

CYNTHIA DO PRADO VENDRUSCOLO

**Avaliação dos efeitos inflamatório e oxidante do ozônio medicinal  
em articulações sinoviais de equinos hípidos**

São Paulo

2017

CYNTHIA DO PRADO VENDRUSCOLO

**Avaliação dos efeitos inflamatório e oxidante do ozônio medicinal em articulações  
sinoviais de equinos hípidos**

**Versão Original**

Dissertação 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 Mestre 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

2017

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. 3454  
FMVZ

Vendruscolo, Cynthia do Prado

Avaliação dos efeitos inflamatório e oxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos hípidos. / Cynthia do Prado Vendruscolo. -- 2017.  
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccharin.

1. Líquido sinovial 2. Interleucina. 3. Sinovite. I. Título.

# BIOÉTICA



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito inflamatório e oxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos hígidos", protocolada sob o CEUA nº 6409110215, 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 09/12/2015.

We certify that the proposal "Inflammatory and oxidant effect evaluation of the medicinal ozone in synovial joints in healthy equines", utilizing 12 Equines (12 males), protocol number CEUA 6409110215, 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 12/09/2015.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [fev/2011](#) a [jan/2011](#)

Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Origem:

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [a](#)

N: [12](#)

Linagem: [SRD](#)

Peso: [a](#)

Resumo: O presente estudo tem por finalidade avaliar a resposta inflamatória e oxidante de articulações hígidas à aplicação de ozônio medicinal. Para isso serão utilizados 16 articulações tibiotársicas de 8 equinos hígidos que receberão 3 aplicações semanais de ozônio medicinal no grupo tratado e de oxigênio medicinal no grupo controle, durante 2 semanas. Antes das infiltrações o líquido sinovial será coletado para análises. Os animais serão avaliados com exame clínico diário e exame de claudicação, semanalmente serão realizadas avaliações ultrassonográficas. O líquido sinovial coletado será submetido à avaliações laboratoriais.

Local do experimento:

São Paulo, 21 de setembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Autor: VENDRUSCOLO, Cynthia do Prado

Título: **Avaliação dos efeitos inflamatório e oxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos hípidos**

Dissertação 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 Mestre 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 oportunidade, total apoio e força para lutar por meus objetivos e sonhos sempre,*

*Aos meus amigos e familiares, por me ampararem em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida que sempre estiveram comigo e guiaram meus passos pelos caminhos que trilhei.

Aos meus pais, Leiva e Hilário, que sempre me apoiaram, são meus exemplos de vida e me forneceram o que foi necessário 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, Cristina O. Massoco Salles Gomes.

Às minhas duas casas de coração FMVZ-Unesp Botucatu e FMVZ-USP, por toda a base, inúmeros ensinamentos, profissionais e pessoais, e bons momentos vividos ao lado de pessoas especiais que conheci nessa jornada.

À minha orientadora Raquel Yvonne Arantes Baccarin, que me acolheu como orientada estando sempre presente para auxiliar no projeto, nas burocracias necessárias e que mesmo sem financiamento fez com que sua realização fosse possível.

À minha primeira orientadora Ana Liz Garcia Alves, que me acolheu na graduação, despertando meu interesse e paixão por pesquisa e dando a sólida base para a pós-graduação.

Aos meus companheiros e irmãos de pós-graduação, Juliana, Joice, Sarah, Fernanda e Henrique que me ajudaram durante essa árdua jornada, no cuidado com nossos adoráveis árabes, nas inúmeras coletas, análises, confecção e depósito da tese.

Aos meus colegas e amigos de residência e mestrado, Ayrton, Tiago, Milena, Nathalia, Murillo, Paulo, Marina, Carolina, Joyce, Sérgio, Kamirro, Anália, Aurélio, Guilherme, Rodrigo, Maria Eduarda e Teresa pelo auxílio durante a realização do projeto, pelas risadas e bons momentos, deixando o fardo muito mais leve e a experiência inesquecível.

Aos enfermeiros Marquinhos, Cícero, Henrique, Rosendo, Gervásio, Felipe e Ganga por toda ajuda, companheirismo e amizade nesses 5 anos de USP.

Ao Giancarlo Bonagura por ceder gentilmente o gerador de ozônio para que fosse possível realizar o experimento em tempo hábil.

À equipe de residentes que me auxiliou nos momentos em que precisei, além da amizade, trocas de experiência e as boas risadas.

À Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes e Nicole, pela ajuda com a citometria de fluxo e as análises.

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

Aos animais, nossos amados árabes, criaturas apaixonantes, que se comportaram muito durante as coletas e involuntariamente auxiliaram na realização do projeto.

## EPÍGRAFE

*“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

VENDRUSCOLO, C. P. **Avaliação dos efeitos inflamatório e oxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos hígidos.** [Evaluation of the inflammatory and oxidant effects of medical ozone in synovial joints of healthy horses]. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A ozonioterapia consiste na aplicação de ozônio medicinal, uma mistura de ozônio e oxigênio, que através das espécies reativas de oxigênio e produtos de lipoperoxidação exercem diversos efeitos no organismo como, melhora da oxigenação e metabolismo dos tecidos, angiogênese, aumento dos mecanismos antioxidantes, melhora do sistema imune, efeito anti-inflamatório, entre outros. Esta modalidade terapêutica já é amplamente estudada na medicina humana e vem sendo aplicada na medicina esportiva equina no tratamento de osteoartrite, porém sem estudos expressivos que comprovem sua segurança e eficácia. O objetivo do presente estudo é analisar os efeitos inflamatório e oxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos hígidos. Para tanto foram utilizadas 24 articulações tibiotársicas distribuídas aleatoriamente em três grupos. Nos grupos tratados foram realizadas três aplicações semanais de 15 ml de ozônio medicinal na concentração de 20 (GA) e 40 µg/ml (GB), no total de 10 aplicações. Já no grupo controle, as articulações receberam três aplicações semanais de 15 ml de O<sub>2</sub> (GC), também no total de dez aplicações. Foram realizados exames físico, de claudicação e ultrassonográfico, bem como análise do líquido sinovial, incluindo contagem total de células nucleadas e quantificação de proteína total, prostaglandina E<sub>2</sub>, Substância P, interleucina-1, interleucina-6, interleucina 10, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , ácido hialurônico (concentração e peso molecular) e condroitim sulfato. Para avaliação antioxidante no líquido sinovial foi determinada a atividade da superóxido desmutase e o *burst* oxidativo. Houve aumento da temperatura em GA e GB, os animais de GB apresentaram maior claudicação comparado aos demais grupos e observou-se aumento em todos os grupos dos escores ultrassonográficos. Na análise do líquido sinovial observou-se aumento nas contagens celulares de GA e GB, acompanhado de polimorfonucleares em GB, aumento da concentração de proteína no GA e GB, da atividade da superóxido desmutase e do índice de ativação em GA e diminuição da concentração de ácido hialurônico em todos os grupos e condroitim sulfato em GB e GC. Não houve diferença nas concentrações de PGE<sub>2</sub>, substância P, IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . A aplicação consecutiva do ozônio medicinal intra-

articular provocou alterações ultrassonográficas e no exame de claudicação, mais perceptível na dose de 40 ug/mL. Estas alterações estão mais relacionadas à distensão articular causada pela infusão de gases do que aos efeitos inflamatórios provindos do O<sub>3</sub>, uma vez que as análises de líquido sinovial não mostraram relevante inflamação. Conclui-se que a aplicação intra-articular de ozônio medicinal em equinos é segura em ambas as doses, e que experimentos devem ser realizados utilizando-se animais com diferentes doenças articulares, para que os benefícios da ozonioterapia sejam evidenciados e compreendidos.

Palavras-chave: Líquido sinovial. Interleucina. Sinovite.

## ABSTRACT

VENDRUSCOLO, C. P. **Evaluation of the inflammatory and oxidant effects of medical ozone in synovial joints of healthy horses.** [Avaliação dos efeitos inflamatório e oxidante do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos hígidos]. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Ozone therapy consists of the application of medicinal ozone, a mixture of ozone and oxygen, which through reactive oxygen species and products of lipoperoxidation exert various effects on the body, such as improvement of tissue oxygenation and metabolism, angiogenesis, increase of antioxidant mechanisms, improvement of the immune system, anti-inflammatory effect, among others. This therapeutic modality is already widely studied in human medicine and has been applied in equine sports medicine in the treatment of osteoarthritis, but without expressive studies that prove its safety and efficacy. The objective of the present study is to analyze the inflammatory and oxidizing effects of medicinal ozone on synovial joints of healthy horses. Twenty-four tibiotarsic joints were randomly distributed in three groups. In the treated groups three weekly applications of 15 ml of medicinal ozone in the concentration of 20 (GA) and 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (GB) were carried out for a total of 10 applications. Already in the control group, the joints received three weekly applications of 15 ml of  $\text{O}_2$  (GC), also in the total of 10 applications. Physical, lameness and ultrasound examinations were performed, as well as synovial fluid analysis, including total nucleated cell count and quantification of total protein, prostaglandin  $\text{E}_2$ , Substance P, interleukin-1, interleukin-6, interleukin-10, tumor necrosis factor- $\alpha$ , hyaluronic acid (concentration and molecular weight) and chondroitin sulfate. For the antioxidant evaluation in the synovial fluid, the activity of the superoxide dismutase and the oxidative burst was determined. There was an increase in temperature in GA and GB, GB animals presented greater lameness compared to the other groups and an increase was observed in all groups of ultrasound scores. In the synovial fluid analysis, GA and GB cell counts were observed, followed by polymorphonuclear cells in GB, increased protein concentration in GA and GB, superoxide desmutase activity and activation index in GA, and decrease in concentration of Hyaluronic acid in all groups and chondrocyte sulfate in GB and CG. There was no difference in the concentrations of  $\text{PGE}_2$ , substance P, IL-1, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ . The consecutive application of intra-articular medicinal ozone caused ultrasonography changes and lameness,

more noticeable at 40 ug / mL. These changes related more to joint distension caused by gas infusion than to inflammatory effects from O<sub>3</sub>, since synovial fluid analyzes did not show relevant inflammation. It is concluded that the intra-articular application of medical ozone in horses is safe in both doses, and that experiments must be performed using animals with different joint diseases, so that the benefits of ozonotherapy are evidenced and understood.

**Keywords:** Synovial fluid. Interleukin. Synovitis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - 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). ..... 30
- Figura 2 - Imagem fotográfica localizando (círculos vermelhos) os sensores do Lameness Locator instalados no equino a ser avaliado. .... 42
- Figura 3 - Imagens ultrassonográficas da evolução de uma articulação tratada do GA – São Paulo – 2017 ..... 56
- Figura 4 - Imagens ultrassonográficas da evolução de uma articulação tratada do GB – São Paulo – 2017 ..... 57
- Figura 5 - Imagens ultrassonográficas da evolução de uma articulação tratada do GC – São Paulo – 2017 ..... 58
- Figura 6 - Imagens ultrassonográficas das articulações tratadas com oxigênio e ozônio demonstrando a quantidade de gás encontrado – São Paulo – 2017..... 59
- Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21 e 28 dias de um equino do GA – São Paulo – 2017 ..... 67
- Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21 e 28 dias de um equino do GB – São Paulo – 2017 ..... 68
- Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21 e 28 dias de um equino do GC – São Paulo - 2017 ..... 68

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose dos pesos moleculares do ácido hialurônico do líquido sinovial nos momentos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de um equino do GA (A), GB (B) e GC (C) – São Paulo – 2017 ..... 70

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência cardíaca média dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo - 2017.....	50
Gráfico 2 - Frequência respiratória média dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	51
Gráfico 3 - Temperatura retal média dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017.....	51
Gráfico 4 - Quantidade média de equinos submetidos a aplicação intra-articular de oxigênio e ozônio apresentando claudicação – São Paulo – 2017.....	52
Gráfico 5 - Diferença da altura máxima da pelve (mm) medida através do aparelho Lameness Locator nos grupos GA, GB e GC nos diferentes momentos - São Paulo – 2017...	53
Gráfico 6 - Diferença da altura mínima da pelve (mm) medida através do aparelho Lameness Locator nos grupos GA, GB e GC nos diferentes momentos - São Paulo – 2017...	54
Gráfico 7 - Valores médios dos escores ultrassonográficos dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	55
Gráfico 8 - Contagens celulares médias do líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo - 2017.....	60
Gráfico 9 - Porcentagem média de neutrófilos do líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	61
Gráfico 10 - Concentrações médias da proteína no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	62
Gráfico 11 - Concentrações médias da ureia no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	62

Gráfico 12 - Concentrações médias da PGE <sub>2</sub> no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	63
Gráfico 13 - Concentrações médias da substância P no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	63
Gráfico 14 - Concentrações médias do TNF- $\alpha$ no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	64
Gráfico 15 - Concentrações médias do IL-1 no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	64
Gráfico 16 - Concentrações médias do IL-6 no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	65
Gráfico 17 - Concentrações médias do IL-10 no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	65
Gráfico 18 - Atividade enzimática média da SOD no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	66
Gráfico 19 - Concentrações médias do Ácido Hialurônico no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	66
Gráfico 20 - Concentrações médias do Condroitim Sulfato no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017 .....	67
Gráfico 21 - Porcentagem de Ácido Hialurônico de alto peso molecular nos momentos D0, 7, 14, 21 e 28 - São Paulo – 2017 .....	69

Gráfico 22 - Índice de ativação dos neutrófilos do líquido sinovial após exposição ao PMA medidos através da citometria de fluxo - São Paulo - 2017 .....	71
--	----

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Indicações gerais da ozonioterapia (CAKIR, 2014).....	31
Tabela 2 - Injeção intra-articular – conceitos de tratamento (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012).....	37
Tabela 3 - Quantidade média de equinos submetidos a aplicação intra-articular de oxigênio e ozônio apresentando claudicação – São Paulo - 2016.....	52
Tabela 4 - Valores médios dos escores ultrassonográficos dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo - 2016 .....	55
Tabela 5 - Contagens celulares médias do líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo - 2016 .....	60

## 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
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
g	Gramas
GAG	Glicosaminoglicano
GSH	Glutathione sintetase
GSR	Glutathione redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IV	Intravenosa
kDa	Quilodalton

Keap-1	Preoteína kelch 1 associada a ECH
LOP	Produtos de lipoperoxidação
LS	Líquido sinovial
M	Molar
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinase
ng	Nanograma
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
Nrf2	Fator nuclear eritróide-2 – relativo ao fator 2
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>3</sub>	Ozônio
OA	Osteoartrite
ON	Óxido nítrico
OSP	Proteína oxidativa de choque
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDA	1,3-diaminopropano-acetato
pg	Picograma
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGs	Proteoglicanos
pH	Potencial de hidrogênio
PLD	Fosfolipase D
PKC	Proteína kinase C
PMA	phorbolmiristato acetato
PRP	Plasma rico em plaquetas
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RP	Reeducação postural
SOD	Superóxido desmutase
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TPC	Tempo de preenchimento capilar
VAS	Escala visual análoga

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	23
2.1 ARTICULAÇÃO SINOVIAL.....	23
2.2. OSTEOARTRITE .....	25
2.3. DEFESA E REPARO DA CARTILAGEM ARTICULAR.....	27
2.4 OZONIOTERAPIA .....	28
2.4.1 Ozonioterapia na veterinária.....	34
2.4.2 Ozonioterapia intra-articular .....	35
3 JUSTIFICATIVA .....	38
4 OBJETIVOS .....	39
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	40
5.1 ANIMAIS .....	40
5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	40
5.2.1 Exame clínico para seleção dos animais .....	40
5.2.2 Exame ultrassonográfico.....	40
5.2.3 Exame radiográfico .....	41
5.2.4 Avaliação física dos animais .....	41
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	41
5.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA .....	42
5.6 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	44
5.6.1 Contagem total e diferencial de células, proteína e uréia .....	44
5.6.2 Determinação da PGE <sub>2</sub> e Substância P.....	45
5.6.3 Determinação da IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ .....	45
5.6.4 Determinação dos GAGs.....	45
5.6.5. Mensuração do peso molecular do AH do líquido sinovial.....	46

5.6.6 Análise do <i>burst</i> oxidativo por citometria de fluxo.....	47
<b>7 RESULTADOS</b> .....	50
7.1 AVALIAÇÃO FÍSICA DOS ANIMAIS.....	50
7.1.1 Avaliação física diária.....	50
7.1.2. Análise de claudicação.....	51
7.2 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA.....	54
7.3 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL.....	60
7.3.1 Contagem celular total e diferencial.....	60
7.3.2 Concentração de proteína e uréia.....	61
7.3.3 Concentração de PGE <sub>2</sub> e Substância P.....	62
7.3.4 Concentração de citocinas.....	63
7.3.5 Atividade da enzima Superóxido desmutase.....	65
7.3.6 Concentração dos GAGs.....	66
7.3.7 Peso Molecular do AH.....	68
7.3.8 <i>Burst</i> oxidativo.....	71
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

Os equinos têm sido amplamente utilizados tanto para o trabalho quanto para o esporte. A crescente utilização desses animais nas diferentes modalidades atléticas tem gerado uma série de lesões articulares como a osteoartrite (OA), sendo responsável por aproximadamente 60% das claudicações (MCILWRAITH, 2010).

A OA é considerada uma doença progressiva que altera todos os tecidos da articulação, se apresentando como degeneração da cartilagem, também acompanhada de inflamação sinovial, leve a moderada, e alteração da estrutura do osso subcondral (ROUSSEAU; GARNERO, 2012).

A terapia convencional é formulada com o objetivo de diminuir dor e desconforto, envolvendo normalmente a utilização de anti-inflamatórios não esteroidais sistemicamente e de esteroidais intra-articulares (IA). Por tratar-se de uma afecção crônica necessita de terapia prolongada, geralmente acompanhada dos efeitos colaterais da terapia com anti-inflamatórios (TRUMBLE, 2005).

Sabe-se desde 1955, com Wheat (1955), que é necessário um período de repouso após a aplicação IA de corticoide, para que a lesão possa cicatrizar. Normalmente esse período não é respeitado, “acabando como um ciclo destrutivo sem fim que é posto em movimento, e se continuado, produzirá uma artropatia por esteroide podendo deixar o animal sem utilidade”, como escrito por autor anônimo (ANÔNIMO, 1958). Estes equinos normalmente apresentam queda de performance, sendo constantemente medicados e tendo como final comum encerramento precoce das atividades.

Na procura por terapias que impeçam a progressão da degeneração articular, com o objetivo de diminuir a inflamação e a progressão das artropatias, tem-se estudado a ozonioterapia, que possui efeitos colaterais mínimos, quando corretamente aplicada, e pode ser utilizada em animais em competição, que são constantemente submetidos ao controle de antidopagem.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ARTICULAÇÃO SINOVIAL

A OA é o tipo de artrite mais comum em humanos e equinos, sendo a causa mais frequente de claudicação, gerando perda de dias de treinamento e podendo levar a aposentadoria precoce dos animais acometidos (SUTTON et al., 2009).

Na articulação saudável, a cartilagem apresenta-se leitosa e opaca nas regiões mais espessas e com coloração azulada nas regiões mais finas, sendo formada principalmente pela cartilagem hialina. Este tecido é constituído de moléculas de agregam resistentes à compressão, de colágeno que é forte e resistente à tensão e de um fluído 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 ovoides e fibras colágenas orientadas tangencialmente. Esta camada funciona como uma barreira ao sistema imune. Sua destruição acarretará alterações de 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.

O condrócito é uma célula arredondada que 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 provoca a deformação da matriz produzindo sinais mecânicos, elétricos e fisiológicos, resultando no 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) amorfos, 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 a matriz (MARCELINO; MCDEVITT, 1995).

Os PGs consistem de um núcleo de proteína e 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 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. OSTEOARTRITE

A OA é o tipo de artrite mais comum em humanos e equinos e causa mais frequente de claudicação, prejudicando o treinamento e podendo levar a aposentadoria precoce dos animais acometidos (SUTTON et al., 2009). Durante a vida, os condrócitos degradam e sintetizam as macromoléculas da matriz, sempre mantendo a homeostase. Os mecanismos que controlam esse balanço ainda não são totalmente compreendidos, mas as citocinas parecem ter um importante papel, sendo as principais a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento dependente de insulina-1 (IGF-1) e fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), sendo que os dois primeiros agem na destruição da MEC e os dois últimos na sua síntese (BUCKWALTER; MANKIN, 1997b).

Quando ocorre a quebra do equilíbrio entre síntese e degradação da cartilagem articular, seja por trauma anormal em articulação normal ou trauma normal em estruturas anormais, surgem lesões que geram aumento das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e TNF- $\alpha$ . Estas, por sua vez, estimulam os condrócitos a liberarem e ativarem as enzimas metaloproteinases (MMP), entre elas as collagenases e estromelinases, e serino-proteinases e a produzir a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), iniciando quebra das fibrilas colágenas, PGs e glicoproteínas, culminando com a degradação da MEC. A PGE<sub>2</sub> desencadeia a vasodilatação, desmineralização óssea, ativação do plasminogênio, liberação de cicloxigenases, sensibilização das terminações nervosas e aumento da dor (MCILWRAITH et al., 2016).

Tanto a IL-1 quanto a TNF- $\alpha$  aumentam a taxa de degradação de PGs e diminuem sua síntese no condrócito (RICHARDSON; DODGE, 2000; SÉGUIN; BERNIER, 2003). Ambos exercem diversas ações em diferentes tipos celulares, como aumento da reabsorção óssea e cartilágnea (KUMAR et al., 2001), estímulo de outras células a produzirem citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER, 1999; LISIGNOLI et al., 1999), produção de enzimas proteolíticas (SPIERS et al., 1994), liberação de fatores pró-angiogênicos (HONORATI; CATTINI; FACCHINI, 2004), produção de óxido nítrico (ON) (PALMER et al., 1996; GOODSTONE;

HARDINGHAM, 2002) e indução da apoptose dos condrócitos (SCHUERWEGH et al., 2003).

