

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2021

## 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 significativa 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 (O<sub>3</sub>) 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 O<sub>3</sub> in the postoperative period of osteochondritis dissecans (OCD) cases that went through arthroscopic surgery. The concentrations of interleukins (1, 4, 6, 10 and TNF- $\alpha$ ), substance P, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), 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 $\mu$ g / ml of O<sub>3</sub> after surgery and, 48h later, 5ml of O<sub>3</sub> 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 PGE<sub>2</sub> decreased in the TG and increased significantly in the CG, and the concentration of TNF- $\alpha$  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 PGE<sub>2</sub>, 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.