

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO
ANIMAL NOS TRÓPICOS (PPGSPAT) – MESTRADO
ALESSA RESENDE COSTA

OZONIOTERAPIA NA REPARAÇÃO DE FRATURAS EXPERIMENTAIS EM
FÊMUR DE COELHOS

UBERABA - MG

2021

ALESSA RESENDE COSTA

**OZONIOTERAPIA NA REPARAÇÃO DE FRATURAS EXPERIMENTAIS EM
FÊMUR DE COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba – UNIUBE, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

**Orientadora: Prof^a. Dra. Isabel Rodrigues
Rosado**

**Coorientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini
Leonel Alves**

**UBERABA – MG
2021**

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

C823o Costa, Alessa Resende.
Ozonioterapia na reparação de fraturas experimentais em fêmur de coelhos / Alessa Resende Costa. – Uberaba, 2021.
50 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado.

Coorientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.

I. Ortopedia veterinária. 2. Terapia. 3. Ozônio. 4. Medicina veterinária.
I. Rosado, Isabel Rodrigues. II. Alves, Endrigo Gabellini Leonel. III. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. IV. Título.

CDD 636.08967

ALESSA RESENDE COSTA

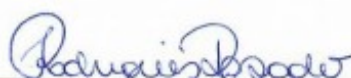
OZONIOTERAPIA NA REPARAÇÃO DE FRATURAS EXPERIMENTAIS EM FÊMUR DE
COELHOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 17/12/2021

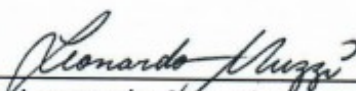
BANCA EXAMINADORA:



Profª. Drª. Isabel Rodrigues Rosado - Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Leonardo Augusto Lopes Muzzi
Universidade Federal de Lavras

Dedico este trabalho a minha família e amigos, especialmente à minha mãe Eliete, ao meu pai Amarildo, ao meu irmão Victor e ao meu noivo Diego por todo carinho, compreensão e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e saúde durante toda a caminhada. Obrigada por manter a minha fé, esperança e perseverança durante toda essa etapa.

Agradeço a minha mãe Eliete, ao meu pai Amarildo e ao meu irmão Victor por serem a minha base mais sólida, por estarem ao meu lado em todas as etapas e por serem exemplos de honestidade, cumplicidade e amor.

Agradeço ao meu noivo Diego por toda paciência, apoio e participação nessa trajetória. Sem você tudo teria sido muito mais árduo. Obrigada por todo companheirismo, compreensão e carinho.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Isabel Rodrigues Rosado pela dedicação, ensinamentos e compreensão a mim dedicados.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves pelo apoio, participação e conhecimentos, os quais sou muito grata por ter aprendido tanto.

À Raquel Lima Andrade, amiga e mestranda por toda amizade, companheirismo, amor e carinho dedicado aos coelhos do experimento.

Ao médico veterinário Márcio de Freitas Espinoza pela ajuda com as aplicações de ozônio, pela amizade, compreensão e dedicação para com o projeto.

À Camilla Beatriz da Silva e demais colaboradores do setor de pesquisa e análise histológicas da Universidade de Uberaba pela amizade, auxílio e compreensão.

Aos alunos Júlia, Henrique, Paola e Cássia por toda parceria e auxílio com os cuidados com os coelhos, esses feitos com muito amor e carinho. Vocês tornaram todo trabalho muito mais lindo devido a tamanha preocupação com o bem estar dos animais.

À aluna Isabella, aluna da IC, por ser um ombro amigo nos momentos de angústia, por toda a dedicação para com o projeto e por amor e carinho dedicado aos coelhos.

Aos profissionais, Anna Carolina, Juliana, André e José Roberto, do setor de diagnóstico por imagem do hospital veterinário pelo auxílio, paciência e carinho no momento dos exames radiológicos dos coelhos.

Ao Dr. Bruno Machado Bertassoli por toda dedicação e empenho na leitura das lâminas para análise histomorfométrica. Obrigada por dedicar seu tempo e conhecimento para a execução desse projeto.

Ao Dr. Moacir Santos de Lacerda por ter sido meu exemplo de profissional para a carreira de docência, por me incentivar e acreditar na minha capacidade. Obrigada por tantos conselhos e amizade.

Agradeço as minhas cachorras Nina (*in memoriam*) e Luísa por dar mais alegria a minha vida e por me lembrarem diariamente o quanto a vida animal é importante, e o quanto se faz necessário nos capacitarmos cada vez mais.

Agradeço aos meus amigos por todo incentivo, vibração e torcida nessa etapa tão importante na minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, quando eu mesma duvidei.

Aos meus amigos e colegas de profissão Marco Túlio e Flávia pela amizade e disponibilidade em me ajudar a todo o momento. Vocês tiveram participação especial nesse projeto por iluminarem meu caminho me ajudando a dar soluções para os obstáculos que apareceram de última hora.

A Mariani, colaboradora do RELAM – UFU que mesmo sem me conhecer se dispôs do seu precioso tempo para me ajudar com o scanner das lâminas. Sem a sua ajuda tudo teria sido muito mais difícil.