Em menor escala, temos ação de outras citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-17 (IL-17) e interleucina-18 (IL-18). A IL-6, ao agir sobre os condrócitos e sinoviócitos, inibe a síntese de PGs, reduz a proliferação de condrócitos, aumenta a atividade da MMP-2 e aumenta o catabolismo de PGs mediados pela agreganase (JIKKO et al., 1998; DAMIENS et al., 2000; FLANNERY et al., 2000). A IL-8 atua sobre monócitos, sinoviócitos, condrócitos e osteoblastos, recrutando leucócitos (ENDO et al., 1994), provocando quimiotaxia de neutrófilos (LEONARD; YOSHIMURA, 1990), estimulando a liberação de citocinas pro-inflamatórias (YU et al., 1994) e provocando diferenciação hipertrófica e calcificação dos condrócitos (MERZ et al., 2003). A IL-17 atua sobre os linfócitos-T ativados induzindo a síntese de ON e MMP, aumentando a produção de IL-1, IL-6 e IL-8 e estimulando a liberação de fatores pró-angiogênicos (SHALOM-BARAK; QUACH; LOTZ, 1998; FAHMI et al., 2001; HONORATI et al., 2006). Já a IL-18 exerce sua função nos macrófagos e fibroblastos sinoviais estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, induzindo a síntese de ON (GRACIE et al., 1999), agiogênese (CHO et al., 2006), provocando a hiperplasia sinovial e recrutando células inflamatórias (LEUNG et al., 2000), induzindo a apoptose dos condrócitos, reduzindo a expressão dos componentes da MEC e aumentando a liberação de fibronectina, mediador da destruição da cartilagem (JOHN et al., 2007).

Compondo ainda este complexo quadro inflamatório articular temos o estresse oxidativo, provocado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando o nível oxidativo não excede a capacidade celular, ele é vital no processo fisiológico de diferenciação celular, fosforilação proteica, transcrição do fator de ativação, apoptose, imunidade celular, esteriodogênese e defesa celular contra microrganismos (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993). Em condições patológicas, há produção excessiva de EROs que pode comprometer a funcionalidade celular ao danificar lipídios celulares, proteínas e DNA. As EROs modificam proteínas por oxidar aminoácidos, prejudicando a atividade biológica, alterando a estrutura proteica e acumulando proteínas degradadas no tecido (HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003).

As EROs são capazes de degradar vários componentes articulares incluindo colágeno, PG e AH (BATES; JOHNSON; LOWTHER, 1985). O AH quando degradado perde sua capacidade de inibir a fagocitose e a produção de radicais livres, as EROs por sua vez serão liberados em maior quantidade, gerando diminuição do aporte energético para os condrócitos,

podendo levar a morte celular (KVAM et al., 1995). Os radicais livres são capazes, ainda, de quebrar diretamente as cadeias colágenas (RATHAKRISHNAN et al., 2009) e diminuir a síntese de PGs (BATES; JOHNSON; LOWTHER, 1985).

Dimock, Siciliano e McIlwraith (2000) avaliaram o LS de articulações normais e acometidas, com fraturas em lasca e osteocondrite dissecante, quanto ao conteúdo de proteína carbonila, como marcador do dano oxidativo, e a atividade antioxidante sinovial. Os autores observaram maior dano oxidativo nas articulações afetadas, comprovando o papel das EROs na inflamação articular, corroborando com o estudo de Auer, Ng e Wright (1993). Curiosamente, o poder antioxidante também foi maior nas articulações afetadas, ao contrário do que observaram Koster, Biemond e Swaak (1986) na OA. Dois fatores podem explicar esse achado: a administração de fenilbutazona pré-cirúrgica e o fato de serem alterações agudas, caracterizadas por aumento dos mecanismos de defesa, ao contrário de alterações crônicas, nas quais já há depleção dessas defesas.

### 2.3. DEFESA E REPARO DA CARTILAGEM ARTICULAR

Após a lesão ocorre cicatrização, restauração da integridade estrutural e funcional, ou reparo, reposição das células lesadas ou perdidas e da matriz por novas células e matriz, mas não necessariamente restaurando a estrutura e função originais como ocorre na regeneração. A resposta limitada da cartilagem à lesão tecidual ocorre devido à baixa atividade mitótica, a síntese ineficiente das células e vascularização inexistente. Há uma incapacidade de resposta natural de reparo partindo de tecidos adjacentes em produzir tecidos com propriedades morfológicas, bioquímicas e biomecânicas idênticas a da cartilagem articular normal, formando normalmente fibrocartilagem (BAXTER, 2011). Participando desta etapa temos o IGF-1 e TGF- $\beta$  que estimulam a síntese da MEC e a proliferação celular (BUCKWALTER; MANKIN, 1997b).

As citocina anti-inflamatórias que participam desta etapa são a interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) e a antagonista de receptor de IL-1 (IL-1Ra). Atuando sobre os condrócitos e sinoviócitos temos a IL-4, que suprime a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e da IL-1 (COPE et al., 1993), reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, vascularização e degradação de cartilagem (WOODS et al., 2001), inibe o estímulo da IL-1 para a síntese de PGE<sub>2</sub> (SEITZ et al., 1994), reduz a transcrição e atividade da MMP-3 nos condrócitos articulares (NEMOTO et al., 1997), aumenta a expressão e produção de IL-1Ra pelos sinoviócitos (SEITZ et al., 1994), reduz a absorção óssea ao diminuir a formação de

osteoclastos (GOODSTONE; HARDINGHAM, 2002) e inibe a apoptose de sinoviócitos, contribuindo para hiperplasia sinovial na OA (SCHUERWEGH et al., 2003).

A IL-10 diminui a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 por sinoviócitos, condrócitos e macrófagos (HART et al., 1995) e inibe a liberação de PGE<sub>2</sub> pelos sinoviócitos (TAKAFUJI; MCILWRAITH; HOWARD, 2002). A IL-13 age inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1, aumentando a expressão de RNAm de IL-1Ra, suprimindo a síntese de MMP-3 (JOVANIC et al., 1997), inibindo a apoptose de sinoviócitos, contribuindo para hiperplasia sinovial (RELIC et al., 2001) e revertendo a produção de PGE<sub>2</sub> (ALAAEDDINE et al., 1999). A IL-1Ra atua na membrana sinovial competindo com o receptor de IL-1 e inibindo a produção de MMP, diminuindo a ativação de parte do processo de inflamação e destruição articular (SMITH et al., 1991).

## 2.4 OZONIOTERAPIA

A ozonioterapia consiste na utilização do ozônio medicinal (O<sub>3</sub>), formado por uma mistura de oxigênio (O<sub>2</sub>) e ozônio, contendo não menos que 95% de oxigênio e não mais que 5% de ozônio (BOCCI, 2006b). O O<sub>3</sub> em altas concentrações é tóxico, porém há uma “janela terapêutica” com doses variando de 10 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  $\mu\text{g/ml}$ , o gás é prontamente neutralizado pelos antioxidantes sanguíneos, sendo biologicamente ineficiente por não atingir o limiar terapêutico (SAGAI; BOCCI, 2011a).

O objetivo da ozonioterapia é provocar um estresse oxidativo agudo controlado e adequado, não sendo placebo, e transitório, sem gerar estresse oxidativo crônico. É de extrema importância não ultrapassar a capacidade antioxidante do organismo para não causar toxicidade. A estimulação e ativação do sistema antioxidante é atingida através de pequenos e repetidos choques oxidativos (BOCCI, 2011).

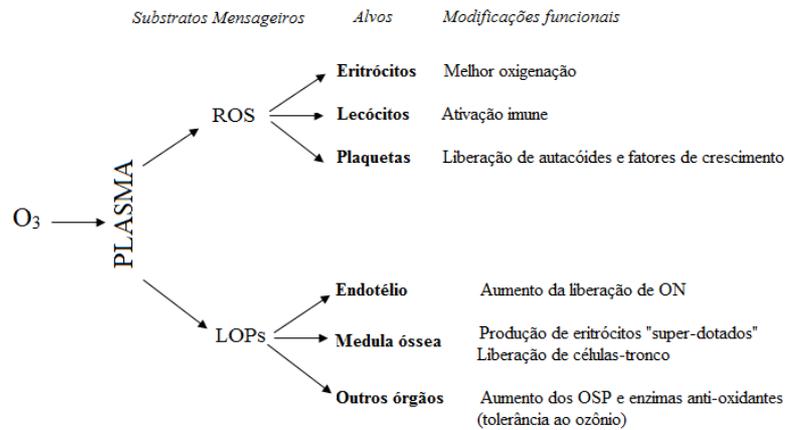
Para tanto, esta pró-droga se dissolve em poucos minutos no plasma e desaparece, gerando mensageiros essenciais em suas ações terapêuticas, as EROs, principalmente o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), responsável pelos efeitos imediatos, e uma mistura de produtos de lipidioperoxidação (LOPs), responsável pelos efeitos tardios (SAGAI; BOCCI, 2011a). 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 (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012).

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

- melhora na oxigenação e circulação sanguínea para os tecidos isquêmicos devido ao efeito do 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: glutathione peroxidase (GSH), glutathione reductase (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 1** - 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).



A administração de ozônio é bastante segura com poucos efeitos adversos relatados, sendo contraindicada em casos de deficiência de enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, hipotireoidismo 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  $O_3$ . 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 diversas afecções como em 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 (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 afecções.

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

<b>Especialização</b>	<b>Patologia</b>
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, osteoartrite, artropatia, periartrite, artrite reumatóide
Angiologia	Insuficiência venosa, úlcera diabética, artropatia, coronaropatia, gangrena, úlcera pós-flebite, vasculopatia periférica
Ginecologia	Infecção 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, IA, prolo/escleroterapia, azeite de oliva ozonizado por via tópica ou oral, auricular, intra-peritoneal, subcutâneo, entre outras (BOCCI, 2006a; 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 O<sub>3</sub> 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, 2011).

Em pacientes com hepatite crônica severa (XI-BING et al., 2010) a auto-hemoterapia maior provocou diminuição da alanina aminotransferase, bilirrubina total sérica, aumento da atividade da protrombina e aumento da albumina sérica. O fluxo sanguíneo renal melhorou, com diminuição da atividade plasmática da renina, angiotensina II e aldosterona, resultando em menor dano renal e aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes. Lintas et al. (2013) observaram em pacientes com esclerose múltipla submetidos à auto-hemoterapia ozonizada grande melhora na atividade da citocromo-c-oxidase, reduzindo assim o estresse oxidativo crônico e melhorando a função das mitocôndrias das células neurais. Já na doença pulmonar obstrutiva crônica houve melhora na distrição respiratória e no teste de tolerância ao

exercício, porém sem alteração significativa no teste de função pulmonar e hemogasometria arterial (BORRELLI; BOCCI, 2014).

A administração intra-retal também é efetiva, porém menos controlada, em casos de doença coronária (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2012) e OA (MAWSOUF et al., 2011). Na doença arterial coronariana houve melhora no tempo de protrombina, porém sem alteração no tempo de coagulação. Observou-se ainda diminuição dos biomarcadores de oxidação lipídica e protéica, gerando menor produção de radicais livres e melhora na detoxificação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2012). Já na OA, Mawsouf et al. (2011) testaram o efeito de aplicações de O<sub>3</sub> pré e pós indução de OA em ratos, concluindo que o tratamento pré-OA exerceu efeitos protetores importantes, preservando os parâmetros analisados dentro dos padrões normais. Já no tratamento pós-OA houve gradual diminuição dos antioxidantes, obtendo valores muito próximos ou abaixo dos normais.

A solução salina ozonizada foi utilizada em alguns estudos para tratamento de cistite com resultados promissores (BAYRAK et al., 2014; NEIMARK et al., 2014). Bayrak et al. (2014) observaram redução significativa da quantidade de mastócitos e leucócitos e manutenção da integridade da mucosa no tratamento com solução salina ozonizada. Neimark et al. (2014) trataram mulheres com cistite e disúria com solução salina ozonizada intravesical ou IV, observando redução de 72% e 80% da hiperemia de mucosa e de 87% e 64% do edema nos grupos tratados intravesical e IV, respectivamente. Houve, ainda, melhora na circulação sanguínea e das análises histopatológicas, sendo os melhores resultados obtidos no grupo tratado por via IV. Bonforte et al. (2013) trataram mulheres com infecção urinária recorrente provocadas por *Morganella morganni* e *Escherichia coli* através de instilações de solução salina ozonizada intravesicais em volumes crescentes. Houve completa remissão dos sintomas com resultados de cultura negativos. Ainda neste estudo, uma vulvovaginite por *Candida* sp foi tratada com lavagens ozonizadas, e após 6 dias de tratamento a mucosa vaginal estava normal.

No tratamento de lombalgia, a ozonioterapia tem obtido resultados superiores aos procedimentos cirúrgicos. Magalhães et al. (2012) trataram 13 pacientes com dor lombar crônica não responsiva ao tratamento cirúrgico através de aplicações de O<sub>3</sub> via endoscopia espinal. A dor foi reduzida em 43,7% dos pacientes, sendo acompanhada de redução da dor na perna em 60,9% casos, havendo melhora nos escores do Index de Deficiência de Oswestry em 44% dos tratados. Os melhores resultados foram obtidos em casos sem dor neuropática, reduzindo a utilização de analgésicos em 38,5% e descontinuando o uso em 30,8% dos pacientes. Outro estudo (APUZZO, 2014) comparou reeducação postural (RP) com aplicações

intramusculares bilaterais ao local da lesão e a associação dos dois tratamentos. Apesar dos casos mais severos serem tratados com O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>, com ou sem RP, estes grupos apresentaram maior diminuição da dor quando comparado a RP apenas. A porcentagem de pacientes sem recorrência do quadro foi de 64,2% no grupo O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>+RP, 59,6% no grupo O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> e 24,1% no grupo RP.

A associação de ozonioterapia ao plasma rico em plaquetas (PRP) foi realizada por Fiorela e Schwartz (2013) para tratamento de 60 pacientes com hérnia de disco refratários à terapia conservativa. O tratamento consistiu em aplicações de O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> e procaína paravertebrais e interpofisária, seguida de aplicações intradiscal e periradicular de O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> e, finalmente, de PRP ozonizado intradiscal e epidural. Houve progressiva diminuição da dor à palpação dos processos espinhosos e, na escala visual análoga (VAS), de 7-8 para 3-4 com 15 dias, 2-3 com um mês e 0-1 após 4 meses. A satisfação com o tratamento foi avaliada como boa em 90% dos pacientes, razoável em 8,3% e ruim em 1,6%. Ainda se associando O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> ao PRP, Anitua et al. (2015) testaram dois métodos de ozonização, um por fluxo contínuo e outro misturando-se o derivado sanguíneo em uma seringa. No fluxo contínuo houve inibição da ativação plaquetária após a aplicação de cloreto de cálcio, dificultando a formação da rede de fibrina e, conseqüentemente, diminuindo a liberação de fatores de crescimento, o que não ocorreu quando misturados na seringa.

A aplicação intraperitoneal de O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mostrou-se capaz de prevenir o aparecimento de aderências uterinas em modelo experimental (UYSAL et al., 2012). Os autores observaram a redução das enzimas SOD, GSH e dos níveis de TNF- $\alpha$  no líquido peritoneal. Após a indução de peritonite, Souza et al. (2010) trataram os ratos com aplicações de O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> e apenas O<sub>2</sub>, constatando-se redução na citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos-1 e de IL-10, no entanto sem diferença nos níveis de IL-6 e aumento da taxa de sobrevivência.

Kazancioglu, Ezirganli e Aydin (2013) e Ozdemir et al. (2013) estudaram o efeito do O<sub>3</sub> tópico em defeitos ósseos criados na calvária de ratos. Nos grupos tratados houve melhora histomorfométrica, com maior porcentagem de área óssea, maior número de osteoblastos e significativa neoformação óssea (OZDEMIR et al., 2013). Quando comparado ao laser de baixo nível houve melhora histomorfométrica e maior área de formação óssea (KAZANCIUGLU; EZIRGANLI; AYDIN, 2013).

### 2.4.1 Ozonioterapia na veterinária

Existem vários estudos com O<sub>3</sub> medicinal na Medicina humana e em animais de laboratório, porém, na Medicina Veterinária, ele é ainda pouquíssimo estudado. Na literatura há apenas alguns estudos com equinos (ALVES et al., 2004; BALLARDINI, 2005, 2006; GARCIA LIÑEIRO et al., 2009) e bovinos (OGATA; NAGAHATA, 2000; ZOBEL et al., 2012).

Alves et al. (2004) testaram o efeito da solução fisiológica ozonizada após lesão de isquemia e reperfusão experimentais, observando menor desprendimento epitelial da mucosa, infiltrado de neutrófilo, hemorragia e edema. Outro estudo utilizou a solução fisiológica ozonizada em equinos hígdidos após a sensibilização com auto-hemoterapia maior na dose de 30 µg/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 hígdidos, 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.

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 O<sub>3</sub> 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 O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> 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.

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.

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 uma 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 O<sub>3</sub>, melhorando o ambiente para a fecundação com maior eficácia que a solução com antibiótico utilizada (ZOBEL et al., 2012).

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 comparado aos demais grupos (ZOBEL; TKALČIĆ, 2013).

#### **2.4.2 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 não foram encontrados estudos envolvendo a aplicação intra-articular de O<sub>3</sub> medicinal em equinos.

Acredita-se que o O<sub>3</sub>, quando 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – EROs) e fibroblastos, aumentando a produção da MEC e da cartilagem articular; c) provável

inibição da liberação de bradicinina e citocinas pró-inflamatórias gerando reabsorção do edema e diminuição da dor; d) liberação de IL-1Ra e outros receptores e antagonistas capazes de neutralizar citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-8, IL-12, IL-15 e TNF- $\alpha$ ; e) liberação de citocinas imunossupressivas (TGF- $\beta$  e IL-10), que devem diminuir a inflamação (ILIAKIS et al., 2001; PAOLONI et al., 2009). Dentre os diversos fatores de crescimento, TGF- $\beta$ 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; HEYMAN; RÉDINI, 2002; JANI et al., 2012).

Os mensageiros da ozonioterapia, EROs e LOPs, agem provavelmente em duas fases no LS. Na primeira fase há inibição da inflamação, diminuindo a PGE<sub>2</sub> e citocinas pró-inflamatórias através da diminuição da fosfolipase A<sub>2</sub>, inibição da cicloxigenase I e II, e redução da calicreína e bradicinina. Ele pode, ainda, diminuir a liberação de serotonina e MMPs, como colagenase, agrecanase e gelatinase, evitando a destruição da cartilagem articular (BOCCI, 2011; BURIC; RIGOBELLO; HOOPER, 2014). Na segunda fase, o O<sub>3</sub> 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- $\beta$ ), estimulando a neoangiogênese, a síntese de ON e liberação e 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, 2011).

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  $\mu$ g/ml de O<sub>3</sub> (D) e grupo tratado com 70  $\mu$ g/ml de O<sub>3</sub> (E). No grupo D observou-se cartilagem 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- $\alpha$  e dos níveis de RNAm para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e redução no estresse oxidativo articular no grupo tratado com O<sub>3</sub> após indução de inflamação articular.

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

<b>Indicação</b>	<b>Forma de aplicação</b>	<b>Concentração de ozônio</b>	<b>Volume</b>	<b>Quantidade de ozônio</b>	<b>Frequência de tratamento</b>
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

Em estudo clínico (MISHRA et al., 2011), pacientes com OA em articulação femurotibiopatelar foram tratados com três aplicações de O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> 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). 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 O<sub>3</sub> utilizada.

A associação de duas vias de aplicação de O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>, intra-retal (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.

Várias pesquisas foram conduzidas utilizando-se ozonioterapia em animais de laboratório e humanos, contudo, ainda não foram publicados estudos focando a utilização do O<sub>3</sub> em articulações sinoviais de equinos. Previamente à aplicação desta terapia em articulações lesionadas, faz-se necessário conhecer a reação dos tecidos articulares, frente a aplicação desse gás, ou seja, conhecer a segurança do método antes de avaliar sua eficácia.

### **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.

Estas lacunas, somadas à escassez 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 é avaliar os efeitos inflamatórios e oxidantes da aplicação de ozônio medicinal intra-articular em equinos por meio do exame físico, ultrassonográfico e análise de LS. A hipótese é de que a utilização de ozônio não estimule processos inflamatórios e que o choque oxidativo controlado provoque aumento da capacidade antioxidante nas articulações sinoviais de equinos, mostrando sua segurança; e que minimize possíveis efeitos causados pelas artrocenteses repetitivas.

## 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 6409110215.

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 e no Laboratório Especializado em Análises Científicas (LEAC).

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 24 articulações tibiotársicas de 14 equinos hípidos, não atletas, sem histórico de doenças articulares, machos, da raça Puro Sangue Árabe, com idade de dois a quatro anos. As articulações foram divididas aleatoriamente em grupos de oito, sendo o grupo controle tratado com oxigênio a 100%, o grupo A tratado com ozônio na concentração de 20 µg/ml e o grupo B tratado com ozônio na concentração e 40 µg/ml.

Os animais ficaram alocados em baias no Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP. Após período de adaptação, foram vermifugados, receberam 1 kg de concentrado comercial duas vezes ao dia, feno de coast cross e água *ad libidum*.

### 5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

#### 5.2.1 Exame clínico para seleção dos animais

Os animais selecionados não apresentavam histórico de doenças articulares. Ao exame ultrassonográfico e radiográfico não foram encontradas alterações compatíveis com doença articular. No exame físico não foram observadas alterações na inspeção e palpação das articulações.

#### 5.2.2 Exame ultrassonográfico

Para a realização do exame ultrassonográfico, os equinos foram contidos em tronco apropriado para espécie. As articulações tibiotársicas foram tricotomizadas e foi utilizado gel

para condução. O aparelho utilizado foi o ultrassom ESAOTE MyLab 30 VETGOLD®, com transdutor linear de 7,5 a 12 MHz, utilizando a frequência de 10 a 12 MHz.

### 5.2.3 Exame radiográfico

Para realização do estudo radiográfico, foi utilizado o aparelho Sound EKLIN Mark 2®. Foram realizadas quatro projeções da articulação tibiotársica, sendo elas: dorso-palmar, latero-medial, dorsolateral-palmaromedial oblíqua e dorsomedial-palmarolateral oblíqua.

### 5.2.4 Avaliação física dos animais

A avaliação física consistiu na aferição das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), motilidade, tempo de preenchimento capilar (TPC), coloração de mucosa e mensuração da temperatura retal.

## 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As 24 articulações tibiotársicas foram divididas aleatoriamente em três grupos:

**GRUPO A (GA):** Grupo tratado 1 – receberam três aplicações semanais de 15 ml de ozônio medicinal na concentração de 20 µg/ml, totalizando 10 aplicações.

**GRUPO B (GB):** Grupo tratado 2 – após 15 dias do término do período de observação do grupo tratado 1, receberam nas articulações contralaterais do grupo A três aplicações semanais de 15 ml de ozônio medicinal na concentração de 40 µg/ml, totalizando 10 aplicações.

