CB-1 and GABA Gene Expression in the Cartilage Tissue of Rats With Knee Osteoarthritis. **Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 6, n. 1, p. 45–52, 2020.
- RICHARDSON, D. W. Diagnosis and Management of Osteochondrosis and Osseous Cystlike Lesions. In: **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse**. Second Edition ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2011. p. 631–638.
- RILEY, C. B. et al. Osteochondritis dessicans and subchondral cystic lesions in draft horses: a retrospective study. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 39, n. 10, p. 627–33, 1998.
- SAGAI, M.; BOCCI, V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? **Medical gas research**, v. 1, n. 1, p. 29, jan. 2011.
- SARMANOVA, A. et al. Synovial changes detected by ultrasound in people with knee osteoarthritis – a meta-analysis of observational studies. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 8, p. 1376–1383, 2016.
- SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 249–57, ago. 2012.
- SCHWARTZ, A.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. Ozone Therapy and Its Scientific Foundations. **Revista Española de Ozonioterapia**, v. 2, n. 1, p. 199–232, 2012.
- SEYMAN, D. et al. Pseudomonas aeruginosa septic arthritis of knee after intra-articular ozone injection. **New Microbiologica**, v. 35, p. 345–348, 2012.
- SILVA JÚNIOR, J. I. S. et al. Use of Reticulated Hyaluronic Acid Alone or Associated With Ozone Gas in the Treatment of Osteoarthritis Due to Hip Dysplasia in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 2020.
- SILVA, M. M. et al. The correlation between score-based protocol for equine joint assessment and subsequent arthroscopic intervention outcomes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 4, 2019.
- SOUZA, Y. M. De et al. Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 65, n. 2, p. 195–202, fev. 2010.
- SPEIRS, V. C.; ANDERSON, G. A.; BOURKE, J. M. Assessment of prognosis for racing after carpal surgery in 210 Thoroughbreds. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, n. 3, p. 187–192, 1986.
- STRÖMBERG, B.; REJNÖ, S. Osteochondrosis in the horse. I. A clinical and radiologic investigation of osteochondritis dissecans of the knee and hock joint. **Acta radiologica. Supplementum**, v. 358, p. 139–52, 1978.
- SURESH, D. R. et al. Total antioxidant capacity-a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, p. 61, 2009.
- TAKAFUJI, V. A.; MCILWRAITH, C. W.; HOWARD, R. D. Effects of equine recombinant interleukin-1 α and interleukin-1 β on proteoglycan metabolism and prostaglandin E 2 synthesis in equine articular cartilage explants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 4, p. 551–558, 2002.
- TEH, J. et al. Power Doppler ultrasound of rheumatoid synovitis: Quantification of therapeutic response. **British Journal of Radiology**, v. 76, n. 912, p. 875–879, 2003.
- THOMASSIAN, A. Osteocondrose - OCD. In: **Enfermidades dos Cavalos**. 4ª Edição ed. São Paulo: Varela, 2005. p. 103–6.
- TRIPPEL, S. B. Growth factor actions on articular cartilage. **The Journal of Rheumatology. Supplement**, v. 43, p. 129–32, fev. 1995.
- TSUZUKI, N. et al. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 12, p. 1647–1650, 2015.
- TULAMO, R. M.; HEISKANEN, T.; SALONEN, M. Concentration and molecular weight distribution of hyaluronate in synovial fluid from clinically normal horses and horses with diseased joints. **American journal of veterinary research**, v. 55, n. 5, p. 710–5, 1994.

- VAILLANT, J. D. et al. Ozone oxidative postconditioning ameliorates joint damage and decreases pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress in PG/PS-induced arthritis in rats. **European journal of pharmacology**, v. 714, n. 1–3, p. 318–24, 15 ago. 2013.
- VAN WEEREN, P. R. Osteochondrosis. In: **Equine Surgery**. Forth Edit ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006. p. 1239–1255.
- VENDRUSCOLO, C. do P. et al. Effects of medical ozone upon healthy equine joints: Clinical and laboratorial aspects. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–18, 2018.
- VIEBAHN-HÄNSLER, R.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S.; FAHMY, Z. Ozone in Medicine: The Low-Dose Ozone Concept—Guidelines and Treatment Strategies. **Ozone: Science & Engineering**, v. 34, n. 6, p. 408–424, 2012.
- VIGLIANI, A.; BONIPERTI, E.; SCUDO, E. Paravertebral O2-O3 Treatment in Mechanical Lumbar Pain in Riding Horses. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 4, p. 64–69, 2005.
- XI-BING, G. U. et al. Effect of medical ozone therapy on renal blood flow and renal. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 18, p. 2510–2513, 2010.
- YILMAZ, N. Relationship between paraoxonase and homocysteine: Crossroads of oxidative diseases. **Archives of Medical Science**, v. 8, n. 1, p. 138–153, 1 fev. 2012.
- YOVICH, J. V.; MCILWRAITH, C. W. Arthroscopic surgery for osteochondral fractures of the proximal phalanx of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal (fetlock) joints in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 3, p. 273–9, 1986.
- YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; EKMAN, S. Etiology and Pathogenesis of Osteochondrosis. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 4, p. 429–448, 2007.
- YU, B. et al. Effect of Intra-Articular Ozone Injection on Degenerative Knee Cartilage in Rats. **International Journal of Ozone Therapy**, v. 9, n. 1, p. 14–20, 2010.
- ZOBEL, R. et al. Efficacy of ozone as a novel treatment option for urovagina in dairy cows. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47, n. 2, p. 293–8, 2012.
- ZOBEL, R. et al. Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle Simmental cattle. **Veterinarski Arhiv**, v. 84, n. 1, p. 1–8, 2014.
- ZOBEL, R.; TKALČIĆ, S. Efficacy of Ozone and Other Treatment Modalities for Retained Placenta in Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 1, p. 121–125, 2013.