Aos funcionários do Hospital Veterinário de Uberaba que sempre estiveram dispostos a ajudar quando solicitados.

Aos colegas veterinários do hospital que sempre auxiliaram e orientaram a pesquisa.

Aos professores Renato Linhares Sampaio, Rodrigo Supranzetti Rezende e Endrigo Gabellini Leonel Alves por terem aceitado o convite de estarem presente na banca de qualificação e por fazerem observações, correções e discussões necessárias para a melhoria do trabalho.

Aos professores Leonardo Augusto Lopes Muzzi e Renato Linhares Sampaio por aceitarem participar da minha banca de defesa da dissertação. Será um prazer tê-los presente nesse fechamento de ciclo tão importante para mim.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À UNIUBE e PROPEPE, pelo financiamento do experimento.

À UNIUBE, pela oportunidade de ingressar no programa de pós-graduação e por permitir meu crescimento profissional.

E um agradecimento especial aos coelhos do experimento pela doçura mesmo em momentos desconfortáveis. Obrigada pela oportunidade de ter essa convivência e experiência com a espécie. Sempre irei lembrar de cada um desses animais com muito carinho e gratidão.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Escore adaptado de Yuehue e Friedman (1999), utilizado na avaliação radiográfica de alinhamento das articulações adjacentes após osteossíntese para correção de osteotomia experimental em femur de coelhos..... | 27 |
| Tabela 2. | Escore adaptado de Yuehue e Friedman (1999), utilizado na avaliação radiográfica de aparato empregado em osteossíntese para correção de osteotomia experimental em femur de coelhos..... | 27 |
| Tabela 3. | Escore adaptado de Yuehue e Friedman (1999), utilizado na avaliação radiográfica de aposição dos fragmentos após osteossíntese para correção de osteotomia experimental em femur de coelhos..... | 27 |
| Tabela 4. | Escore adaptado de Yuehue e Friedman (1999), utilizado na avaliação radiográfica de atividade biológica após osteossíntese para correção de osteotomia experimental em femur de coelhos..... | 27 |
| Tabela 5. | Medianas e distâncias interquartílicas de escores de alinhamento, aparato e aposição de fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório..... | 31 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 1. | Aparelho portátil gerador de gás ozônio terapêutico, da marca Ozonic, utilizado para a realização das sessões de ozonioterapia subcutânea e intrarretal nos coelhos pertencentes ao grupo submetido a ozonioterapia após osteotomia e osteossíntese femoral..... | 25 |
| Figura 2. | Primeira aplicação local de gás ozônio por via subcutânea (perilesional) utilizando seringa de 10 ml e agulha hipodérmica 45 mmx13 mm, 72 horas após a cirurgia de osteotomia e osteossíntese femoral em coelho. | 25 |
| Figura 3. | Primeira aplicação sistêmica de gás ozônio por via intrarretal utilizando uma seringa de 10ml com gás ozônio e com auxílio de uma sonda uretral nº 6 introduzida cerca de 5cm através do esfíncter anal, 72 horas após a cirurgia de osteotomia e osteossíntese femoral em coelho..... | 26 |
| Figura 4. | Imagens radiográficas de fêmures de coelhos submetidos a osteotomia e fixação com placa e tratamento ou não com ozônio, avaliações pós-operatórias aos 45 e 90 dias. Observar que a reparação óssea secundária e que houve maior formação de calo ósseo no grupo tratado com ozônio (B)..... | 31 |
| Figura 5. | Dispersão dos escores de reação periosteal em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C). | 32 |
| Figura 6. | Dispersão dos escores de formação de calo ósseo em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C). | 33 |
| Figura 7. | Dispersão dos escores de formação de ponte óssea em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C)..... | 34 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Figura 8. | Dispersão dos escores de linha de osteotomia em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C). | 35 |
| Figura 9. | Dispersão dos escores de remodelação em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney ($p < 0,05$) (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$) (Gráficos B e C)..... | 36 |
| Figura 10. | Dispersão dos escores de atividade biológica de fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C)..... | 37 |
| Figura 11. | Fotografia de corte histológico do osso neoformado no calo ósseo de fraturas experimentais criadas em terço médio de diáfise de fêmur de coelhos, coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas em aumento 10X. (A) grupo controle e (B) tratados com ozônio, 45 e 90 dias pós-operatório. Régua: 200 μ m..... | 38 |
| Figura 12. | Média e desvio padrão da área óssea no calo ósseo de fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação histológica aos 45 e 90 dias de pós-operatório. *Representa diferença significativa pelo teste T de Student ($p > 0,05$)..... | 39 |
| Figura 13. | Média e desvio padrão do número de osteócitos no calo ósseo de fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação histológica aos 45 e 90 dias de pós-operatório. *Representa diferença significativa pelo teste T de Student ($p > 0,05$)..... | 39 |