**GRUPO C (GC):** Grupo controle – oito articulações de oito equinos diferentes, não utilizados nos grupos A e B, receberam três aplicações semanais de 15 ml de O<sub>2</sub>, totalizando 10 aplicações.

## 5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A avaliação física consistiu na auscultação das FC, FR e movimentação cecal, mensuração da temperatura retal, inspeção das mucosas e TPC. A avaliação física foi realizada no momento 0 (controle) para seleção dos animais e diariamente até o final do experimento.

O exame de claudicação ocorreu nos dias 0 (controle) e diariamente até o final do experimento, e consistiu de:

A) inspeção (aumento de volume, postura antálgica em estação).

B) palpação (calor, dor, consistência)

C) dinâmica (presença de claudicação), detectada, avaliada e quantificada pelo equipamento Lameness Locator™, previamente aos tratamentos.

A presença de claudicação nos cavalos foi avaliada de forma objetiva, utilizando equipamento<sup>1</sup> 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). Os movimentos captados são convertidos em vetores e interpretados pelo programa, que atribui um número ao vetor resultante. Para os membros pélvicos, a amplitude total da movimentação da pelve não pode exceder + ou - 3.

**Figura 2** - Imagem fotográfica localizando (círculos vermelhos) os sensores do Lameness Locator instalados no equino a ser avaliado.



Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

## 5.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

A avaliação ultrassonográfica foi realizada no momento 0, 7, 14, 21 e 28 dias depois da aplicação dos gases. Os exames foram realizados com o equipamento de ultrassom

---

<sup>1</sup>LamenessLocator®

ESAOTE MyLab 30 VET, com transdutor eletrônico linear multifrequencial de 7,5 a 12 MHz. Neste exame foram avaliados segundo Silva (2014):

- *Líquido sinovial segundo o aspecto*: anecóico em quantidade normal (0), efusão sinovial anecóica (1), heterogêneo predominando líquido anecóico (2), predomínio de material amorfo heterogêneo e líquido anecóico (3) e material amorfo heterogêneo e/ou líquido com material denso e com focos hiperreflexivos em suspensão (4)

- *Líquido sinovial segundo sua quantidade*: sem alteração (0), quantidade aumentada até metade da fisiológica (1), até o dobro da fisiológica (2), mais que o dobro da fisiológica (3) e três vezes ou mais que a fisiológica (4)

- *Cápsula articular segundo a espessura*: sem alteração (0), espessura aumentada até 20% em áreas localizadas (1), aumento da espessura em toda a extensão (2) e aumento maior que 20% em toda a extensão (3)

- *Cápsula articular segundo a área de inserção*: sem alterações (0), discreta irregularidade (1), irregularidade evidente (2) e acentuada irregularidade (3)

- *Cápsula articular segundo aspecto*: ecogenicidade homogênea (0), presença de áreas hipocogênicas localizadas (1) e presença de áreas hipocogênicas e de focos hiperecogênicos (2)

- *Ligamentos periarticulares segundo aspecto*: sem alteração (0), heterogêneo com áreas hipocogênicas (1), heterogêneos com áreas hiperecogênicas (2) e lesão massiva e/ou ruptura (3)

- *Ligamentos periarticulares segundo área de origem/inserção*: sem alterações (0), presença de irregularidades (1), proliferação óssea (2), proliferação óssea intensa (3) e proliferação intensa e presença de fragmentos (4)

- *Cápsula articular e sinóvia quanto a vascularização*: sem observação de fluxo sanguíneo (0), vascularização visível/pontos coloridos esparsos e em pequena quantidade (1) e vascularização aumentada/pontos coloridos em blocos e em grande quantidade (2)

- *Superfície articular segundo a espessura da cartilagem articular*: linha de cartilagem bem definida, contínua, lisa e facilmente identificável (0), linha de cartilagem de difícil identificação, porções observadas lisa e contínua e detectada em mais de 50% da superfície avaliada (1), linha de cartilagem de difícil identificação, porções observadas descontínua e rugosa (2), sem identificação da linha de cartilagem, presença de fragmento no líquido articular (3) e ausência de linha de cartilagem e alteração difusa da superfície do osso subcondral (4)

- *Ossos subcondrais segundo superfície*: superfície lisa (0), superfície irregular (1) e presença de áreas de depressão (2)

- *Ossos subcondrais segundo presença de osteófito*: borda articular lisa (0), borda articular rugosa (1), presença de osteófitos (2) e osteófitos grandes/fragmentos (3)

Os achados receberam escores que estão descritos entre parênteses após cada descrição sendo que estes escores poderão variar de 0 a 34.

## 5.6 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

As amostras do LS foram colhidas previamente às aplicações com O<sub>3</sub> ou O<sub>2</sub> e 7 dias após o fim do tratamento, visando análise comparativa entre a articulação tratada e controle. Foram colhidas amostras de 4 ml de LS das articulações tibiotársicas.

Após cada coleta, as amostras de LS foram imediatamente centrifugadas<sup>2</sup> a 4°C e 2000 G, durante 15 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos de 2 ml e congelado a -80°C para futuras análises.

O acesso escolhido para a artrocentese foi medialmente à veia safena, logo abaixo do maléolo medial da tíbia, na face dorsomedial do tarso. O local de punção foi tricotomizado e realizada antissepsia com o uso de clorexidina degermante a 2% e clorexidina alcoólica 0,5%. O LS foi acondicionado em tubos secos e contendo heparina sódica.

### 5.6.1 Contagem total e diferencial de células, proteína e uréia

A contagem total de células nucleadas foi realizada em câmara de Neubauer<sup>3</sup>, com alíquotas de LS *in natura*. As amostras contaminadas com sangue foram diluídas na proporção de 10 µl de LS para 90 ou 190 µL de solução fisiológica 0,9%, e o número de células viáveis foi ajustado para x10 e x20, respectivamente. Para o diferencial celular foram confeccionados esfregaços 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 uréia foi realizada através do método da uréase-glutamato desidrogenase.

---

<sup>2</sup> Centrífuga 5417 R - Eppendorf

<sup>3</sup> Neubauer - Hirschmann - EM - Techcolor

### 5.6.2 Determinação da PGE<sub>2</sub> e Substância P

A quantificação de PGE<sub>2</sub> e Substância P foram realizadas por ELISA, com o *kit* Prostaglandin E<sub>2</sub> e Substância P EIA Kit – Monoclonal da empresa Cayman Chemical Company (EUA). O LS utilizado estava acondicionado em tubos tipo eppendorf sem anticoagulante, mantidos à temperatura de -80°C.

*EIA Buffer* foi adicionado aos poços de ligação inespecífica (100µl) e aos poços de máxima ligação (50 µl). A curva padrão foi feita em duplicata, adicionando 50 µl em cada poço. Em seguida, 50 µl das amostras de LS foram adicionadas em duplicata. Com exceção dos poços de atividade total e branco, os demais receberam 50 µl de *AChE Tracer*. O anticorpo monoclonal foi adicionado na quantidade de 50 µl com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e em seguida lavada cinco vezes com *Wash Buffer*. Foram adicionados 200 µl de *Ellman's Reagent*, preparado imediatamente antes de sua utilização, em todos os poços, e apenas o poço de atividade total recebeu também 5 µl de *Tracer*. A placa foi protegida da luz e mantida no agitador<sup>4</sup> por 60 a 90 minutos para PGE<sub>2</sub> e de 90 a 120 para Substância P. A absorbância da amostra foi lida à 405nm em leitor<sup>5</sup> de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 7.8 a 1000 pg/ml para PGE<sub>2</sub>, e 3,9 a 500 pg/ml, para Substância P, pelo programa Gen5. Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

### 5.6.3 Determinação da IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$

A quantificação das citocinas foi realizada por meio do kit MILLIPLEX ® MAP (Equine Cytokine/Chemokine Panel) da EMD Millipore Corporation, baseada na tecnologia Luminex xMAP®. O LS utilizado estava acondicionado em tubos tipo eppendorf sem anticoagulante, mantidos à temperatura de -80°C.

### 5.6.4 Determinação dos GAGs

Para a determinação de GAGs foram utilizadas as amostras acondicionadas em tubos tipo eppendorf sem anticoagulante a -80°C.

---

<sup>4</sup> Mini Shaker PSU-2T - Biosan

<sup>5</sup>ELx808 - Biotek

Cinquenta microlitros de cada amostra foram adicionados a 100 µl de protease alcalina P126 maxatase (4mg/ml Tris HCl 0,05M pH 8,0) e incubados em banho-maria a 50°C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas<sup>6</sup> em temperatura ambiente a 3000 G por 15 minutos para a remoção de resíduos insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 600 µl e seco em vácuo<sup>7</sup> por pelo menos 2 horas a 45°C. As amostras foram ressuspendidas em 25µl de água destilada.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05M e pH9 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora, como descrito por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich; Dietrich (1976). Foram utilizados 5µl de um padrão de CS e um padrão de AH, ambos na concentração de 1mg/ml. O corante vermelho de cresol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a eletroforese os GAGs foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1% pelo tempo mínimo de duas horas. Em seguida o gel foi coberto com papel filtro e seco sob corrente de ar aquecida. O CS foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% em etanol 50% por 15 minutos. O excesso de corante foi removido pela solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Ato contínuo, o AH foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

As lâminas foram escaneadas<sup>8</sup> e as imagens editadas<sup>9</sup> para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas<sup>10</sup>.

### **5.6.5. Mensuração do peso molecular do AH do líquido sinovial**

Para determinação do peso molecular do AH do LS foram utilizadas as mesmas amostras tratadas para a determinação dos GAGs.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %, em tampão Tris-acetato-EDTA 1 x 0,04M, pH 8 (acetato 0,02M, EDTA 0,01M), em cuba refrigerada, por aproximadamente 40 minutos, Foram utilizados 5µl de dois padrões de AH de pesos moleculares conhecidos em todas as lâminas, sendo o padrão de alto peso de crista de galo 2 mg/ml (800 kDa) e o padrão de baixo peso de traqueia bovina 1 mg/ml (20kDa). O corante azul de bromofenol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a

---

<sup>6</sup>Centrifuga 5418 - Eppendorf

<sup>7</sup>Vacufugevacuum concentrator - Eppendorf®

<sup>8</sup>Epson Expression 1680®

<sup>9</sup>Laund Silver Fast Epson IT8®

<sup>10</sup>LauchVisionWorksLS®

eletroforese, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

Os géis foram escaneados e as imagens editadas para análise das bandas metacromáticas e obtenção das distâncias de migração, sendo a migração inversamente proporcional ao logaritmo do peso molecular do AH. Em seguida confeccionou-se o gráfico no qual o peso molecular é expresso em equação logarítmica e a distância de migração em milímetros.

### 5.6.6 Análise do *burst* oxidativo por citometria de fluxo

Após a coleta do LS, as amostras foram divididas em alíquotas para análises subsequentes. Cada amostra foi dividida em 3 tubos de ensaio de 12x75mm, em poliestireno cristal transparente: branco, *burst* basal e phorbolmiristato acetato (PMA). Para o *burst* oxidativo foram necessários 50 µl de amostra em cada tubo de ensaio. Apenas nos tubos de ensaio referentes ao *burst* basal e PMA foram adicionados 200 µl do reagente dicloro-diidro-fluoresceína-acetato (DCFH), na concentração final de 55 µM, que fluoresce em verde na presença de EROs e quando excitado em 488 nm. Apenas nos tubos denominados PMA foram adicionados 100 µl do reagente PMA, na concentração final de 90,9 ng/ml ou aproximadamente 150 nM, o qual age como estímulo químico para o *burst* oxidativo, atuando via proteína kinase C (PKC) e fosfolipase D (PLD) em neutrófilos. Em todos os tubos foi adicionada solução salina tamponada com fosfato (PBS) suficiente para completar o volume final de reação de 1,1 ml. Os tubos foram incubados a 37°C por 20 minutos. Após a incubação as amostras foram lavadas com 2 ml de PBS, centrifugadas a 400 G por 7 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 200 µl de PBS para a análise por citometria de fluxo.

As amostras foram verificadas por meio de citômetro de fluxo<sup>11</sup>, por meio do software de aquisição<sup>12</sup>. As populações de células foram definidas em gráficos de tamanho por complexidade (FSCxSSC) em escala linear. A população de maior tamanho e complexidade foi caracterizada como os neutrófilos e foi utilizada para definir parâmetros de aquisição e posterior análise. Tubos brancos foram usados para determinar ausência de fluorescência, enquanto tubos de *burst* basal foram aplicados para definir positividade de fluorescência verde no detector FL1, sem ultrapassar os limites possíveis. Foram salvos 7000 eventos da

---

<sup>11</sup> FACSCalibur (BD Bioscience)

<sup>12</sup> Cell Quest (BD Bioscience)

população de neutrófilos para cada arquivo (animal/tempo). Os arquivos foram analisados em *software*<sup>13</sup>. Foi solicitado ao programa o cálculo de média geométrica de fluorescência (geomean) no canal FL1 e os valores obtidos foram exportados para planilhas de Microsoft Excel.

---

<sup>13</sup> FlowJo versão 7.6.4 para Windows (Treestar, Inc.)

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov; em seguida utilizou-se o teste T pareado ou não pareado, respectivamente, para comparação dos valores nos diferentes momentos com os valores basais (momento 0) dentro do mesmo grupo, bem como os valores entre grupos no mesmo momento de observação. O grau de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 7 RESULTADOS

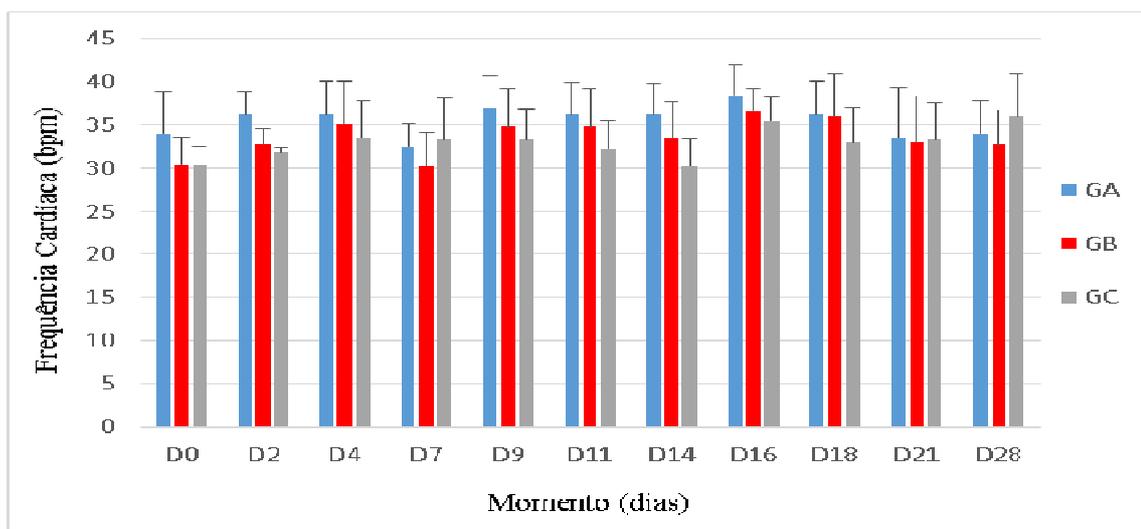
Nenhum animal apresentou infecção da articulação durante o experimento, porém alguns apresentaram dermatite devido a alta frequência de degermações necessárias para as coletas, o que foi minimizado ao utilizar o clorexidine degermante a 2% e não a 4%. A dermatite foi facilmente controlada a aplicação tópica de nitrofurazona em pasta.

### 7.1 AVALIAÇÃO FÍSICA DOS ANIMAIS

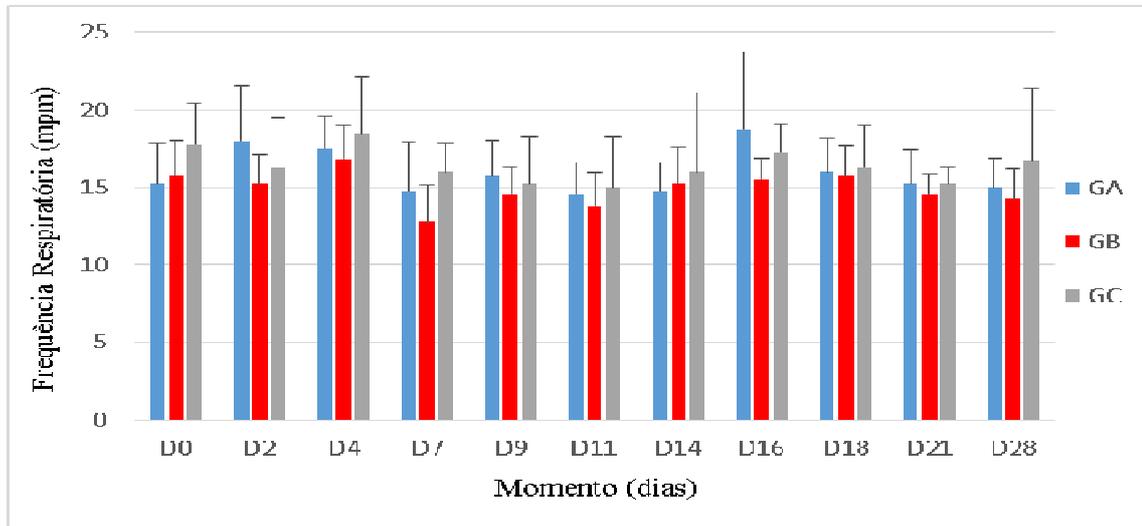
#### 7.1.1 Avaliação física diária

Na avaliação física diária não houve alteração da motilidade, TPC e coloração de mucosa. A FC e FR média estiveram sempre dentro dos parâmetros normais, sofrendo pequenas variações não significativas ( $p>0,05$ ) ao longo do experimento. A temperatura média dos animais manteve-se entre leve hipotermia a normal, não havendo diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ). Houve diferença no GA entre o D0 e 16, e no GB entre D0 e D9, 11 e 16 ( $p<0,05$ ).

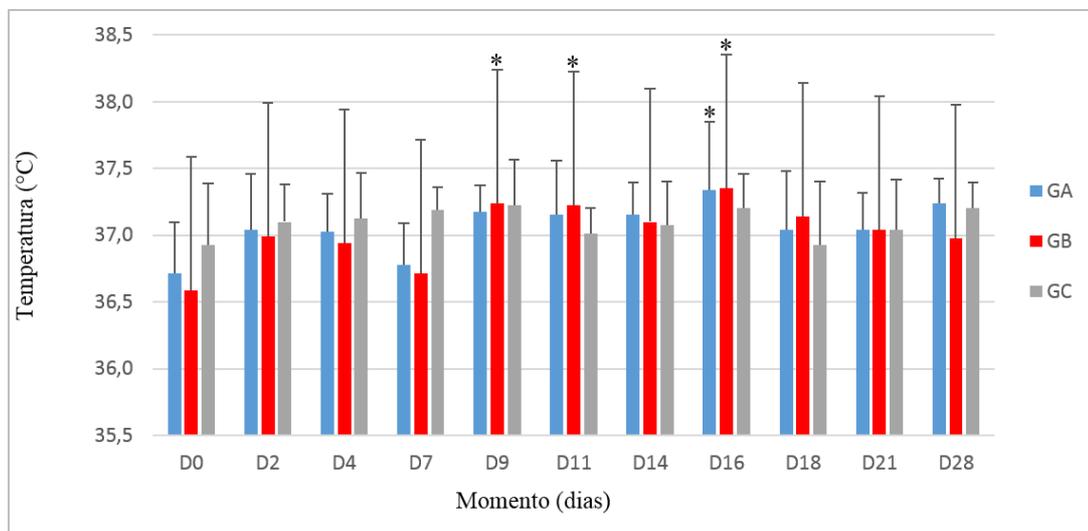
**Gráfico 1** - Frequência cardíaca média dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo - 2017



**Gráfico 2** - Frequência respiratória média dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



**Gráfico 3** - Temperatura retal média dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



\* diferença em relação aos valores iniciais

### 7.1.2. Análise de claudicação

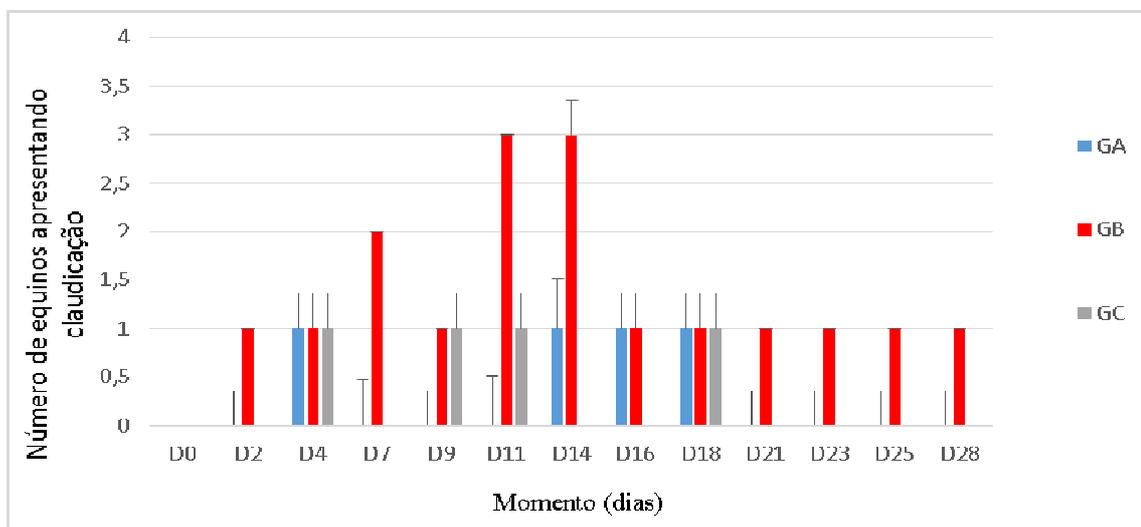
No exame de claudicação não foi observada postura antálgica, sensibilidade, calor ou alteração de consistência da articulação à palpação. Todas articulações apresentaram grau leve de efusão durante o experimento.

O GB apresentou animais com claudicação em todos os dias após início do tratamento. No GA a maior sequência de dias de animais com claudicação ocorreu mais tardiamente (D14) quando comparada aos demais grupos.

**Tabela 3** - Quantidade média de equinos submetidos a aplicação intra-articular de oxigênio e ozônio apresentando claudicação – São Paulo – 2017

Data	GA	GB	GC
D0	0	0	0
D2	0	1	0
D4	0	1	1
D7	0	2	0
D9	0	1	1
D11	0	3	1
D14	1	3	0
D16	1	1	0
D18	1	1	1
D21	0	1	0
D23	0	1	0
D25	0	1	0
D28	0	1	0

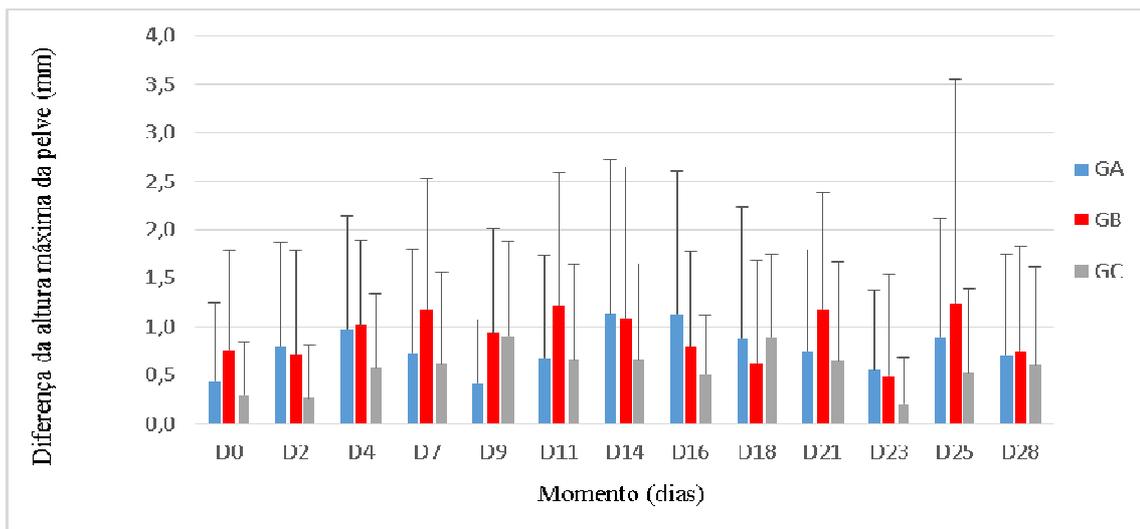
**Gráfico 4** - Quantidade média de equinos submetidos a aplicação intra-articular de oxigênio e ozônio apresentando claudicação – São Paulo – 2017



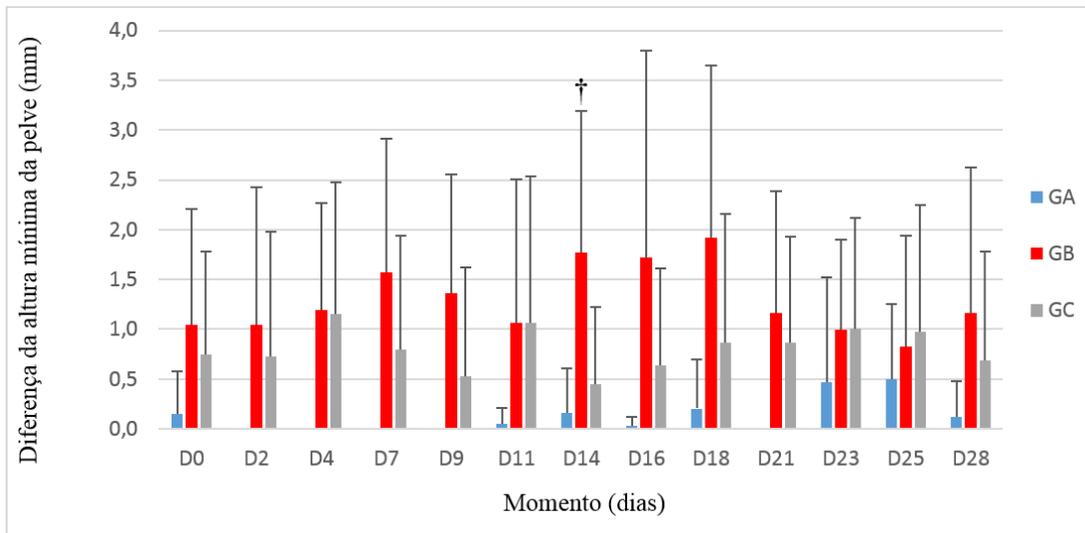
A avaliação da claudicação com o aparelho *Lameness Locator* foi positiva em 2 animais do grupo controle, 1 animal do grupo de 20 $\mu$ g/ml e 4 animais do grupo de 40 $\mu$ g/ml. A maior frequência de claudicação foi observada no D11 e D14 correspondendo a 50% (4/8 animais) dos animais.

Na avaliação da diferença altura máxima da pelve (max diff), que nos reporta claudicações de retirada, não houve diferença entre os grupos e dos momentos dentro dos grupos ( $p>0,05$ ). Já quando se avalia a diferença da altura mínima da pelve (min diff), que nos reporta claudicações de impacto, houve diferença no D14 entre o GB e os grupos GA e GC ( $p<0,05$ ), no mesmo momento em que se observa maior frequência de animais apresentando claudicação.

**Gráfico 5** - Diferença da altura máxima da pelve (mm) medida através do aparelho Lameness Locator nos grupos GA, GB e GC nos diferentes momentos - São Paulo – 2017



**Gráfico 6** - Diferença da altura mínima da pelve (mm) medida através do aparelho Lameness Locator nos grupos GA, GB e GC nos diferentes momentos - São Paulo – 2017



† diferença em relação ao grupo GA e GC

## 7.2 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Na avaliação D0 todos os animais apresentavam-se sem alterações osteocondrais, espessamento de cápsula articular ou proliferação de sinóvia. Apenas três, um em cada grupo, apresentaram maior quantidade de LS de aspecto anecóico. Ao exame radiográfico os animais não apresentaram alterações significativas.

Durante as avaliações todos os animais apresentaram aumento da quantidade de LS de aspecto anecóico e de sinóvia, e posterior diminuição em D28 (Figura 3, 4 e 5). Houve leve espessamento da cápsula articular no local da punção em 25% (2/8) dos animais do GA, 62,5% (5/8) no GB e 37,5% (3/8) no GC, mas a mesma apresentou aspecto homogêneo. O gás aplicado foi absorvido rapidamente, sendo visibilizada apenas pequena quantidade no aspecto dorsal do recesso medial da articulação no dia seguinte à aplicação (Figura 6).

Não foram observadas alterações na espessura da linha articular, irregularidades do osso subcondral ou formação de osteófitos no decorrer do tratamento.

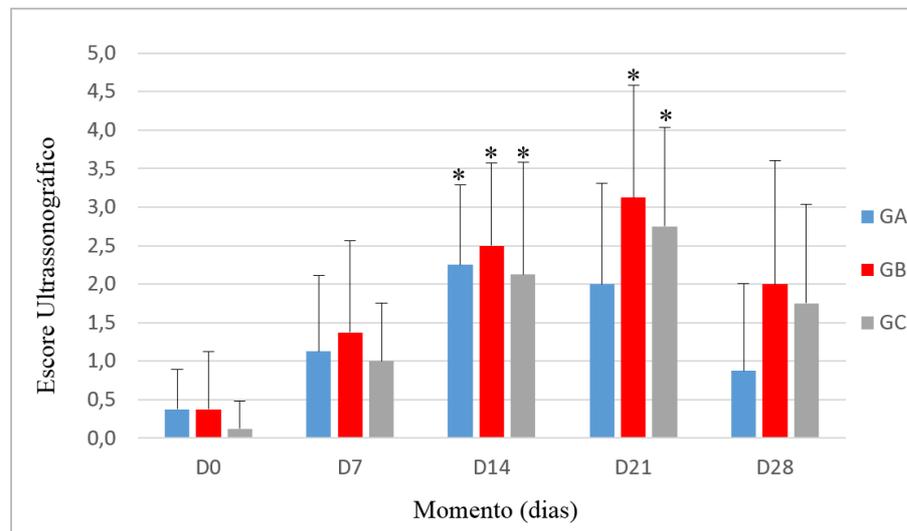
Os escores iniciais variaram de 0 a 1 no grupo A e C e de 0 a 2 no GB. Houve aumento progressivo nos escores durante o tratamento relacionados a maior quantidade de LS, a proliferação de sinóvia e ao espessamento da cápsula articular até o D21, sendo significativo no D14 em todos os grupos e no D21 no GB e GC ( $p < 0,05$ ). A diminuição dos escores ocorreu em todos os grupos em D28. Não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4** - Valores médios dos escores ultrassonográficos dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017

DATA	GA	GB	GC
D0	0,38±0,35	0,38±0,52	0,13±0,74
D7	1,13±0,76	1,38±0,99	1,00±1,19
D14	2,25±1,46*	2,50±1,04*	2,13±1,07*
D21	2,00±1,28	3,13±1,31*	2,75±1,46*
D28	0,88±1,28	2,00±1,13	1,75±1,60

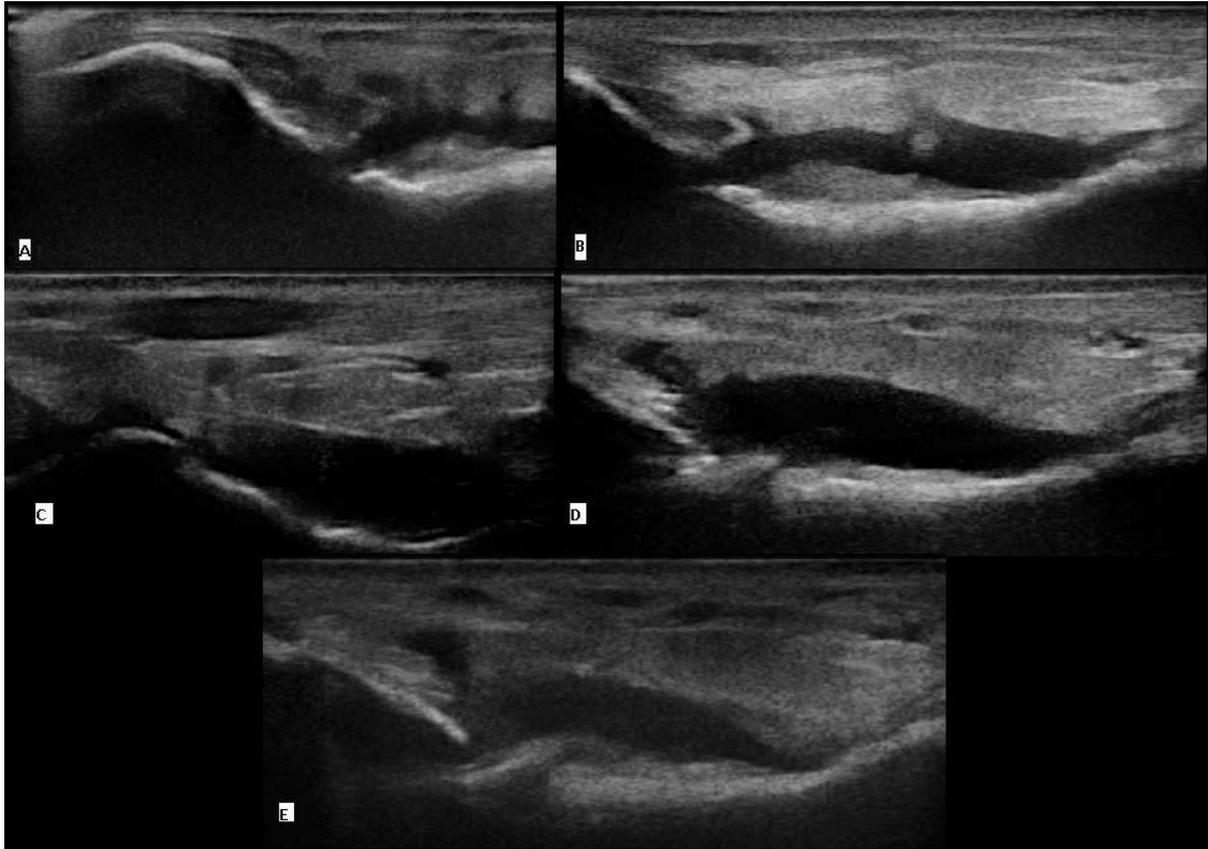
\* diferença em relação aos valores iniciais

**Gráfico 7** - Valores médios dos escores ultrassonográficos dos animais submetidos a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



\* diferença em relação aos valores iniciais

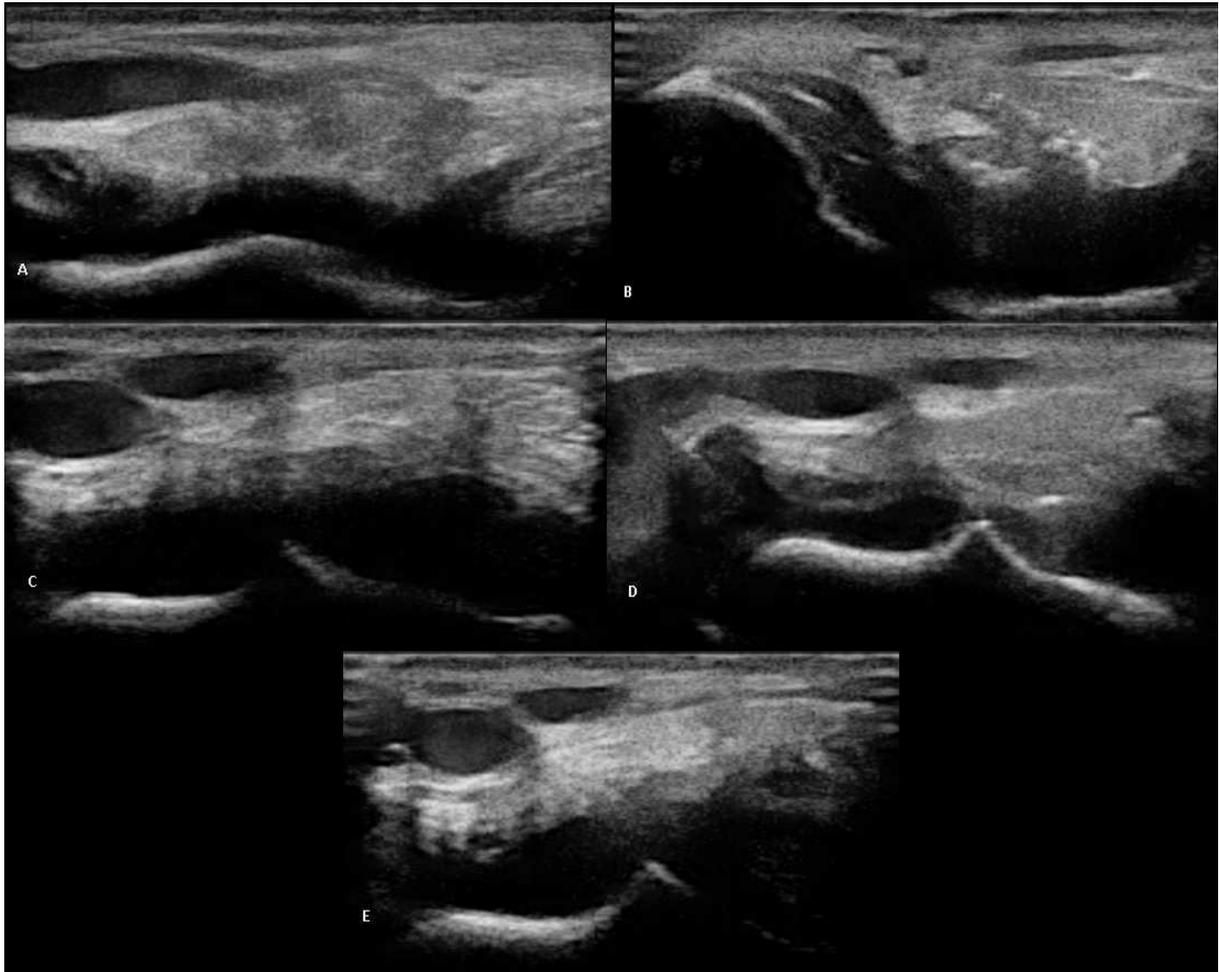
**Figura 3** - Imagens ultrassonográficas da evolução de uma articulação tratada do GA – São Paulo – 2017



Legenda: A) Imagem do D0 demonstrando pequena quantidade de líquido e de membrana sinovial. B) Imagem do D7 demonstrando aumento na quantidade de líquido sinovial anecóico. C) Imagem do D14 demonstrando aumento da quantidade de líquido sinovial e leve proliferação de sinóvia em relação ao D7. D) Imagem do D21 demonstrando estabilidade do quadro sem aumento dos escores em relação ao D14. E) Imagem do D28 demonstrando diminuição da quantidade de líquido sinovial em relação ao D21, com o final do tratamento.

Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

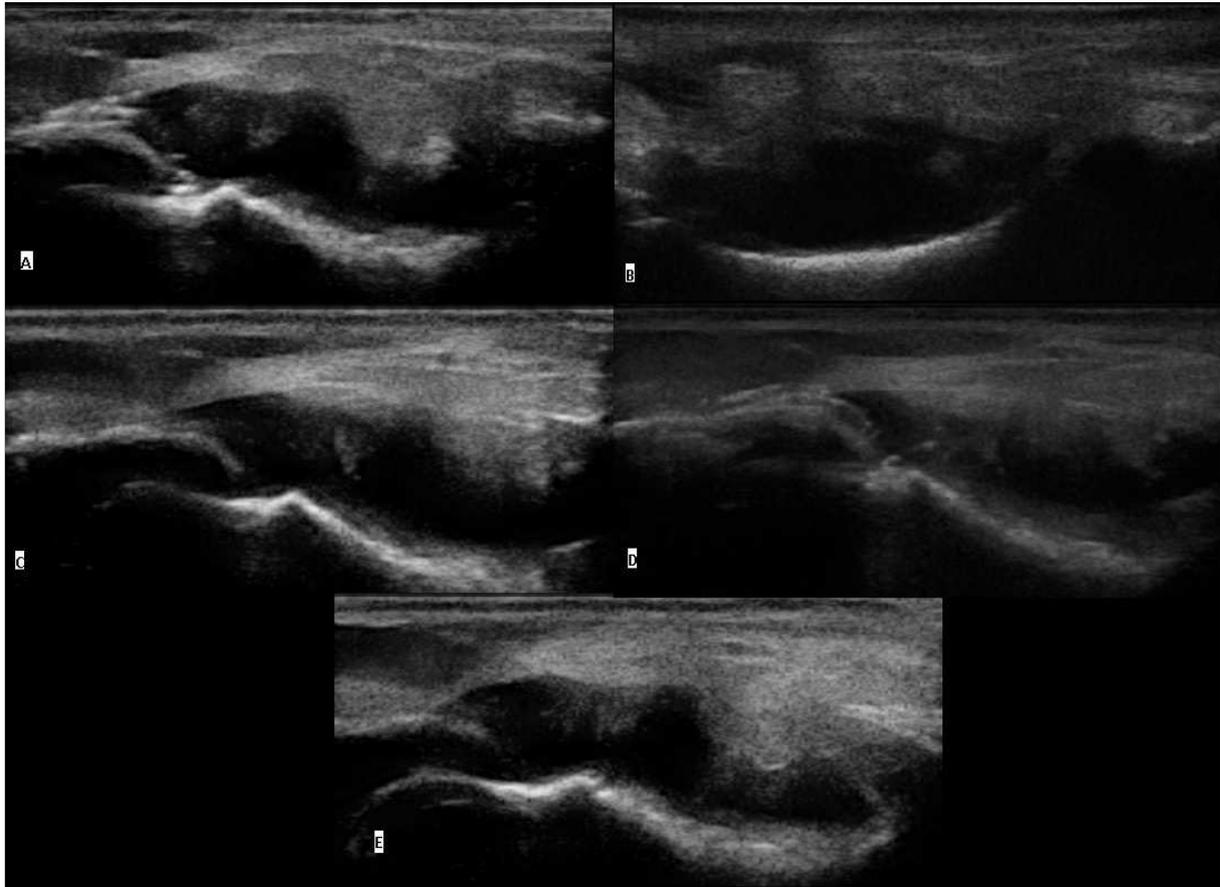
**Figura 4** - Imagens ultrassonográficas da evolução de uma articulação tratada do GB – São Paulo – 2017



Legenda: A) Imagem do D0 demonstrando pequena quantidade de líquido e de membrana sinovial. B) Imagem do D7 demonstrando aumento na quantidade de líquido sinovial anecóico. C) Imagem do D14 demonstrando aumento da quantidade de líquido sinovial e leve proliferação de sinóvia em relação ao D7. D) Imagem do D21 demonstrando proliferação da membrana sinovial em relação ao D14. E) Imagem do D28 demonstrando diminuição da proliferação de sinóvia em relação ao D21, com o final do tratamento.