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da ozonioterapia na reparação de fraturas experimentais em fêmures de coelhos por meio de avaliação clínica, radiográfica e histológica. Foram utilizados 24 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, machos, que foram submetidos à osteotomia femoral e osteossíntese e divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (n=12), que não recebeu tratamento complementar e ozônio (n=12) que recebeu ozonioterapia por vias subcutânea e retal no pós-operatório. O exame clínico dos animais foi realizado diariamente com inspeção da ferida cirúrgica e palpação femoral para verificar a existência de reação inflamatória, instabilidade do foco de fratura, hipotrofia muscular e sensibilidade dolorosa. Avaliações radiográficas foram realizadas no pós-operatório imediato e após 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, utilizando uma escala adaptada para classificação dos escores de alinhamento, aparato, aposição e atividade biológica. Realizou-se avaliação histológica aos 45 e 90 dias de pós-operatório. A análise estatística para dados não paramétricos e não pareados foi realizada pelo teste de Mann Whitney, e para dados não paramétricos e pareados pelo teste Wilcoxon. Os dados paramétricos foram analisados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e as médias comparadas pelo teste T de Student. Clinicamente os animais se recuperaram bem no pós-operatório, sem apresentarem complicações. Não houve diferença significativa entre as medianas dos escores de alinhamento, aparato, aposição, reação periosteal, formação de calo ósseo, ponte óssea, linha de osteotomia e remodelação nos grupos controle e ozônio em nenhum dos tempos avaliados. Entretanto, quando comparado dentro do mesmo grupo, houve aumento significativo dos escores de formação de calo ósseo e de ponte óssea aos 15 e 30 dias em ambos os grupos experimentais. Houve aumento significativo dos escores de linha de osteotomia aos 15, 30 e 45 dias em ambos os grupos e no escore de remodelação aos 90 dias no controle e aos 45 dias no ozônio. A mediana do escore de atividade biológica do grupo ozônio foi superior ao controle aos 30 dias. A área de neoformação óssea foi maior no grupo ozônio quando comparada ao controle aos 45 e 90 dias de pós-operatório. Observou-se redução na área de osso neoformado no grupo ozônio aos 90 dias quando comparada aos 45 dias de pós-operatório. A contagem de osteócitos foi maior no grupo ozônio quando comparada ao controle aos 90 dias de pós-operatório. Conclui-se que o ozônio favoreceu a reparação de fraturas por meio do aumento do número de osteócitos e da produção de matriz óssea.

Palavras-chaves: ortopedia, ozônio, medicina veterinária, terapia complementar.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of ozone therapy in the repair of experimental femoral fractures in rabbits through clinical, radiographic and histological evaluation. Twenty-four New Zealand male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were used, which were subjected to femoral osteotomy and osteosynthesis and randomly divided into two groups: control (n=12), who did not receive complementary treatment and ozone (n=12) who received ozone therapy via subcutaneous and rectal routes in the postoperative period. The clinical examination of the animals was performed daily with inspection of the surgical wound and femoral palpation to check for the existence of an inflammatory reaction, fracture site instability, muscle atrophy and pain sensitivity. Radiographic evaluations were carried out in the immediate postoperative period and after 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days, using an adapted scale for classification of alignment, apparatus, apposition and biological activity scores. Histological evaluation was performed at 45 and 90 days after surgery. Statistical analysis for non-parametric and unpaired data was performed using the Mann Whitney test, and for non-parametric and paired data using the Wilcoxon test. Parametric data were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests and the means were compared using the Student's T test. Clinically, the animals recovered well in the postoperative period, without any complications. There were no significant differences between the median scores for alignment, apparatus, apposition, periosteal reaction, bone callus formation, bone bridge, osteotomy line and remodeling in the control and ozone groups in any of the evaluated times. However, when compared within the same group, there was a significant increase in bone callus formation and bone bridge scores at 15 and 30 days in both experimental groups. There were significant increases in the osteotomy line scores at 15, 30 and 45 days in both groups and in the remodeling score at 90 days in the control and at 45 days in ozone group. The median biological activity score of the ozone group was higher than the control at 30 days. The area of bone neoformation was greater in the ozone group when compared to the control at 45 and 90 days after surgery. There was a reduction in the newly formed bone area in the ozone group at 90 days when compared to 45 days after surgery. Osteocyte counts were higher in the ozone group when compared to the control group at 90 days after surgery. It is concluded that ozone favored fracture repair by increasing the number of osteocytes and the secretion of bone matrix.

Keywords: orthopedics, ozone, veterinary medicine, complementary therapy.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | X |
| ABSTRACT | XI |
| INTRODUÇÃO | 13 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| OBJETIVO | 21 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| ANIMAIS | 21 |
| OSTEOTOMIA E OSTEOSSÍNTESE FEMORAL | 22 |
| PRÉ-OPERATÓRIO..... | 22 |
| TRANSOPERATÓRIO | 22 |
| PÓS-OPERATÓRIO..... | 23 |
| OZONIOTERAPIA..... | 23 |
| AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS | 26 |
| AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA | 26 |
| AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA..... | 28 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA | 29 |
| RESULTADOS | 30 |
| DISCUSSÃO | 40 |
| CONCLUSÃO..... | 45 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |
| ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA..... | 50 |

INTRODUÇÃO

As fraturas ósseas representam 45% dos atendimentos ortopédicos de pequenos animais nas clínicas e hospitais veterinários e as principais causas são traumas por quedas e/ou acidentes automobilísticos (COSTA; SCHOSSLER, 2002; BOIANIE, 2007).