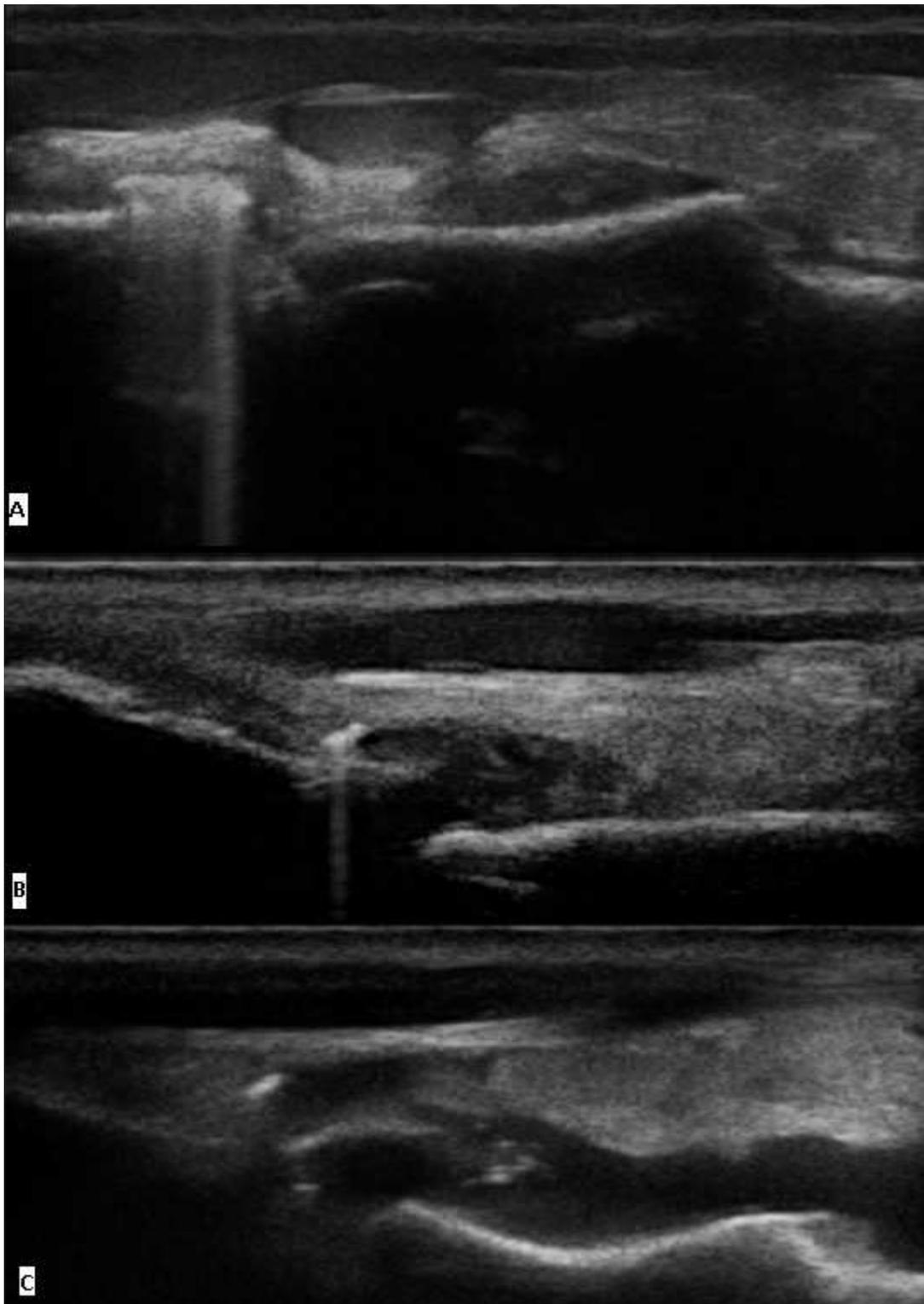
Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

**Figura 5** - Imagens ultrassonográficas da evolução de uma articulação tratada do GC – São Paulo – 2017



Legenda: A) Imagem do D0 demonstrando pequena quantidade de líquido e de membrana sinovial. B) Imagem do D7 demonstrando leve aumento na quantidade de líquido sinovial anecóico. C) Imagem do D14 demonstrando leve proliferação de sinóvia em relação ao D7. D) Imagem do D21 demonstrando estabilidade do quadro em relação ao D14 e pequena quantidade de gás, visibilizado como pequenos pontos hiperreflexivos. E) Imagem do D28 demonstrando estabilidade do quadro em relação ao D21, com o final do tratamento.  
Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

**Figura 6** - Imagens ultrassonográficas das articulações tratadas com oxigênio e ozônio demonstrando a quantidade de gás encontrado – São Paulo – 2017



Legenda: A) quantidade leve a moderada; B) pequena quantidade; C) pequenos pontos de gás dispersos no líquido sinovial visibilizados por pontos hiperreflexivos.

Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

### 7.3 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

#### 7.3.1 Contagem celular total e diferencial

O aumento da quantidade total de células após início do tratamento (D2) foi significativo apenas em GB. Não houve diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ).

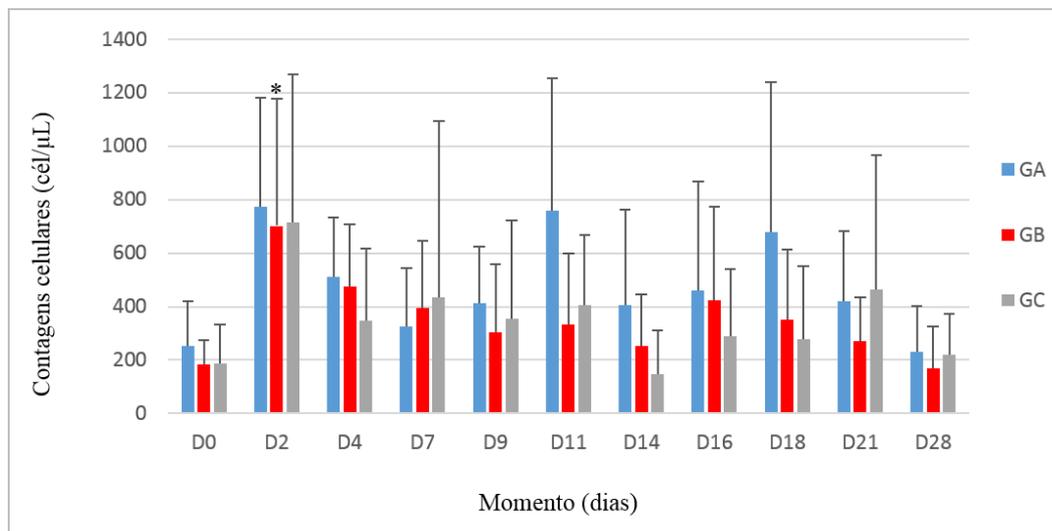
Não houve alteração significativa no GC.

**Tabela 5** - Contagens celulares médias do líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo - 2017

DATA	GA	GB	GC
D0	252±170	184±91	189±145
D2	772±409	702±474*	717±552
D4	511±223	474±234	348±268
D7	2070±217	396±250	435±658
D9	413±212	304±255	355±369
D11	760±492	331±266	405±262
D14	404±358	254±193	148±161
D16	459±408	423±351	289±251
D18	679±558	350±264	280±272
D21	421±259	271±162	462±504
D28	229±171	170±154	219±152

\* diferença em relação aos valores iniciais

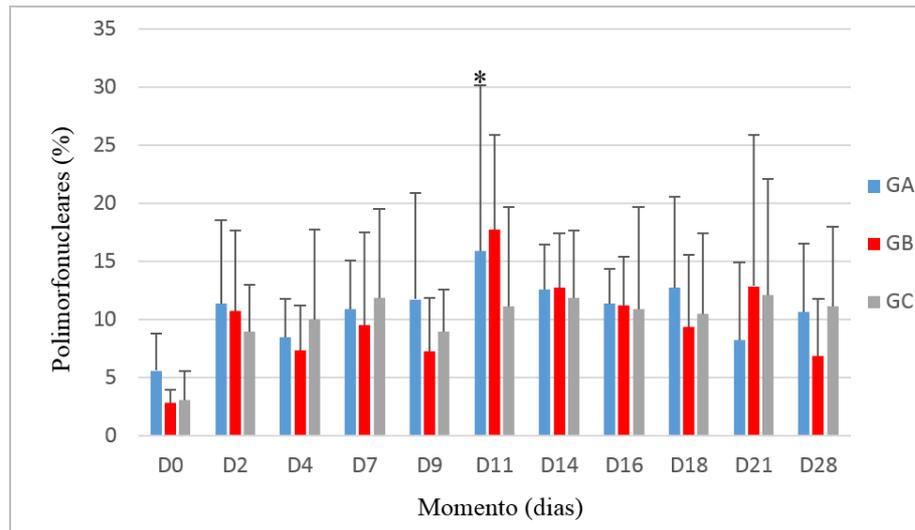
**Gráfico 8** - Contagens celulares médias do líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo - 2017



\* diferença em relação aos valores iniciais

A porcentagem inicial de polimorfonucleares foi maior no GA. Houve aumento gradual com pico após o 5º tratamento (D11) em todos os grupos, porém foi significativo apenas em GB ( $p < 0,05$ ).

**Gráfico 9** - Porcentagem média de neutrófilos do líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017

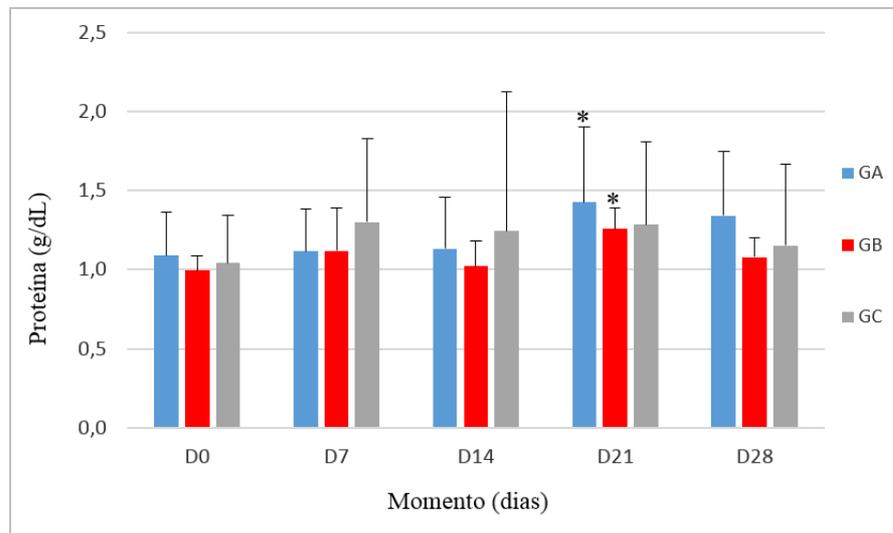


\* diferença em relação aos valores iniciais

### 7.3.2 Concentração de proteína e uréia

A concentração de proteína no LS aumentou significativamente em D21 tanto em GA quanto em GB ( $p < 0,05$ ) em comparação ao D0. O GC não apresentou alterações significativas. Não houve diferença estatística entre os grupos nos diferentes momentos ( $p > 0,05$ ).

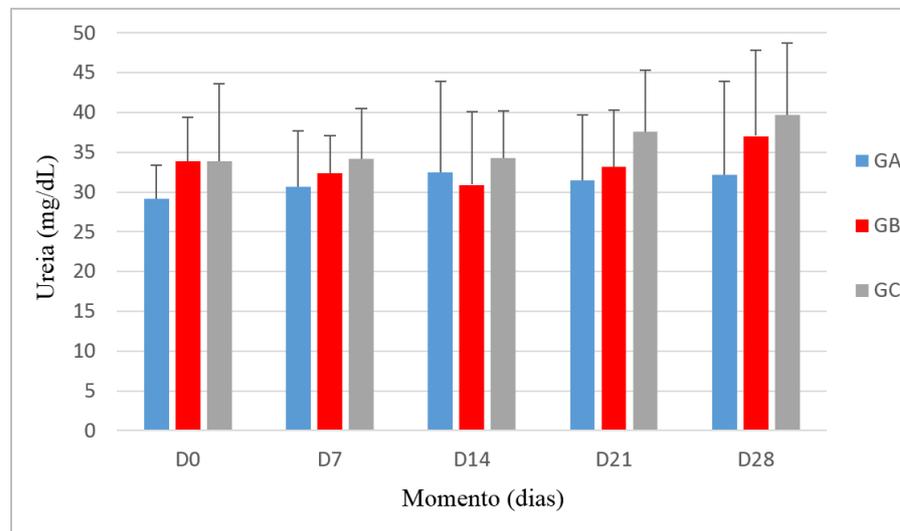
**Gráfico 10** - Concentrações médias da proteína no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



\* diferença em relação aos valores iniciais

As concentrações de ureia não diferiram significativamente entre os grupos e entre os momentos do mesmo grupo ( $p > 0,05$ ).

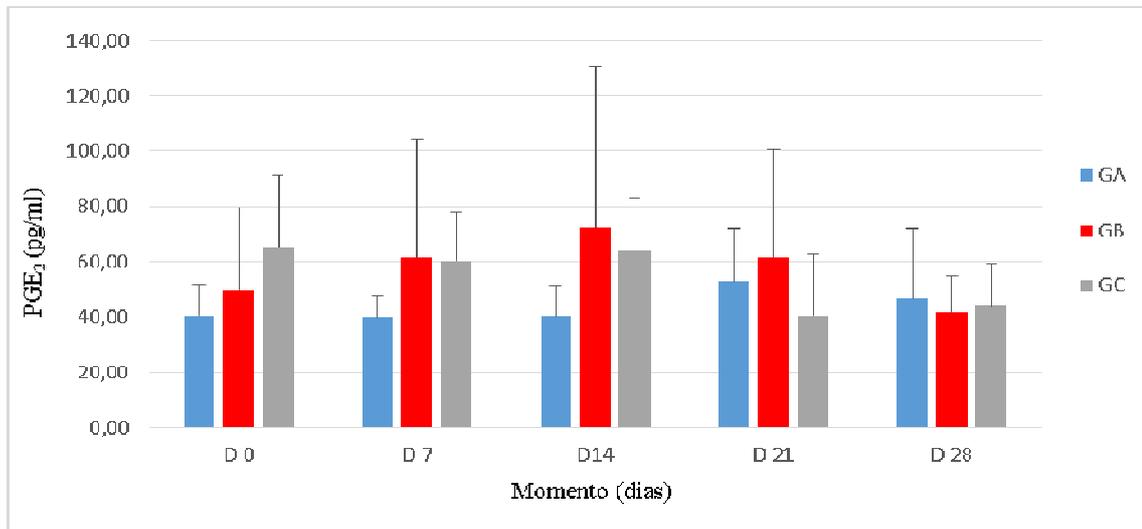
**Gráfico 11** - Concentrações médias da ureia no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



### 7.3.3 Concentração de PGE<sub>2</sub> e Substância P

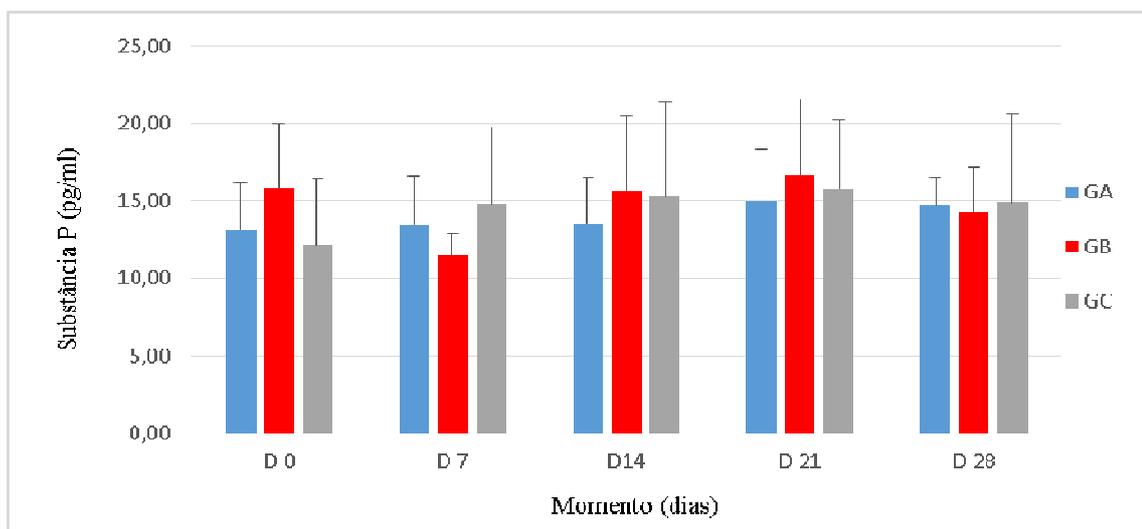
Não houve diferença significativa nas concentrações de PGE<sub>2</sub> entre os grupos e entre os momentos do mesmo grupo ( $p > 0,05$ ).

**Gráfico 12** - Concentrações médias da PGE<sub>2</sub> no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



Não houve diferença significativa nas concentrações de substância P entre os grupos e entre os momentos do mesmo grupo ( $p>0,05$ ).

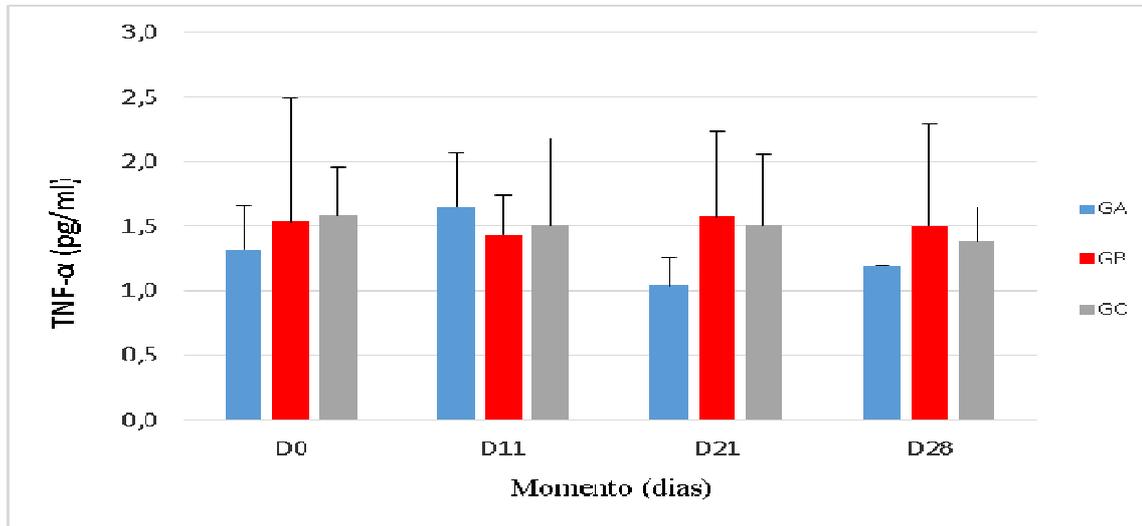
**Gráfico 13** - Concentrações médias da substância P no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



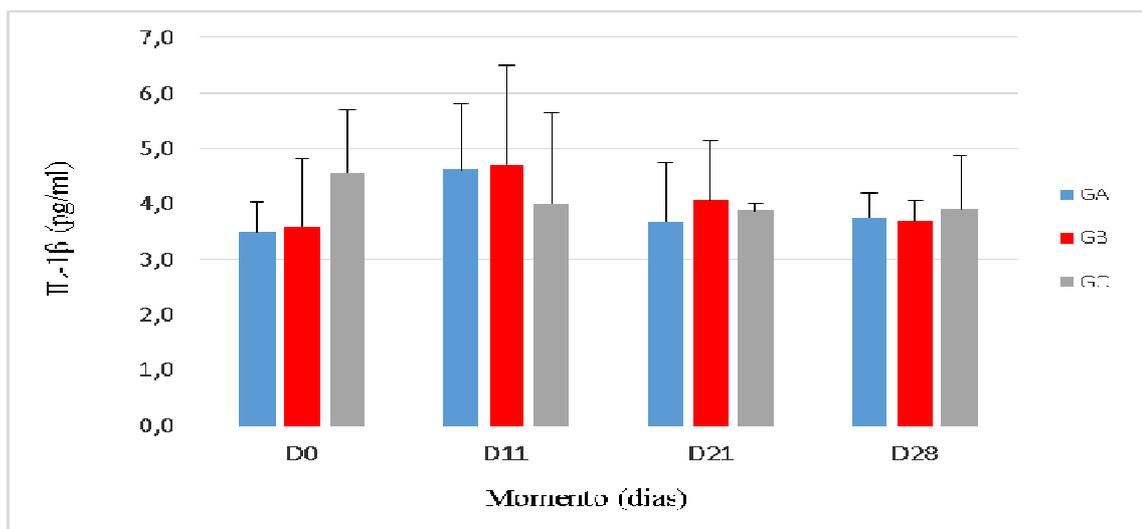
#### 7.3.4 Concentração de citocinas

Não houve alteração significativa nas concentrações das citocinas avaliadas entre os grupos ou entre os diferentes momentos dentro de cada grupo ( $p>0,05$ ).