O tratamento das fraturas tem como objetivo restaurar à função do membro promovendo estabilidade e condições para a reparação do tecido ósseo, e quanto mais rápido é o retorno da função do membro acometido menores são as chances de complicações. A necessidade do rápido retorno a função se torna ainda mais importante na veterinária devido à dificuldade em promover a restrição ao esforço físico do paciente, a fim de evitar uma sobrecarga precoce no osso fraturado (CROCI *et al.*, 2003).

A fim de otimizar a reparação óssea e manter o paciente confortável e sem dor, a medicina veterinária tem incorporado ao tratamento convencional o uso de terapias complementares. A realização de fisioterapia, acupuntura, aplicação de ondas ultrassonográficas, utilização de biomateriais e laserterapia são exemplos de terapias complementares utilizadas na recuperação do paciente com fratura (TEIXEIRA *et al* 2004; SOUZA *et al* 2008; ALVES *et al* 2010; SEVERO *et al* 2010; SOUZA, 2013; PRYDIE; HEWITT, 2015; FIGUEREIDO *et al*, 2018; KLOS; COLDEBELLA; JANDREY, 2020).

Dentro deste contexto a ozonioterapia surge como uma opção promissora, e consiste na aplicação de ozônio, um gás incolor, com odor característico e instável. Esta última característica requer que o ozônio seja produzido imediatamente antes da sua aplicação e, para isso, há geradores que produzem este gás de forma medicinal (BOCCI, 2006).

O ozônio possuiu características imunomoduladora, analgésica, anti-inflamatória, oxidante e oxigenante, o que favorece a neovascularização e proliferação tecidual (MADEJ *et al.*, 2007). A sua aplicação é simples e de baixo custo e pode ocorrer pela forma sistêmica e/ou local. A escolha da via de administração dependerá da afecção e estado clínico do paciente (RODRIGUEZ *et al.*,2018).

Apesar da ozonioterapia apresentar inúmeros benefícios, não são todos pacientes que podem receber o tratamento. Há contraindicação para gestantes, indivíduos com hemorragia ativa, anemia grave e hipertireoidismo. Portanto, é preciso avaliar o paciente antes de indicar esta forma de tratamento complementar (NOGALES *et al.*, 2008).

Há poucos registros científicos dos efeitos adversos da ozonioterapia na medicina veterinária. Quando ocorrem estão relacionados a erros na avaliação do paciente, concentração

inadequada do ozônio, tempo de exposição e frequência de aplicação e por isso é preciso ter cautela e definir cuidadosamente a dose terapêutica a ser utilizada e via de aplicação (BOCCI, 2004).

Poucos são os estudos científicos sobre ozonioterapia e por isso se faz necessário novas pesquisas para esclarecer e comprovar o seu efeito como tratamento complementar na reparação de fraturas. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da ozonioterapia na reparação de fraturas experimentais em fêmur de coelhos por meio de avaliação clínica, radiográfica e histológica.

REVISÃO DE LITERATURA

Aproximadamente um terço de todos os atendimentos na rotina clínico-cirúrgica de cães e gatos correspondem a afecções ortopédicas (LUCAS *et al*, 2001). As fraturas de ossos longos representam 45% dos casos atendidos, sendo o fêmur acometido em 20 a 26% dos pacientes (BOIANIE, 2007). Traumas decorrentes de quedas e acidentes automobilísticos são as principais causas dessas alterações em cães e gatos (COSTA; SCHOSSLER, 2002).

Segundo Piermattei e Flo (1999) a fratura é definida como a descontinuidade de um osso ou cartilagem. As regiões distais dos ossos longos são mais acometidas, e uma das hipóteses levantadas para essa predisposição é a menor quantidade de tecidos moles que recobrem ossos longos, principalmente nesses locais (COSTA; SCHOSSLER, 2002).

Os ossos exercem importância metabólica, funcionando como depósito de cálcio, fosfato e outros íons. São tecidos muito vascularizados, o que permite carrear eletrólitos, oxigênio e nutrientes através de seus capilares. Quando há algum trauma que prejudique a sua vascularização pode ocorrer necrose óssea. Concomitantemente à fratura, geralmente há lesões de tecidos adjacentes e deficiência do aporte sanguíneo. Tais alterações podem comprometer a função do sistema locomotor e, em casos mais graves, podem gerar danos neurológicos e de tecidos adjacentes (KÖNIG; LIEBICH, 2011).

Em geral as fraturas podem ser classificadas de acordo com: 1) o número de linhas de fratura sendo simples quando há apenas um traço, em cunha quando há dois traços e complexa ou cominutiva quando há três ou mais traços; 2) a orientação da linha de fratura, em oblíqua, transversa e espiral e; 3) a extensão das lesões, em completa, incompleta e multifragmentar (PIERMATTEI; DECAMP; FLO, 2009).

A adoção do tratamento mais apropriado deve ser estudada individualmente e dependerá do quadro clínico, idade e temperamento do animal, além do local e tipo da fratura, potencial de rompimento de vascularização e de contaminação bacteriana. Outro fator importante na escolha do tratamento é a condição financeira do tutor e o grau de comprometimento que ele terá com o pós-operatório do seu animal (PIERMATTEI; DECAMP; FLO, 2009).

As principais formas de tratamento para a redução e fixação de fraturas são os métodos cirúrgicos que, em sua maioria, envolvem a utilização de pinos intramedulares, fixadores externos, placas com parafusos ou haste bloqueada e cerclagem com fio de aço. A utilização dessas técnicas eventualmente requer uma nova intervenção cirúrgica para a remoção dos implantes após o processo de consolidação óssea. O acesso à fratura pode gerar danos como

rompimento da vascularização óssea e o potencial de contaminação bacteriana, comprometendo o suprimento sanguíneo do local (HARASEN, 2003). Outras complicações cirúrgicas que podem ocorrer são instabilidade do foco de fratura, migração do implante, rotação e/ou encurtamento do osso afetado, prejudicando assim a recuperação total da função daquele membro (DENNY; BUTTERWOTH, 2006).

Há também os métodos não cirúrgicos e imobilização externa, como, por exemplo, talas e bandagens, os quais consistem na imobilização do membro fraturado e estabilização da fratura para que ocorra a cicatrização óssea e preserve o máximo possível os tecidos moles adjacentes. Ambos os métodos de tratamento de fratura, seja aberto ou fechado, devem sempre serem feitos por profissional capacitado, para diminuir o potencial para complicações (LUCAS *et al.*, 2001; DALLABRIDA *et al.*, 2005).

Para que ocorra uma boa consolidação óssea é preciso que haja redução anatômica, estabilidade no foco da fratura e que proporcione um retorno precoce da função do membro, pois desta forma o tônus muscular é mantido, a nutrição óssea é preservada e com isso melhor movimentação articular. Na ortopedia veterinária otimizar o tempo de consolidação óssea se faz ainda mais necessário pela dificuldade em promover restrição de movimentos dos pacientes, que podem sobrecarregar de forma precoce o osso fraturado após a osteossíntese (CROCI *et al.*, 2003).

O tecido ósseo é considerado um tipo especializado de tecido conjuntivo constituído por células derivadas de células osteoprogenitoras de origem mesenquimal que são os osteoblastos e osteócitos e células originadas de monócitos produzidos na medula hematopoética, que são os osteoclastos. Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) e quando incorporados à matriz orgânica recém sintetizada são denominados osteócitos. Os osteócitos são considerados os osteoblastos maduros e são responsáveis pela manutenção da matriz óssea. Os osteoclastos atuam na osteoclasia que é processo de reabsorção óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A reparação óssea é um processo complexo e multifatorial que consiste em reparar a lesão, promover estabilidade, remodelar o osso e retorno à função. O tempo para a reparação óssea depende de fatores relacionados à fratura, como a deformação relativa (“strain”), o osso acometido, o tipo de fratura, de fatores relacionados ao paciente como idade, presença de comorbidades e comportamento, e ainda de fatores relacionados ao tipo de tratamento escolhido (GIANNOUDIS, EINHORN, MARSH D, 2007).

Em geral, o processo de reparação de uma fratura ocorre em três etapas principais: inflamação, reparo e remodelação. A etapa inflamatória é desencadeada imediatamente após a

fratura e há a formação de hematoma no local que contém vários mediadores inflamatórios, fatores angiogênicos e de crescimento liberados pelas plaquetas, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (DYCE, SACK, WENSING, 2019).

A fase de reparo está relacionada à angiogênese, que é o processo de formação de novos vasos, e posterior osteogênese. O fator de crescimento vascular endotelial estimula a angiogênese para a formação de uma rede de capilar que dará início ao processo de reparação óssea. A rede de capilares permitirá o transporte de nutrientes que serão essenciais para o desenvolvimento da osteogênese. A proliferação de células do periósteo próximo à fratura ocorre no estágio inicial ao reparo, e essas células são precursoras de osteoblastos. Os osteoblastos sintetizam matriz óssea e com isso forma o osso primário que gradualmente se transforma em osso amadurecido com estrutura lamelar típica. Ocorre o amadurecimento dos osteoblastos em osteócitos que farão a manutenção e síntese de matriz óssea. Após o reparo ocorre a remodelação do calo ósseo. A remodelação é caracterizada pela ação dos osteoclastos, que reabsorvem o osso, e osteoblastos que depositam matriz óssea. Os osteoclastos reabsorvem o osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos, e a reabsorção óssea libera fatores que recrutam e estimulam os osteoblastos (CROCI *et al*, 2003; PELISSIER *et al.*, 2004; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017).

Mediante os riscos de complicações pós-operatórias, principalmente devido ao tempo da reparação da fratura, a medicina veterinária busca por novas alternativas de tratamentos complementares que possam ajudar a otimizar a reparação óssea. Tratamentos adjuvantes na reparação de fraturas têm mostrado resultados satisfatórios, como por exemplo: acupuntura, terapia ultrassônica, fisioterapia, laserterapia e utilização de biomaterial. Outro exemplo de terapia adjuvante é aplicação de ozônio (SOUZA *et al* 2008; SEVERO *et al* 2010; SOUZA, 2013; PRYDIE; HEWITT, 2015; FIGUEREIDO *et al*, 2018; KLOS; COLDEBELLA; JANDREY, 2020).