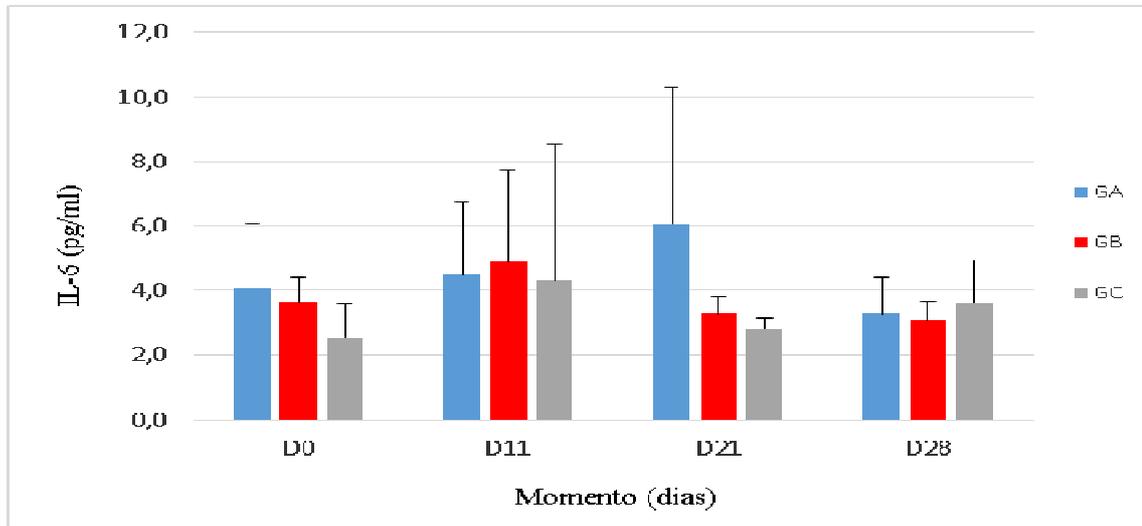
**Gráfico 14** - Concentrações médias do TNF- $\alpha$  no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



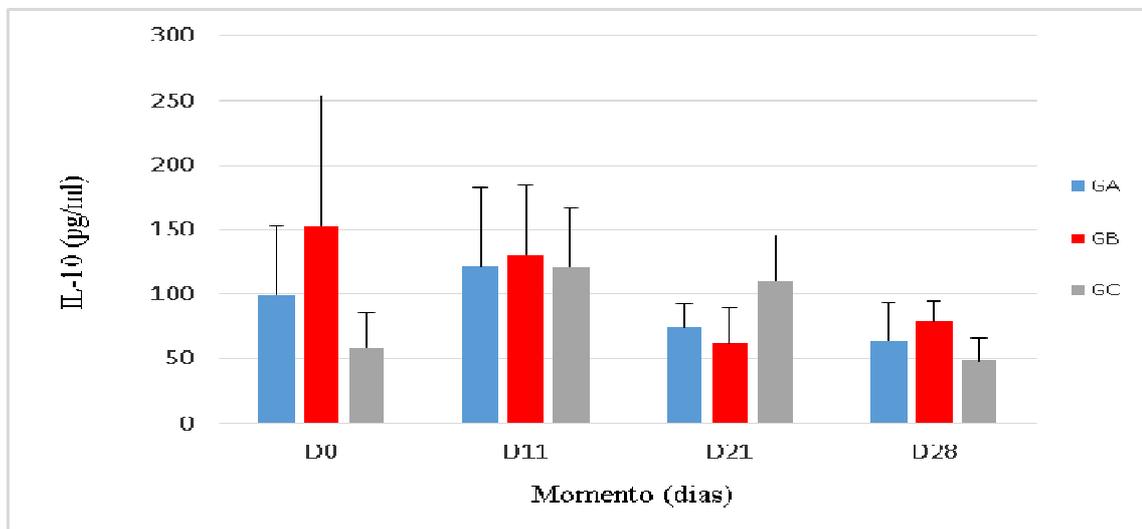
**Gráfico 15** - Concentrações médias do IL-1 no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



**Gráfico 16** - Concentrações médias do IL-6 no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



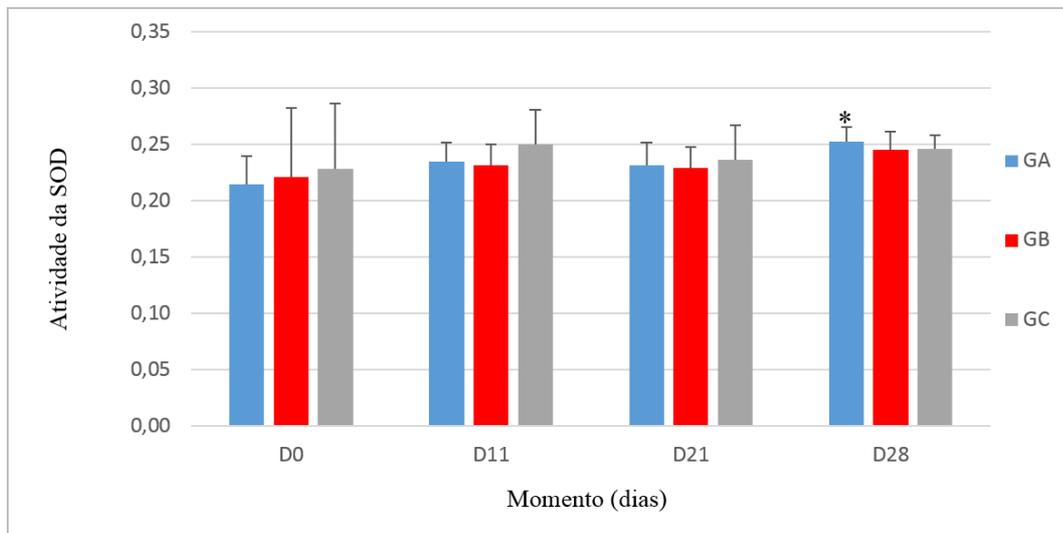
**Gráfico 17** - Concentrações médias do IL-10 no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



### 7.3.5 Atividade da enzima Superóxido desmutase

Apesar da enzima SOD ter aumentado sua atividade em todos os grupos ao longo do tratamento, somente no GA esse aumento foi significativo no D28 em relação aos valores iniciais ( $p < 0,05$ ). Nos demais momentos e entre os grupos não houve diferença significativa.

**Gráfico 18** - Atividade enzimática média da SOD no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



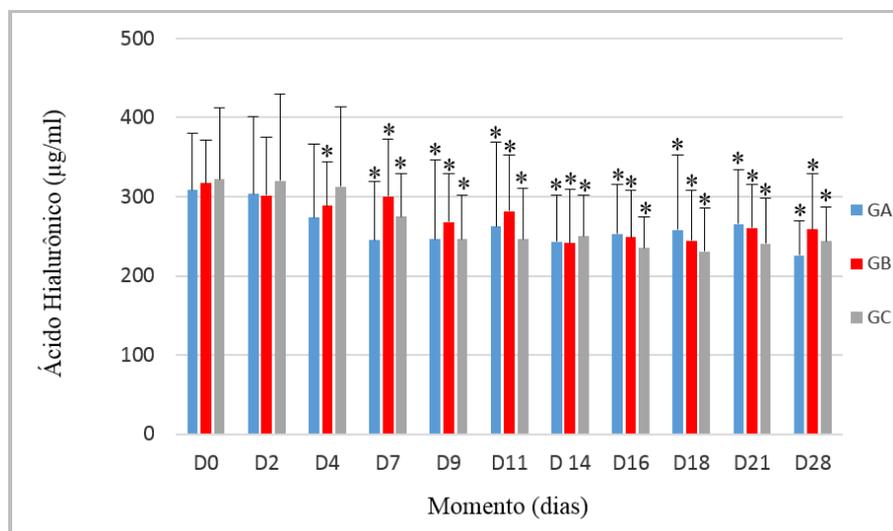
\* diferença em relação aos valores iniciais

### 7.3.6 Concentração dos GAGs

As concentrações de AH diminuíram significativamente em relação aos valores iniciais em GA e GC a partir do D7 e em GB a partir do D4 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

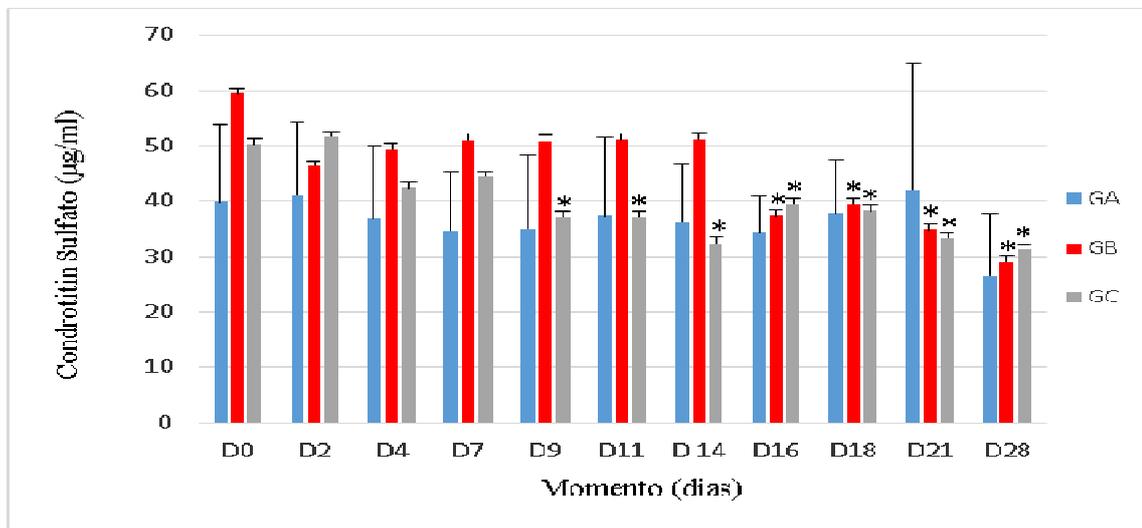
Houve diminuição significativa em relação aos valores iniciais nas concentrações de CS dentro do GB, a partir do D16, e GC, a partir do D9 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Gráfico 19** - Concentrações médias do Ácido Hialurônico no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



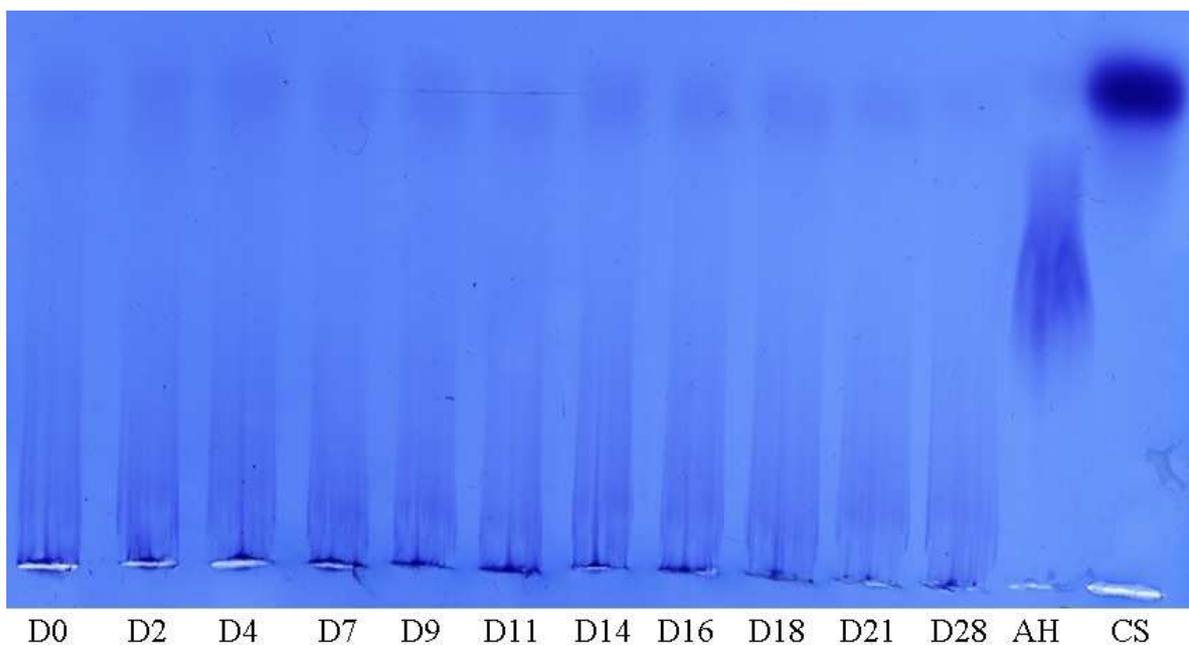
\* diferença em relação aos valores iniciais

**Gráfico 20** - Concentrações médias do Condroitín Sulfato no líquido sinovial das articulações submetidas a aplicações intra-articulares de oxigênio e ozônio – São Paulo – 2017



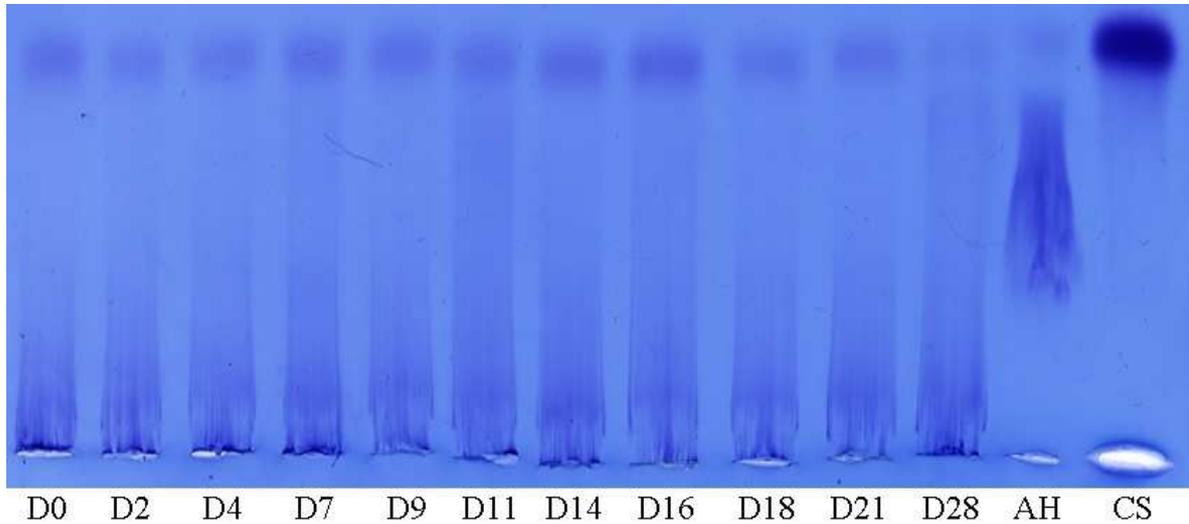
\* diferença em relação aos valores iniciais

**Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21 e 28 dias de um equino do GA – São Paulo – 2017



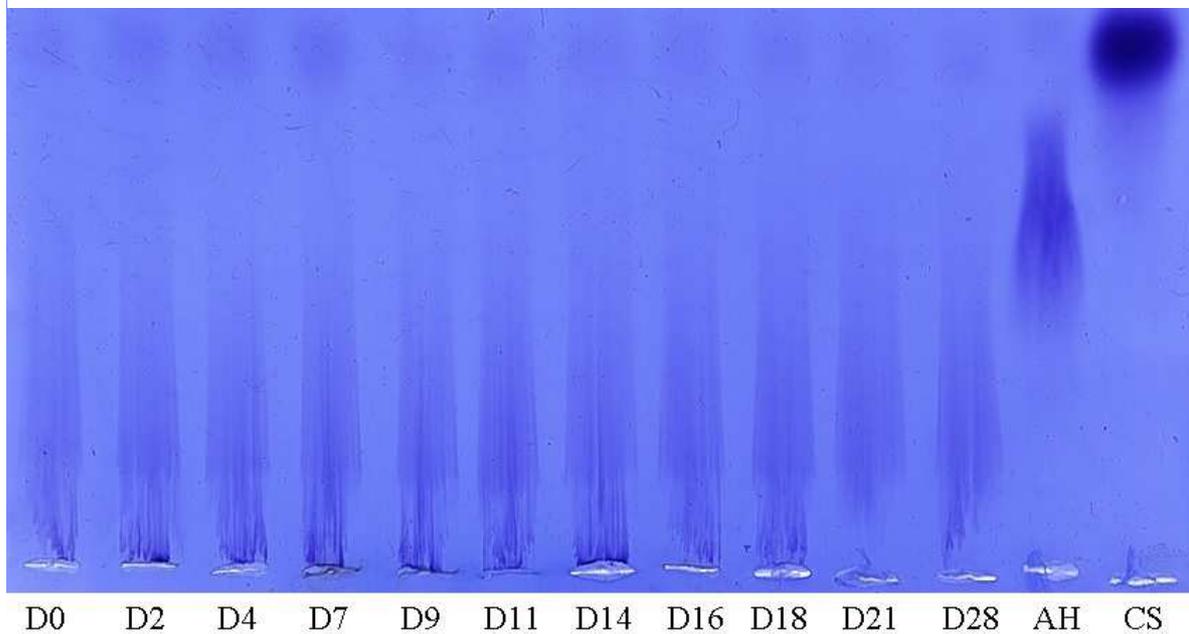
Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

**Figura 8** - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do liquido sinovial nos momentos 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21 e 28 dias de um equino do GB – São Paulo – 2017



Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

**Figura 9** - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do liquido sinovial nos momentos 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21 e 28 dias de um equino do GC – São Paulo - 2017

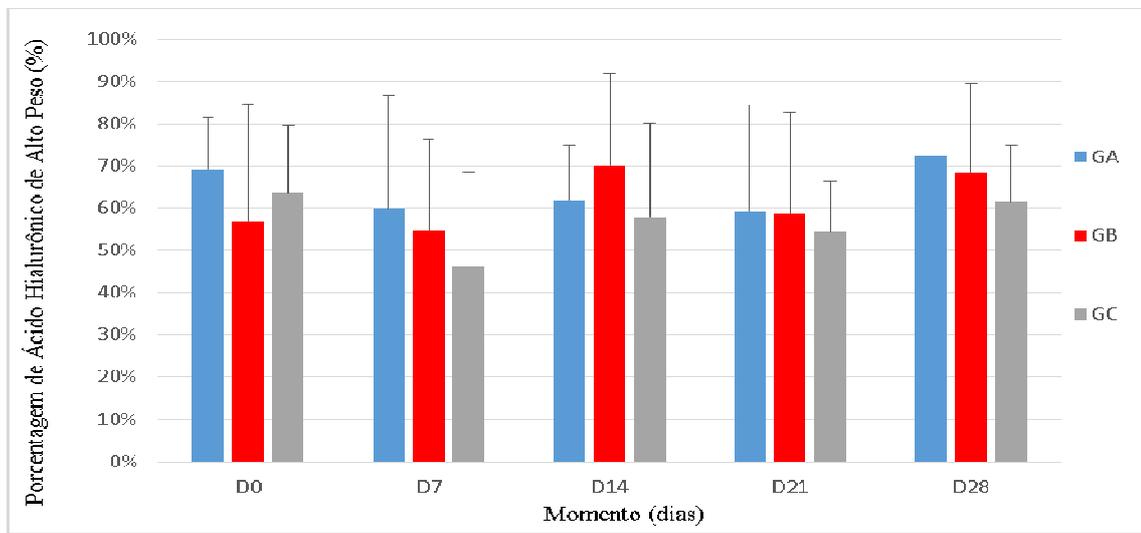


Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

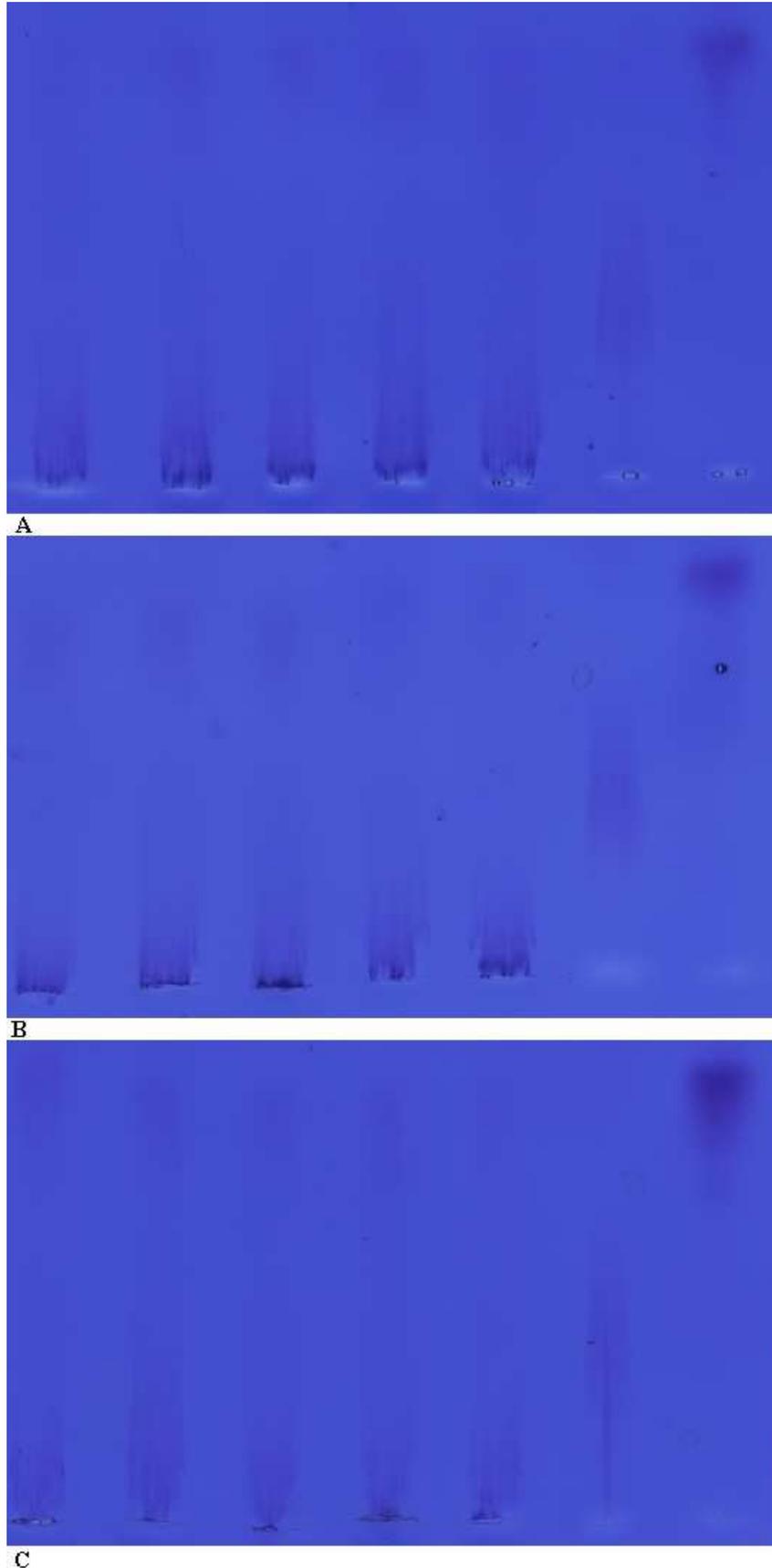
### 7.3.7 Peso Molecular do AH

Na análise do peso molecular do AH não houve diferença entre os momentos e grupos ( $p > 0,05$ ).

**Gráfico 21** - Porcentagem de Ácido Hialurônico de alto peso molecular nos momentos D0, 7, 14, 21 e 28 - São Paulo - 2017



**Figura 10** - Eletroforese em gel de agarose dos pesos moleculares do ácido hialurônico do líquido sinovial nos momentos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de um equino do GA (A), GB (B) e GC (C) – São Paulo – 2017

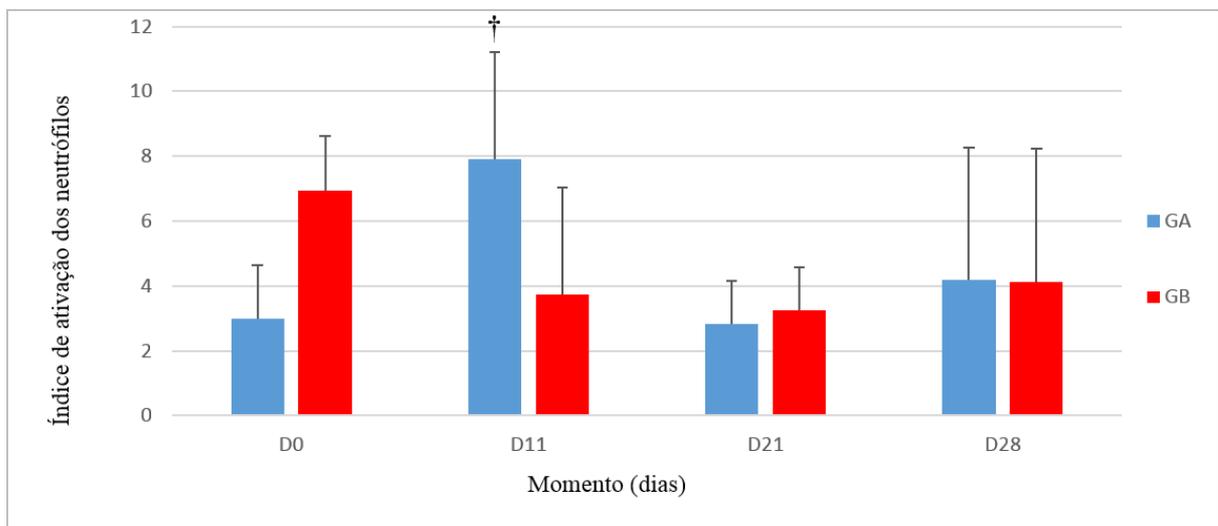


Fonte: VENDRUSCOLO (2017)

### 7.3.8 *Burst* oxidativo

O *burst* oxidativo foi avaliado utilizando-se o índice de ativação dos neutrófilos após exposição ao PMA. Na comparação entre os grupos houve aumento significativo em GA no D11 em relação a GB ( $p < 0,05$ ).