A ozonioterapia é uma técnica terapêutica que utiliza a aplicação de ozônio como tratamento adjuvante de várias afecções. O ozônio é uma variedade alotrópica do oxigênio, formado por três átomos do mesmo. É um gás incolor, de odor característico e instável, e essa última característica o torna de difícil armazenamento e transporte, tornando necessária a sua obtenção no lugar e momento da sua utilização (RODRIGUEZ *et al*, 2018).

O ozônio é produzido naturalmente, a partir de dois mecanismos principais: quando ocorre descargas elétricas em tempestades e/ou pela radiação ultravioleta. Em ambos mecanismos há a quebra de oxigênio em dois átomos (O+O), e quando o átomo individual (O) reage com o O₂ se forma a molécula de O₃ (NOGALES *et al.*, 2008). O ozônio pode também

ser produzido através de geradores para sua utilização medicinal, uma vez que as concentrações do O₂ na atmosfera variam de acordo com altitude, temperatura e poluição do ar, não sendo a melhor forma de se obter o ozônio naturalmente para tais fins terapêuticos. Há três formas de obter o ozônio de forma industrial: através de sistema ultravioleta que produz baixas concentrações de O₃; sistema de descargas elétricas que produz altas concentrações de O₃ e sistema de produção por plasma frio que é utilizado apenas para purificação de ar e água (BOCCI, 2006).

A ação do ozônio no organismo dependerá de fatores como dose utilizada, inflamação tecidual, presença de microrganismos, quantidade e tipo celular presente no local que se quer obter resultado. O ozônio apresenta propriedades imunomoduladoras, imunoestimulante, oxigenante, antimicrobiana, atua na melhoria do metabolismo, tem potencial oxidativo e auxilia na cicatrização tecidual (LAKE *et al*, 2004; BULIES, 2005; BOCCI, 2006).

Quando em contato com compostos orgânicos como plasma, saliva, linfa ou urina, o ozônio reage imediatamente e deixa de existir. Essa reação ocorre com ácidos graxos poli-insaturados, antioxidantes, componentes tíolicos (albumina e cisteína), carboidratos, DNA e RNA. As reações dependerão do tempo de exposição e concentração do ozônio aplicado. Tais reações se dão através do potente poder oxidativo do O₃ e o resultado desse processo é a formação de espécies reativas do oxigênio (EROS) e os produtos de oxidação lipídica (LOPS) que são responsáveis pelas interações bioquímicas do ozônio no organismo (BOCCI, 2006).

O peróxido de hidrogênio é o principal EROS, sendo um mensageiro do ozônio e responsável por estimular diversos efeitos celulares e interagir com diversas células do sangue. Ao reagir com leucócitos pode ativar e estimular a produção de interleucinas e citocinas podendo promover a reativação do sistema imune deprimido e assim agindo como imunoestimulante. Quando reage com os eritrócitos podem alterar a glicólise e com isso melhorar e aumentar a formação de energia e transporte de oxigênio para o interior das células favorecendo a oxigenação tissular (BOCCI, 2004).

O ozônio atua diretamente sobre mediadores químicos da inflamação inibindo a formação de ácido araquidônico e prostaglandinas, tendo como foco de ação as citocinas, modulando a inflamação. Esse mecanismo de ação do ozônio promove analgesia por meio de redução na inflamação, seja ela aguda ou crônica (BOCCI, 2006).

Quando o gás ozônio reage com ácidos graxos insaturados da membrana fosfolipídica ocorre produção de peróxidos hidrofílicos, os quais estimulam a formação de substâncias desoxigenantes que atuam sobre a oxihemoglobina promovendo a liberação de O₂ (HADDAD,2009). O resultado é um incremento do potencial de oxigenação tecidual,

principalmente nas áreas de hipóxia, com isso, as células endoteliais aumentam a liberação de óxido nítrico, o que provoca vasodilatação e assim reduz a hipóxia local e favorece a proliferação tecidual (MADEJ *et al.*, 2007).

A ozonioterapia apresenta também bons resultados sobre controle microbiano. Acredita-se que a ação primária do O₃ seja sobre a parede celular da bactéria, depois penetra no interior da célula e promove a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucleicos, alterando a permeabilidade e causando lise celular (HADDAD, 2009).

A via de aplicação da ozonioterapia pode ser sistêmica: intrarretal, intramuscular, intraperitoneal e por auto-hemoterapia; ou local: subcutânea, intra-articular, intravaginal e intraconjuntival. A via intrarretal é a mais utilizada devido a facilidade de aplicação e excelente efeito sistêmico. A escolha da via de administração do ozônio dependerá de dois fatores principais: as características do processo patológico e a condição clínica do paciente. A quantidade total a ser aplicada é calculada multiplicando a concentração do ozônio, que já vem prefixada no aparelho gerador, pelo volume de gás administrado, que vai depender da via de aplicação (RODRIGUES *et al.*, 2018). Várias concentrações terapêuticas podem ser utilizadas variando de 1µg/ml a 100µg/ml. Os efeitos são dose dependentes e estudos descrevem as concentrações de 1µg/ml a 20µg/ml como imunomoduladora, 20µg/ml a 40µg/ml como analgésica e anti-inflamatória e 40µg/ml a 100µg/ml como antisséptica (ZULLYT *et al.*, 2018).

Não há muitos relatos de efeitos adversos da ozonioterapia na medicina veterinária. Em humanos já foi registrado quatro mortes por embolismo pulmonar após aplicação endovenosa de ozônio (BOCCI, 2004). Há evidências, em humanos, que a inalação direta o ozônio pode causar irritação das vias superiores, rinite e dores de cabeça (NOGALES *et al.*, 2008). Os efeitos adversos da prática de ozonioterapia estão associados a falta de avaliação clínica do paciente, escolha inadequada da via de administração e da concentração do ozônio a ser aplicado, frequência de aplicação, tempo de exposição e técnica de administração (BOCCI, 2004).

É de extrema importância saber selecionar o paciente que irá receber a aplicação de ozônio, e por isso se faz necessário avaliação clínica, coleta de exames laboratoriais e analisar se o paciente se enquadra nas características desejadas para um bom resultado oriundo da ozonioterapia. Há a contraindicação do uso do ozônio em situações em que o paciente se encontre gestante, ou apresente deficiência de glicose-6-fosfato-dihidrogenase, seja portador de hipertireoidismo, anemia grave, miastenia grave ou hemorragia ativa (NOGALES, *et al.*, 2008).

As características terapêuticas e biológicas do ozônio possibilitam sua ação em vários campos da medicina veterinária como tratamento complementar. Atualmente é utilizada no

auxílio de tratamento de feridas, doenças articulares, doenças virais, odontologia, oncologia, afecções inflamatórias (BULIES, 2005; DUNNE, 2008).

Baseado na fisiopatogenia das fraturas e do processo de reparação óssea e nas ações anteriormente descritas e atribuídas à ozonioterapia, levanta-se a hipótese que o uso desta forma de terapia complementar possa favorecer o processo de reparação ossea.

OBJETIVO

Avaliar o efeito da ozonioterapia na reparação de fraturas experimentais em fêmur de coelho por meio dos estudos clínico, radiográfico e histológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba – CEEA/UNIUBE, sob protocolo de nº 011/2019 (Anexo 1). Para execução do trabalho foram utilizadas as seguintes instalações da Universidade de Uberaba e Hospital Veterinário de Uberaba:

- Centro de Pesquisa em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Hospital Veterinário de Uberaba;
- Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário de Uberaba;
- Centro Cirúrgico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário de Uberaba;
- Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário de Uberaba;
- Baias para alojamento e manejo dos coelhos, do Hospital Veterinário de Uberaba;
- Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Uberaba;
- Laboratório de Histologia da Universidade de Uberaba.

Foi também utilizado a Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia para a realização do scanner das lâminas histológicas.

Animais

Foram utilizados vinte e quatro coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia, machos, não castrados, de três a quatro meses de idade, com massa corporal média de 2,5 Kg, provenientes de uma cunicultura comercial do município de Uberaba-MG. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos – o grupo controle que não recebeu tratamento complementar e o grupo tratado com ozônio - com 12 animais cada. Os animais foram inicialmente avaliados por meio de exame clínico geral e ortopédico, foram selecionados aqueles clinicamente saudáveis e que apresentaram deambulação normal e ausência de alterações ósseas nos exames clínicos e radiográficos. Foram radiografados os fêmures direitos e esquerdos de todos os animais nas projeções craniocaudal e médiolateral antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico.

Os animais foram mantidos no Hospital Veterinário de Uberaba, alojados em gaiolas individuais com 40cm x 30cm x 33cm, próprias para criação de coelhos, e receberam ração¹ comercial para coelhos e água *ad libitum*. Durante o período de quarentena de 15 dias, os animais foram desverminados com ivermectina² na dose de 0,4 mg/kg SC, em dose única.

Osteotomia e osteossíntese femoral

Pré-operatório

Aproximadamente 30 minutos antes do procedimento cirúrgico foram administrados enrofloxacina³ (5mg/kg) e meloxicam⁴ (0,2mg/kg) ambos por via subcutânea. Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico constituído por xilazina⁵ (3 mg/kg), cetamina⁶ (15 mg/kg) e midazolam (1 mg/kg) aspirados na mesma seringa e administrados por via intramuscular como medicação pré-anestésica (MPA). Realizou-se tricotomia da orelha para estabelecer um acesso venoso na veia auricular marginal lateral com cateter 24, foi realizado também a tricotomia ampla que se estendeu da região lombo-sacral até a região de metatarso do membro pélvico direito. A indução anestésica foi feita por meio de inalação do isoflurano fornecido por máscara, e posteriormente foi aplicado a anestesia peridural no espaço lombo-sacral através de punção com agulha hipodérmica 25mmx7mm e administração de lidocaína⁷ (0,2mL/kg).