**Gráfico 22** - Índice de ativação dos neutrófilos do líquido sinovial após exposição ao PMA medidos através da citometria de fluxo - São Paulo - 2017



† diferença entre os grupos GA e GB

## 8 DISCUSSÃO

A ozonioterapia intra-articular tem sido empregada na medicina humana para o tratamento de quadros inflamatórios, sejam eles agudos ou crônicos, sinovites, capsulites ou osteoartrites com sucesso (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).

Os quadros de OA são normalmente acompanhados de manifestações clínicas de postura antálgica, como forma de diminuir a carga no membro acometido, aumento da temperatura local, efusão articular, podendo ou não estar acompanhada de edema articular e peri-articular, claudicação e, normalmente em casos mais crônicos, alteração da consistência articular a palpação (BAXTER, 2011; MCILWRAITH et al., 2016). Já os quadros de sinovite são caracterizados por efusão articular, proveniente de espessamento da membrana sinovial e aumento da quantidade de LS, normalmente acompanhada de claudicação (BAXTER, 2011). Durante o período experimental alguns animais, especificamente do GB, apresentaram efusão e claudicação transitórias, provavelmente devido a maior concentração de O<sub>3</sub>, conferindo caráter mais inflamatório a esse tratamento e corroborando com os relatos de sinovite aguda.

A ultrassonografia consiste em método diagnóstico utilizado para controle por permitir, de forma não invasiva, monitorar a progressão da doença e a resposta a terapia (MÖLLER et al., 2008), além de visibilizar as alterações de forma precoce, como a formação de osteófitos, antes que eles apareçam na imagem radiológica. Este exame permite, ainda, avaliar as alterações das partes moles de interesse no experimento como cápsula articular, membrana sinovial e a quantidade e qualidade do LS. Os sinais ultrassonográficos de sinovite relatados na literatura são o espessamento da cápsula articular, aumento da membrana sinovial, material denso e amorfo, aumento do volume de LS e alteração da sua característica anecóica para heterogêneo (KIDD; LU; FRAZER, 2014). As alterações encontradas nas avaliações ultrassonográficas deste estudo nos permitem concluir que as artrocenteses repetidas provocaram sinovite leve a moderada. Alguns animais também apresentaram capsulite, com espessamento da estrutura, porém mantiveram o aspecto homogêneo do tecido. As alterações de sinovite e capsulite foram responsáveis pelo aumento significativo nos escores ultrassonográficos no D14, em todos os grupos, principalmente em GB e GC no D21, sugerindo controle do processo inflamatório pelo tratamento de GA. Tais alterações, no entanto, foram transitórias e não evoluíram para OA, uma vez que não houve mudanças na

espessura da linha cartilágnea, no osso subcontral ou formação de osteófitos (KIDD; LU; FRAZER, 2014).

A análise do LS com contagem celular total e diferencial e quantidade de proteína é rotineiramente empregada na prática clínica, podendo trazer informações importantes sobre o ambiente articular. A quantidade normal de leucócitos é de até 1000 cel/ $\mu$ L, sendo 90% mononucleares e 10% polimorfonucleares (KAY et al., 2008), colocando todos os animais utilizados dentro do normal no início do experimento. Sabe-se que as punções articulares seriadas funcionam como estímulo mecânico causando reação inflamatória transitória (MORAES et al., 2015; MOREIRA et al., 2015). Não foram observadas contagens semelhantes às encontradas por Moraes et al. (2015) e Moreira et al. (2015), provavelmente pelo maior intervalo entre as coletas. O aumento das contagens observado em D2 no GB pode ter ocorrido, provavelmente, pelo estímulo mecânico inicial articular. Nos demais momentos as artrocenteses não causaram alterações significativas.

Quadros articulares inflamatórios ou infecciosos promovem aumento da contagem celular e quantidade de polimorfonucleares (HAWKINS et al., 1995; FRISBIE et al., 2007). A maior porcentagem de polimorfonucleares foi observada no D11 em GB, ocorrendo provavelmente pelo estímulo inflamatório da maior dose empregada, visto que em GA e GC não houve aumento significativo estatisticamente. Em D11 observa-se em GB maior número de animais apresentando claudicação.

O LS é um filtrado do plasma produzido pela membrana sinovial, possuindo características semelhantes, com 25 a 35% da concentração de proteína plasmática (STEEL, 2008). Os valores encontrados em cavalos normais variam de 1,8  $\pm$ 0,3 g/dL (VAN PELT, 1974), sendo considerado normal valores de até 2g/dL (MCILWRAITH et al., 1979). O aumento da quantidade de proteína está relacionando a maior permeabilidade vascular da membrana sinovial, permitido que moléculas de peso molecular mais alto ultrapassem a barreira, passando a compor o LS (STEEL, 2008). Sabe-se que o O<sub>3</sub> causa aumento da vascularização e vasodilatação, ao provocar liberação de ON pelo endotélio, o que pode ter provocado o aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente da concentração de proteína no LS no GA e GB no D21 (SAGAI; BOCCI, 2011b; JANI et al., 2012; SCHWARTZ; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2012).

A PGE<sub>2</sub> é considerada um dos principais mediadores inflamatórios e de dor (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006). Ela é produzida principalmente pela membrana sinovial, processo que requer duas enzimas: cicloxigenase-2 e prostaglandina E sintetase, sendo ambas induzidas pela IL-1 $\beta$  (MCILWRAITH et al., 2016). Suas ações na articulação incluem

vasodilatação, aumento da percepção de dor, depleção de proteoglicanos da cartilagem (degradação e inibição de síntese), desmineralização óssea e promoção da secreção de ativador de plasminogênio (MCILWRAITH et al., 2016).

Bertone, Palmer e Jones (2001) consideram a PGE<sub>2</sub> como um bom a excelente preditor de OA para valores acima de 22,5 pg/ml, porém concentrações mais elevadas tem sido observados em outros estudos em articulações saudáveis, variando de 28,5 a 65,06 pg/ml (MORAES et al., 2015; MOREIRA et al., 2015). A média mínima observada no presente estudo foi de 38,02 pg/ml, corroborando com os valores encontrados por Moraes et al. (2015) e Moreira et al. (2015). No entanto, nossas concentrações de PGE<sub>2</sub> não sofreram alteração significativa como observado por Lamprecht e Williams (2012) possivelmente pelo maior intervalo entre as punções. Em doses baixas, como as usadas em GA, a ozonioterapia diminui as concentrações de PGE<sub>2</sub> do LS (BOCCI, 2011; BURIC; RIGOBELLO; HOOPER, 2014), o que não foi observado no presente estudo, dado o uso de articulações saudáveis.

O neuropeptídeo conhecido como Substância P é secretado pelas fibras nervosas tipo C e exerce efeito direto sobre os condrócitos, resultando em aumento da dor articular, vasodilatação, ativação de macrófagos, linfócitos B, células polimorfonucleares, plaquetas e mastócitos, estímulo das células sanguíneas a produzirem IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, indução da proliferação celular e a expressão de PGE<sub>2</sub> e colagenase dos sinoviócitos, aumento da formação de osteoclastos e hipertrofia sinovial (LOTZ; CARSON; VAUGHAN, 1987; LAM; FERRELL, 1993; MENKES et al., 1993; HERNANZ et al., 2003; MATAYOSHI et al., 2005; DE GRAUW; VAN DE LEST; VAN WEEREN, 2009). A Substância P, ainda, está relacionada a ativação do *burst* respiratório de neutrófilos (YANG; FA, 2002). No presente estudo não foram observadas alterações significativas nas concentrações deste neuropeptídeo, e nem correlação entre suas concentrações e a presença de claudicação, indicando que a sinovite provocada foi leve.

Na OA várias interleucinas pró-inflamatórias produzidas pela membrana sinovial estão relacionadas ao processo de destruição da cartilagem articular, principalmente IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (SCANZELLO; GOLDRING, 2012). Observa-se aumento das concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no LS quando compara-se articulações com OA e saudáveis (MORRIS et al., 1990; ALWAN et al., 1991; HAWKINS et al., 1995). Em estudo utilizando apenas articulações do carpo, observou-se que as concentrações de IL-6 foram maiores em articulações doentes e não medicadas, enquanto as concentrações de TNF- $\alpha$  não variaram com os graus de lesão e instituição de tratamento prévio, tampouco se relacionaram com as concentrações de proteína e leucócitos (LEY et al., 2011). Em outro estudo a IL-6 foi considerada excelente preditor de

doença articular, sendo sua presença no LS indicativa de OA (BERTONE; PALMER; JONES, 2001). Apesar da IL-6 ter sido identificada em todos os momentos de todos os grupos no presente experimento, não podemos atribuir caráter inflamatório, visto que outras variáveis não alteraram simultaneamente, podendo atribuir a detecção a metodologia de mensuração mais sensível, detectando até mesmo baixas concentrações.

As concentrações de TNF- $\alpha$  mantiveram-se sempre dentro da normalidade segundo Bertone; Palmer e Jones (2001), porém os valores de IL-1 $\beta$  ficaram acima de 4,5 pg/ml concomitantemente a maior frequência de claudicação, sugerindo que mesmo em doses baixas a ozonioterapia não foi capaz de inibir a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em quadros de inflamação articular (ILIAKIS et al., 2001; PAOLONI et al., 2009).

Nos quadros de OA há aumento da atividade da SOD que apresenta importante efeito contra o anion superóxido e o estresse oxidativo articular, resultando em resposta adaptativa com aumento da transformação de superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (OSTALOWSKA et al., 2006; SURAPANENI; VENKATARAMANA, 2007; CALUNGA et al., 2012). No entanto, a ozonioterapia também parece estimular o aumento da atividade da SOD (MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2004; ZHANG, 2006; SAGAI; BOCCI, 2011a; BOCCI, 2012; MAGESH; CHEN; HU, 2012; PECORELLI et al., 2013), como observado no estudo. A ativação da SOD ocorre através dos aldeídos, que ativam os fatores de transcrição nucleares, fator nuclear eritróide-2 – relativo ao fator 2 (Nrf2), presentes no citoplasma celular. Estes, por sua vez, ligam-se a proteína kelch 1 associada a ECH (Keap-1), interagindo com os elementos de resposta antioxidante nucleares, culminando com o aumento de diversas enzimas antioxidantes, dentre elas a SOD.

Os GAGs são considerados bons biomarcadores do metabolismo da cartilagem articular como demonstrado por Alwan et al. (1991), Palmer, Bertone e McClain (1995), McIlwraith (2005), Moraes et al. (2015) e Moreira et al. (2015). Fuller et al. (2001) observaram menores concentrações de AH em articulações com OA, embora estas não tenham sido correlacionadas com danos a cartilagem. No presente estudo as concentrações de AH diminuíram ao longo do experimento em todos os grupos, podendo indicar que as punções articulares geraram inflamação leve, e que foi exacerbada pela concentração mais alta de O<sub>3</sub> e não controlada pela dose mais baixa. Estes resultados contradizem os observados por Moraes et al. (2015) e Moreira et al. (2015), que não observaram alterações nas concentrações de AH tanto quando punções repetidas foram realizadas em curto intervalo de tempo quanto a intervalos mais longos.

As concentrações de CS diminuíram significativamente em GC e GB, ao contrário do observado após as punções repetidas por Moraes et al. (2015) e Moreira et al. (2015), que relataram aumento, e também por Fuller et al. (2001) e Lamprecht e Williams (2012), que não observaram alterações. Neste estudo as punções repetidas foram acompanhadas da infusão de O<sub>2</sub>, diferentemente dos estudos citados anteriormente. Pode-se supor que a atuação dos gases sobre as estruturas articulares foram os responsáveis pela divergência dos resultados.

No processo de inflamação articular ocorre a quebra do AH de alto peso molecular em moléculas de médio e baixo peso, sendo um dos responsáveis pela diminuição da viscosidade do LS na OA (BAXTER, 2011). Em todos os grupos houve tendência de diminuição do AH de alto peso molecular, ocorrendo em menor escala nos grupos tratados, os quais voltaram a produzir, nos demais momentos, moléculas de tamanho maior e finalizaram o experimento com porcentagem acima dos valores iniciais, ao contrário do GC, embora sem diferença significativa. Apesar da diminuição da quantidade de AH este manteve-se com qualidade elevada nos grupos tratados, ao não observarmos diminuição significativa do peso molecular do AH. Correlaciona-se a quebra do AH principalmente as EROs produzidos pelos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos devido ao *burst* respiratório (TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1994), o que pode justificar a menor porcentagem do AH de alto peso após o início do tratamento.

Após o processo destrutivo inicia-se a reparação da lesão articular medida por diversas citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Esta citocina age nos sinoviócitos, condrócitos e macrófagos provocando a diminuição do TNF- $\alpha$  e IL-1 (HART et al., 1995) e inibição da liberação de PGE<sub>2</sub> dos sinoviócitos na articulação com osteoartrite mediada pelo TNF- $\alpha$  (TAKAFUJI; MCILWRAITH; HOWARD, 2002). No presente estudo não foi observada correlação entre os aumentos de IL-10 e diminuição dos mediadores inflamatórios associados. Segundo Bocci (2011), o tratamento com O<sub>3</sub> aumenta as citocinas inibitórias, entre elas a IL-10, porém não foram observadas diferenças estatísticas significativas em nosso estudo. Estes resultados podem também estar relacionados ao fato de as articulações serem saudáveis, não havendo grande estímulo para a produção dessa citocina.

A citometria de fluxo foi utilizada para analisar o comportamento dos neutrófilos e a sua mudança no índice de ativação. Segundo Bocci (2011) a ozonioterapia age nestas células melhorando sua função e fazendo com que elas se ativem mais facilmente e com mais eficiência. No GA o aumento da média desse momento foi devido a dois animais que apresentaram pico deste índice, voltando a diminuir depois. No D11 os mesmos equinos apresentaram as maiores porcentagens de neutrófilos no LS.

## 9 CONCLUSÃO

A aplicação consecutiva do ozônio medicinal intra-articular provocou alterações ultrassonográficas e no exame de claudicação, mais perceptível na dose de 40 ug/mL. Estas alterações estão mais relacionadas à distensão articular causada pela infusão de gases do que aos efeitos inflamatórios provindos do O<sub>3</sub>, uma vez que as análises de líquido sinovial não mostraram relevante inflamação, com resultados muito semelhantes ao GC. Conclui-se que a aplicação intra-articular de ozônio medicinal em equinos é segura em ambas as doses, e que experimentos devem ser realizados utilizando-se animais com diferentes doenças articulares, para que os benefícios da ozonioterapia sejam evidenciados e compreendidos.

## REFERÊNCIAS

- ALAAEDDINE, N.; DI BATTISTA, J. a; PELLETIER, J. P.; KIANSA, K.; CLOUTIER, J. M.; MARTEL-PELLETIER, J. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. **Arthritis and rheumatism**, v. 42, n. 4, p. 710–8, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211885>>.
- ALVES, G. E. S.; ABREU, J. M. G.; RIBEIRO FILHO, J. D.; MUZZI, L. A. L.; OLIVEIRA, H. P.; TANNUS, R. J.; BUCHANAN, T. 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.; CARTER, D.; BENNETT, D.; EDWARDS, G. B. Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 1, p. 44–47, 1991.
- ANITUA, E.; ZALDUENDO, M. M.; TROYA, M.; ORIVE, G. Ozone dosing alters the biological potential and therapeutic outcomes of plasma rich in growth factors. **Journal of periodontal research**, v. 50, n. 2, p. 240–7, 23 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24957247>>. Acesso em: 1 set. 2014.
- ANÔNIMO. Abstracts of medical literature. **Journal of American Medical Association**, v. 173, p. 2302, 1958
- 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.
- AUER, D.; NG, J.; WRIGHT, A. S. Free radical oxidation products in plasma and synovial fluid of horses with synovial inflammation. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, n. 2, p. 49–52, fev. 1993. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.1993.tb15137.x>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- 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 Autohaemotransfusion. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 5, p. 47–52, 2006.
- BATES, E. J.; JOHNSON, C. C.; LOWTHER, D. a. Inhibition of proteoglycan synthesis by hydrogen peroxide in cultured bovine articular cartilage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 838, n. 2, p. 221–228, fev. 1985. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304416585900820>>.
- BAXTER, G. M. **Adams & stashed's lameness in horses**. 6ª edição ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011.

BAYRAK, O.; ERTURHAN, S.; SECKINER, I.; ERBAGCI, A.; USTUN, A.; KARAKOK, M. 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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4021650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 set. 2014.

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.

BEUTLER, B. A. The role of tumor necrosis factor in health and disease. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 57, p. 16–21, maio 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10328138>>. Acesso em: 29 set. 2016.

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. 2006a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890971>>. Acesso em: 1 set. 2014.

BOCCI, V. **Ozone: a new medical drug**. 1ª edição ed. Dordrecht: Springer, 2011.

BOCCI, V. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects. **Free Radical Research**, v. 46, n. 9, p. 1068–1075, 28 set. 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2012.693609>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of medical research**, v. 37, n. 4, p. 425–35, maio 2006b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16624639>>. Acesso em: 1 set. 2014.

BONFORTE, G.; BELLASI, A.; RIVA, H.; FERRADINI, M.; ARRIGHI, E.; GROPPI, G.; MINORETTI, C.; FRANZINI, M. Ozone Therapy: A Potential Adjunct Approach to Lower Urinary Tract Infection? A Case Series Report. **Giornale italiano di nefrologia: organo ufficiale della Società italiana di nefrologia**, v. 30, n. 4, 2013.

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.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7634042>>. Acesso em: 29 set. 2016.

BUCKWALTER, J. A.; LANE, N. E. Aging, Sports, and Osteoarthritis. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 4, n. 3, p. 276–87, 1996. Disponível em: <[http://journals.lww.com/sportsmedarthro/abstract/1996/00430/aging,\\_sports,\\_and\\_osteoarthrit.8.aspx](http://journals.lww.com/sportsmedarthro/abstract/1996/00430/aging,_sports,_and_osteoarthrit.8.aspx)>.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25694935>>. Acesso em: 27 set. 2016.

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.; MENÉNDEZ, S.; LEÓN, R.; CHANG, S.; GUANCHE, D.; BALBÍN, A.; ZAYAS, J.; GARCÍA, P. Application of Ozone Therapy in Patients with Knee Osteoarthritis. **Ozone: Science & Engineering**, v. 34, n. 6, p. 469–475, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2012.719120>>. Acesso em: 1 set. 2014.

CAMELIA, C.; MADALINA, I.; TATIANA, M.; MARILENA, P.; OANA, A.; SANATORIUM, B.; MARIU, V.; SOUTH, E. 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.; SANTIS, F. D. E.; DALL'OLIO, M.; LEONARDI, M. 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.

CHANG, J. D. S.; LU, H.-S.; CHANG, Y.-F.; WANG, D. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15570426>>. Acesso em: 1 set. 2014.

CHEN, H.; YU, B.; LU, C.; LIN, Q. The effect of intra-articular injection of different concentrations of ozone on the level of TNF- $\alpha$ , TNF-R1, and TNF-R2 in rats with rheumatoid arthritis. **Rheumatology international**, v. 33, n. 5, p. 1223–7, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052485>>. Acesso em: 1 set. 2014.

CHO, M.-L.; JUNG, Y. O.; MOON, Y.-M.; MIN, S.-Y.; YOON, C.-H.; LEE, S.-H.; PARK, S.-H.; CHO, C.-S.; JUE, D.-M.; KIM, H.-Y. Interleukin-18 induces the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via AP-1-dependent pathways. **Immunology letters**, v. 103, n. 2, p. 159–66, 15 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368150>>. Acesso em: 25 out. 2014.

COPE, A. P.; GIBBONS, D. L.; ADERKA, D.; FOXWELL, B. M.; WALLACH, D.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M. Differential regulation of tumour necrosis factor receptors (TNF-R) by IL-4; upregulation of P55 and P75 TNF-R on synovial joint mononuclear cells. **Cytokine**, v. 5, n. 3, p. 205–212, 1993.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677023>>. Acesso em: 1 set. 2014.

DAMIENS, C.; FORTUN, Y.; CHARRIER, C.; HEYMANN, D.; PADRINES, M. Modulation by soluble factors of gelatinase activities released by osteoblastic cells. **Cytokine**, v. 12, n. 11, p. 1727–31, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11052827>>. Acesso em: 25 out. 2014.

DE GRAUW, J. C.; VAN DE LEST, C. H. A.; VAN WEEREN, P. R. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: a longitudinal experimental study. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 2, p. R35, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19272138>>. Acesso em: 29 set. 2016.

DE NÊUTON, F.; MAGALHÃES, O.; SOARES, S. C.; TORRES, J. M.; UNGARETTI, A.; CACCIACARRO, M. F.; TEIXEIRA, M. J.; FONOFF, E. T. 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, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3833839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. **Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers** *Analytical Biochemistry*. [s.l.] Academic Press, 1976. .

DIMOCK, a N.; SICILIANO, P. D.; MCILWRAITH, C. W. Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 5, p. 439–43, set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11037267>>.

ENDO, H.; NISHIMURA, A. A.; TONEGAWA, M.; TAKAGISHI, K.; KASHIWAZAKI, S. Experimental arthritis induced by continuous infusion of IL-8 into rabbit knee joints. **Clinical Experimental Immunology**, v. 96, n. 1, p. 31–35, 1994.

FAHMI, H.; DI BATTISTA, J. a; PELLETIER, J. P.; MINEAU, F.; RANGER, P.; MARTEL-PELLETIER, J. Peroxisome proliferator--activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 3, p. 595–607, mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263774>>.

FIGUEROA, 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.

FLANNERY, C. R.; LITTLE, C. B.; HUGHES, C. E.; CURTIS, C. L.; CATERSON, B.; JONES, S. a. IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. **Matrix Biology**, v. 19, n. 6, p. 549–553, nov. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X00001116>>.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; WERPY, N. M.; PARK, R. D.; MCILWRAITH, C. W. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. **American journal of veterinary research**, v. 68, n. 3, p. 290–6, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331019>>. Acesso em: 29 set. 2016.

FULLER, C. J.; BARR, A. R.; SHARIF, M.; DIEPPE, P. A. 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.; TERESA, A.; HUGO, S.; EUGENIA, D. 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.

GOODSTONE, N. J.; HARDINGHAM, T. E. Tumour necrosis factor a stimulates nitric oxide production more potently than interleukin-1 b in porcine articular chondrocytes. **Rheumatology**, v. 41, n. 8, p. 883–891, 2002.

GRACIE, J. a; FORSEY, R. J.; CHAN, W. L.; GILMOUR, a; LEUNG, B. P.; GREER, M. R.; KENNEDY, K.; CARTER, R.; WEI, X. Q.; XU, D.; FIELD, M.; FOULIS, a; LIEW, F. Y.; MCINNES, I. B. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 10, p. 1393–401, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=409841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GRIMAUD, E.; HEYMAN, D.; RÉDINI, F. Recent advances in TGF- $\beta$  effects on chondrocyte metabolism: Potential therapeutic roles of TGF- $\beta$  in cartilage disorders. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 3, p. 241–257, 2002.

HADDAD, M. A.; SOUZA, M. V.; HINCAPIE, J. J.; RIBEIRO, J. I.; RIBEIRO FILHO, J. D.; BENJAMIN, L. A. 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.

HART, P. H.; AHERN, M. J.; SMITH, M. D.; DISEASES, I. 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.

HAWKINS, D. L.; CARGILE, J. L.; MACKAY, R. J.; BROOME, T. A.; SKELLEY, L. A. Effect of tumor necrosis factor antibody on synovial fluid cytokine activities in equine antebrachio-carpal joints injected with endotoxin. **American journal of veterinary research**, v. 56, n. 10, p. 1292–9, out. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8928945>>. Acesso em: 29 set. 2016.

HENROTIN, Y. .; BRUCKNER, P.; PUJOL, J.-P. . The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 10, p. 747–755, 2003.

- HERNANZ, A.; MEDINA, S.; DE MIGUEL, E.; MARTÍN-MOLA, E. Effect of calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y, substance P, and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by peripheral whole blood cells from rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Regulatory Peptides**, v. 115, n. 1, p. 19–24, 2003.
- HONORATI, M. C.; CATTINI, L.; FACCHINI, A. IL-17, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 12, n. 9, p. 683–91, set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325633>>. Acesso em: 25 out. 2014.
- HONORATI, M. C.; NERI, S.; CATTINI, L.; FACCHINI, A. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 14, n. 4, p. 345–52, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311048>>. Acesso em: 25 out. 2014.
- ILIAKIS, E.; VALADAKIS, V.; VYNIOS, D. H.; TSIGANOS, C. P.; AGAPITOS, E. 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. Disponível em: <<http://neu.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/19714009010140S105>>. Acesso em: 27 set. 2016.
- JANI, P.; PATEL, G.; YADAV, P.; SANT, L.; JAIN, H. Ozone therapy: the alternative medicine of future. **Indian Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 2, n. 4, p. 196–203, 2012.
- JAQUES, L. B.; BALLIEUX, R. E.; DIETRICH, C. P.; KAVANAGH, L. W. A microelectrophoresis method for heparin. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 351–60, maio 1968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4177320>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- JIKKO, A.; WAKISAKA, T.; IWAMOTO, M.; HIRANUMA, H.; KATO, Y.; MAEDA, T.; FUJISHITA, M.; FUCHIHATA, H. Effects of Interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures. **Cell Biology International**, v. 22, n. 9/10, p. 615–621, 1998.
- JOHN, T.; KOHL, B.; MOBASHERI, A.; ERTEL, W.; SHAKIBAEI, M. Interleukin-18 induces apoptosis in human articular chondrocytes. **Histology and Histopathology**, v. 22, n. 5, p. 469–482, 2007.
- JOVANIC, D.; PELLETIER, J.P.; ALAAEDDINE, N.; MINEAU, F.; GENG, C.; RANGER, P.; MARTEL-PELLETIER, J. Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 6, n. 1, p. 40–49, 1997.
- KAY, A. T.; BOLT, D. M.; ISHIHARA, A.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; BERTONE, A. L. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24220424>>. Acesso em: 1 set. 2014.

KIDD, J.; LU, K. G.; FRAZER, M. L. **Atlas of equine ultrasonography**. 1ª edição ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2014.

KOSTER, J. F.; BIEMOND, P.; SWAAK, A. J. Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 45, n. 1, p. 44–6, jan. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3954457>>. Acesso em: 29 set. 2016.

KUMAR, S.; VOTTA, B. J.; RIEMAN, D. J.; BADGER, A. M.; GOWEN, M.; LEE, J. C. IL-1- and TNF-Induced Bone Resorption Is Mediated by p38 Mitogen Activated Protein Kinase. **Journal of cellular physiology**, v. 187, n. 3, p. 294–303, 2001.

KVAM, B.J.; FRAGONAS, E.; DEGRASSI, A.; KVAM, C.; MATULOVA, M.; POLLESELLO, P.; ZANETTI, F.; VITTURI, F. Oxygen-derived free radicals (ODFR) action on hyaluronan (HA), on two HA ester derivatives, and on the metabolism of articular chondrocytes. **Experimental Cell Research**, v. 218, n. 1, p. 79–86, 1995.

LAM, F. Y.; FERRELL, W. R. Acute inflammation in the rat knee joint attenuates sympathetic vasoconstriction but enhances neuropeptide-mediated vasodilatation assessed by laser Doppler perfusion imaging. **Neuroscience**, v. 52, n. 2, p. 443–449, 1993.

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.

LEONARD, E. J.; YOSHIMURA, T. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 2, n. 6, p. 479–86, jun. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2189453>>.

LEUNG, B. P.; MCINNES, I. B.; ESFANDIARI, E.; WEI, X.-Q.; LIEW, F. Y. Combined Effects of IL-12 and IL-18 on the Induction of Collagen-Induced Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6495–6502, 15 jun. 2000. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.164.12.6495>>. Acesso em: 25 out. 2014.

LEY, C.; SVALA, E.; NILTON, A.; LINDAHL, A.; ELORANTA, M.-L.; EKMAN, S.; SKIÖLDEBRAND, E. Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures. **Connective Tissue Research**, v. 52, n. 4, p. 290–300, 30 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03008207.2010.523803>>. Acesso em: 29 set. 2016.

LINTAS, G.; MOLINARI, F.; MEMBER, S.; SIMONETTI, V.; FRANZINI, M.; LIBONI, W. 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.

LISIGNOLI, G.; TONEGUZZI, S.; POZZI, C.; PIACENTINI, A.; RICCIO, M.; FERRUZZI, A.; GUALTIERI, G.; FACCHINI, A. Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 26, n. 4, p. 791–9, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229398>>. Acesso em: 29 set. 2016.

LOTZ, M.; CARSON, D. A.; VAUGHAN, J. H. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 235, n. 4791, p. 893–5, 20 fev. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2433770>>. Acesso em: 28 set. 2016.

MAGALHAES, F. N. D. O.; DOTTA, L.; SASSE, A.; TEIXERA, M. J.; FONOFF, E. T. Ozone therapy as a treatment for low back pain secondary to herniated disc: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Pain physician**, v. 15, n. 2, p. E115-29, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430658>>.

MAGESH, S.; CHEN, Y.; HU, L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 4, p. 687–726, jul. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/med.21257>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

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.; DELGADO-ROCHE, L.; DÍAZ-BATISTA, A.; PÉREZ-DAVISON, G.; RE, L. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796450>>. Acesso em: 1 set. 2014.

MATAYOSHI, T.; GOTO, T.; FUKUHARA, E.; TAKANO, H.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, T. Neuropeptide substance P stimulates the formation of osteoclasts via synovial fibroblastic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, n. 3, p. 756–764, 2005.

MAWSOUF, M. N.; EL-SAWALHI, M. M.; DARWISH, H. A.; SHAHEEN, A. A. 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. 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, 5 jan. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2746/042516405774480102>>. Acesso em: 29 set. 2016.

MCILWRAITH, C. W. The use of intra-articular corticosteroids in the horse: What is known on a scientific basis? **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 6, p. 563–571, 2010.

MCILWRAITH, C. W.; FESSLER, J. F.; BLEVINS, W. E.; PAGE, E. H.; REBAR, A. H.; VAN SICKLE, D. C.; COPPOC, G. L. Experimentally induced arthritis of the equine carpus: clinical determinations. **American journal of veterinary research**, v. 40, n. 1, p. 11–20, jan. 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/453671>>. Acesso em: 29 set. 2016.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; VAN WEEREN, P. R. **Joint disease in the horse**. 2ª edição ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24071048>>. Acesso em: 1 set. 2014.

MENKES, C. J.; RENOUX, M.; LAOUSSADI, S.; MAUBORGNE, A.; BRUXELLE, J.; CESSÉLIN, F. Substance P levels in the synovium and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 20, n. 4, p. 714–7, abr. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684449>>. Acesso em: 28 set. 2016.

MERZ, D.; LIU, R.; JOHNSON, K.; TERKELTAUB, R. IL-8/CXCL8 and Growth-Related Oncogene /CXCL1 Induce Chondrocyte Hypertrophic Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 8, p. 4406–4415, 6 out. 2003. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.8.4406>>. Acesso em: 25 out. 2014.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2812–2823, 1993.

MISHRA, S. K.; PRAMANIK, R.; DAS, P.; DAS, P. P.; PALIT, A. K.; ROY, J.; HALDER, R. N. 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.; BONG, D.; NAREDO, E.; FILIPPUCCI, E.; CARRASCO, I.; MORAGUES, C.; IAGNOCCO, A. Ultrasound in the study and monitoring of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. SUPPL. 3, p. 4–7, 2008.

MORAES, A. P. L.; MOREIRA, J. J.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y. M.; BACCARIN, R. Y. A. 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.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26246629>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4502851>>.

- MOREIRA, J. J.; MORAES, A. P. L.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y. M.; MASSOCO, C. O.; BACCARIN, R. Y. A. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25269714>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- MORRIS, E. A.; MCDONALD, B. S.; WEBB, A. C.; ROSENWASSER, L. J. Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. **American journal of veterinary research**, v. 51, n. 1, p. 59–64, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2301820>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 11, p. 549–557, 2004.
- NEIMARK, a I.; NEPOMNYASHCHIKH, L. M.; LUSHNIKOVA, E. L.; BAKAREV, M. a; ABDULLAEV, N. a; SIZOV, K. a. 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, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24771385>>.
- NEMOTO, O.; YAMAGISHI, M.; YAMADA, H.; KIKUCHI, T.; TAKAISHI, H. Matrix Metalloproteinase-3 Production by Human Degenerated Intervertebral Disc. **Journal of Spinal Disorders**, v. 10, n. 6, p. 493–498, dez. 1997. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002517-199712000-00006>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- 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. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/62.681?from=CrossRef>>.
- OGUZ, E.; EKINCI, S.; EROGLU, M.; BILGIC, S.; KOCA, K.; DURUSU, M.; KALDIRIM, U.; SADIR, S.; YURTTAS, Y.; CAKMAK, G.; KILIC, A.; PURTULOGLU, T.; OZYUREK, S.; CEKLI, Y.; OZKAN, H.; SEHIRLIOGLU, A. 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, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920551>>. Acesso em: 1 set. 2014.
- OSTALOWSKA, A.; BIRKNER, E.; WIECHA, M.; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; KAPOLKA, D.; ZON-GIEBEL, A. 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.; TOKER, H.; BALCI, H.; OZER, H. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452156>>. Acesso em: 1 set. 2014.

- PALMER, B. Y. J. A. N. L.; BERTONE, A. L.; MALEMUD, C. J.; MANSOUR, J. Biochemical and biomechanical alterations in equine articular cartilage following an experimentally-induced synovitis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 4, n. 2, p. 127–137, 1996.
- 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.; DI SANTE, L.; CACCHIO, A.; APUZZO, D.; MAROTTA, S.; RAZZANO, M.; FRANZINI, M.; SANTILLI, V. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478653>>. Acesso em: 27 set. 2016.
- 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.
- PECORELLI, A.; BOCCI, V.; ACQUAVIVA, A.; BELMONTE, G.; GARDI, C.; VIRGILI, F.; CICCOLI, L.; VALACCHI, G. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 267, n. 1, p. 30–40, 2013.
- POOLE, A. R.; ROSENBERG, L. C.; REINER, A.; IONESCU, M.; BOGOCH, E.; ROUGHLEY, P. J. 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, set. 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jor.1100140502>>. Acesso em: 27 set. 2016.
- 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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jor.1100150402>>. Acesso em: 28 set. 2016.
- RAMÍREZ, E. M. M.; RAMOS, N. C.; LEE, G. F.; AGUÍN, M. M. Administración tópica de ozono en dos casos de infección atípica de incisiones abdominales. **Recursos Educativos**, v. 5, n. 3, p. 183–188, 2013.
- RATHAKRISHNAN, C.; TIKU, K.; RAGHAVAN, A.; TIKU, M. L. Release of oxygen radicals by articular chondrocytes: A study of luminol-dependent chemiluminescence and hydrogen peroxide secretion. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 10, p. 1139–1148, 3 dez. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jbmr.5650071005>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- RELIC, B.; GUICHEUX, J.; MEZIN, F.; LUBBERTS, E.; TOGNINALLI, D.; GARCIA, I.; VAN DEN BERG, W. B.; GUERNE, P. -a. IL-4 and IL-13, But Not IL-10, Protect Human Synoviocytes from Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 4, p. 2775–2782, 15 fev. 2001. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.166.4.2775>>. Acesso em: 25 out. 2014.

- RICHARDSON, D. W.; DODGE, G. R. Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. **American journal of veterinary research**, v. 61, n. 6, p. 624–30, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850836>>. Acesso em: 30 jan. 2017.
- ROUSSEAU, J. C.; GARNERO, P. Biological markers in osteoarthritis. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 265–277, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2012.04.001>>.
- 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. 2011a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3298518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 set. 2014.
- 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, 20 dez. 2011b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185664>>. Acesso em: 17 jan. 2017.
- SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 249–57, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22387238>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- SCHUERWEGH, a. .; DOMBRECHT, E. .; STEVENS, W. .; VAN OFFEL, J. .; BRIDTS, C. .; DE CLERCK, L. . Influence of pro-inflammatory (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 9, p. 681–687, set. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458403001560>>. Acesso em: 25 out. 2014.
- SCHWARTZ, A.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. Ozone Therapy and Its Scientific Foundations. **Revista Española de Ozonioterapia**, v. 2, n. 1, p. 199–232, 2012.
- SÉGUIN, C. a; BERNIER, S. M. TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. **Journal of cellular physiology**, v. 197, n. 3, p. 356–69, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14566965>>. Acesso em: 3 out. 2014.
- SEITZ, M.; LOETSCHER, P.; DEWALD, B.; TOWBIN, H.; CESKA, M. Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chemotactic proteins, and prostaglandin E by rheumatoid and osteoarthritic synoviocytes-regulation by IFN- $\gamma$  IL-4. **Journal of Immunology**, v. 152, n. 4, p. 2060–2065, 1994.
- SEYMAN, D.; OZEN, N. S.; INAN, D.; ONGUT, G.; OGUNC, D. Pseudomonas aeruginosa septic arthritis of knee after intra-articular ozone injection. **New Microbiologica**, v. 35, p. 345–348, 2012.
- SHALOM-BARAK, T.; QUACH, J.; LOTZ, M. Interleukin-17-induced Gene Expression in Articular Chondrocytes Is Associated with Activation of Mitogen-activated Protein Kinases and NF- $\kappa$ B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 42, p. 27467–27473, 16 out. 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.42.27467>>. Acesso em: 25 out. 2014.

SILVA, M. M. **Desenvolvimento de protocolo de avaliação , por determinação de escore , das alterações encontradas nas doenças articulares em equinos e sua correlação com evolução após tratamento são paulo desenvolvimento de protocolo de avaliação , por determinação de.** 2014. Universidade de São Paulo/ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2014. Disponível em:

<<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/45978/desenvolvimento-de-protocolo-de-avaliacao-por-escore-das-alteracoes-encontradas-nas-doencas-articu/>>.

SMITH, R. J.; JUSTEN, J. M.; SAM, L. M.; ROHLOFF, N. A.; RUPPEL, P. L.; BRUNDEN, M. N.; CHIN, J. E. Platelet-derived growth factor potentiates cellular responses of articular chondrocytes to interleukin-1. **Arthritis & Rheumatism**, v. 34, n. 6, p. 697–706, jun. 1991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.1780340610>>. Acesso em: 29 set. 2016.

SOUZA, Y. M. De; FONTES, B.; MARTINS, J. O.; SANNOMIYA, P.; BRITO, G. S.; YOUNES, R. N.; RASSLAN, S. 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. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2827707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 set. 2014.

SPIERS, S. U. E.; MAY, S. A.; BENNETT, D.; EDWARDST, G. B. Cellular sources of proteolytic enzymes in equine joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 1, p. 43–47, 1994.

STEEL, C. M. Equine synovial fluid analysis. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 24, n. 2, p. 437–54, viii, ago. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652964>>. Acesso em: 29 set. 2016.

SURAPANENI, K. M.; VENKATARAMANA, G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymer in patients with osteoarthritis. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 61, n. 1, p. 9–14, 2007.

SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P.; GENT, T.; FREEMAN, S.; FOSTER, N.; BARRETT-JOLLEY, R.; MOBASHERI, A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis.

**Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 179, n. 1, p. 10–24, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911037>>. Acesso em: 5 set. 2014.

TAKAFUJI, V. A.; MCILWRAITH, C. W.; HOWARD, R. D. Effects of equine recombinant interleukin-1  $\alpha$  and interleukin-1  $\beta$  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.

TRIPPEL, S. B. Growth factor actions on articular cartilage. **The Journal of Rheumatology. Supplement**, v. 43, p. 129–32, fev. 1995. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7752116>>. Acesso em: 28 set. 2016.

TRUMBLE, T. N. The use of nutraceuticals for osteoarthritis in horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 21, n. 3, p. 575–597, 2005.

TSUZUKI, N.; ENDO, Y.; KIKKAWA, L.; KOROSUE, K.; KANEKO, Y.; KITAUCHI, A.; KATAMOTO, H.; HIDAHA, Y.; HAGIO, M.; TORISU, S. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 12, p. 1647–1650, 2015. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/77/12/77\\_15-0225/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/77/12/77_15-0225/_article)>.

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, maio 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8067622>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

UYSAL, B.; DEMIRBAG, S.; POYRAZOGLU, Y.; CAYCI, T.; YESILDAGLAR, N.; GUVEN, A.; SÜRER, I.; KORKMAZ, A. Medical ozone therapy decreases postoperative uterine adhesion formation in rats. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 286, n. 5, p. 1201–7, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740111>>. Acesso em: 1 set. 2014.

VAILLANT, J. D.; FRAGA, A.; DÍAZ, M. T.; MALLOK, a; VIEBAHN-HÄNSLER, R.; FAHMY, Z.; BARBERÁ, A.; DELGADO, L.; MENÉNDEZ, S.; FERNÁNDEZ, O. S. L. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23911887>>. Acesso em: 1 set. 2014.

VAN PELT, R. W. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 1, p. 91–5, 1 jul. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4134829>>. Acesso em: 28 set. 2016.

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, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2012.717847>>. Acesso em: 1 set. 2014.

VIGLIANI, A.; BONIPERTI, E.; SCUDO, E. Paravertebral O2-03 Treatment in Mechanical Lumbar Pain in Riding Horses. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 4, p. 64–69, 2005. Disponível em: <[http://www.alessandravigliani.com/public/O2O3\\_4\\_1\\_Dr\\_Vigliani.pdf](http://www.alessandravigliani.com/public/O2O3_4_1_Dr_Vigliani.pdf)>.

WHEAT, J. D. The use of hydrocortisone in the treatment of joint and tendon disorders in large animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 127, n. 940, p. 64–7, jul. 1955. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14392110>>. Acesso em: 28 set. 2016.

WOODS, J. M.; KATSCHKE, K. J.; VOLIN, M. V.; RUTH, J. H.; WOODRUFF, D. C.; AMIN, M. a.; CONNORS, M. a.; KURATA, H.; ARAI, K.-I.; HAINES, G. K.; KUMAR, P.; KOCH, a. E. IL-4 Adenoviral Gene Therapy Reduces Inflammation, Proinflammatory Cytokines, Vascularization, and Bony Destruction in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1214–1222, 15 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.166.2.1214>>. Acesso em: 25 out. 2014.

XI-BING, G. U.; XIAO-JUAN, Y.; HONG-YING, Z. H. U.; YUE-QIN, X. U.; XIA-YING, L. I. U.; HASLERRAIL, G.; EIGHTY-FIVE, M. P.; CSH, T.; THE, H. B. V. D. N. A. Effect of medical ozone therapy on renal blood flow and renal. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 18, p. 2510–2513, 2010.

YANG, L.; FA, X. The effect of substance P on functional proteins in human neutrophil. **Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae**, v. 24, n. 1, p. 98–101, fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12905850>>. Acesso em: 29 set. 2016.

YU, B.; LIN, Q.; WANG, B.; ZHU, Q.; HE, X. 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.

YU, C.; SUN, K.; SHEI, S.; TSAI, C.; TSAI, S. Interleukin 8 modulates interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  release from normal human mononuclear cells. **Immunopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 207–214, 1994.

ZHANG, D. D. Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, n. 4, p. 769–789, 9 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03602530600971974>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

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.

ZOBEL, R.; TKALČIĆ, S.; STOKOVIĆ, I.; PIPAL, I.; BUIĆ, V. 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, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749485>>. Acesso em: 3 nov. 2014.