Durante o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em anestesia geral por meio da inalação espontânea de isoflurano, diluído em oxigênio puro, também fornecido por máscara. A antisepsia foi realizada após o posicionamento do animal em decúbito lateral esquerdo, com solução degermante de clorexidina⁸ seguida de solução alcoólica de clorexidina⁹.

Transoperatório

O procedimento cirúrgico de osteotomia e osteossíntese foi realizado pelo mesmo médico veterinário cirurgião e as cirurgias foram realizadas no Bloco Cirúrgico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário de Uberaba.

¹ Ração CS Coelhos – CS Nutrição Animal

² Ivomec[®] 1% Injetável – Merial Brasil

³ Kinetomax[®] 10% Injetável – Bayer, Brasil

⁴ Maxican[®] 2% Injetável – Ouro Fino, Brasil

⁵ Xilazin[®], Syntec, Brasil

⁶ Cetamin[®], Syntec, Brasil

⁷ Xylestesin 2%

⁸ Riohex 2%[®], Rio química, Brasil

⁹ Riohex 0,5%[®], Rio química, Brasil

Foi realizada uma incisão ao longo da borda craniolateral da coxa direita, em seguida incisou-se a fáscia lata ao longo da borda cranial do músculo bíceps femoral pelo comprimento da incisão. Afastou-se o bíceps femoral caudalmente para expor o músculo vasto lateral e rebateu-se o músculo vasto lateral da superfície do fêmur para expor a diáfise femoral. Foi realizada a exposição do fêmur direito e com o auxílio de uma serra oscilatória e sob irrigação constante, foi realizada osteotomia transversal no terço médio da diáfise femoral. Após adequada aposição das extremidades ósseas, uma placa em ponte foi colocada na superfície craniolateral do fêmur. Foi utilizada uma placa de reconstrução bloqueada 2,7 com seis orifícios permanecendo três orifícios distais e três proximais à linha de fratura. As perfurações ósseas foram realizadas com broca de diâmetro igual ao do centro do parafuso, utilizando-se uma furadeira com rotação controlável e irrigação constante com solução ringer lactato. O diâmetro do osso foi mensurado com auxílio de um medidor de profundidade, a rosca foi aberta com um preparador de rosca de 2,7 mm, após o que se seguiu à colocação dos parafusos. Foram colocados quatro parafusos, sendo dois em cada extremidade da placa, inicialmente os mais distais à linha de fratura e depois os demais alternadamente. Foi realizada a aproximação da fáscia lata com sutura simples contínua, a aproximação do tecido subcutâneo foi realizada com a sutura zig e zag e a dermorrafia em padrão simples separado, ambos com fio monofilamentar 3-0¹⁰.

Pós-operatório

No pós-operatório como medicação anti-inflamatória, foi administrado meloxicam (0,2 mg/kg) SC a cada 24 horas, durante três dias consecutivos. A analgesia foi realizada com dipirona (50mg/kg) SC a cada 12 horas durante sete dias consecutivos. A antibioticoterapia profilática foi realizada com enrofloxacina (5 mg/kg) SC, a cada 12 horas por sete dias consecutivos. Na ferida cirúrgica foi realizada limpeza diária com solução fisiológica seguida por aplicação de Rifamicina spray¹¹.

Ozonioterapia

O ozônio utilizado foi produzido através de descargas elétricas obtidas pelo aparelho portátil gerador de ozônio¹² imediatamente antes da sua aplicação (Figura 1).

¹⁰ Mononylon®, Ethicon, Brasil

¹¹ Rifocina Spray®

¹² Modelo: Gerador Ozonic Portátil; Fabricante: Ozonic. Brasil

Foram realizadas administrações de ozônio por via local e sistêmica. Sendo as aplicações locais realizadas ao redor da ferida cirúrgica por via subcutânea e as sistêmicas por via intrarretal.

Para as aplicações subcutâneas (perilesional) foram utilizadas seringas de 10ml e agulhas 45mmx13mm (Figura 2).

A aplicação do ozônio pela via intrarretal foi realizada com o auxílio de uma sonda uretral nº 6 introduzida cerca de 5cm através do esfíncter anal, após a aplicação de pomada lubrificante¹³ na sonda. Em seguida, com a seringa carregada de gás ozônio do equipamento no volume pré-determinado, o gás era administrado através do reto (Figura 3), sendo colocado pressão sobre o orifício anal durante a aplicação e ao finalizar a aplicação, por 20 segundos, de modo a evitar o retorno do gás.

As aplicações de ozônio iniciaram após 72 horas de pós-operatório. O protocolo terapêutico adotado consistiu em dez aplicações subcutâneas perilesionais, realizadas a cada 48 horas, na concentração de 3 µg/ml sendo injetado um volume total de 8ml de gás ozônio. Também foram cinco aplicações intrarretais, a cada 24 horas na concentração de 11 µg /ml, sendo injetado um volume total de 10ml por aplicação.

¹³ Xylestesin® Gel 2%- Cloridrato de lidocaína



Figura 1. Aparelho portátil gerador de gás ozônio terapêutico, da marca Ozonic, utilizado para a realização das sessões de ozonioterapia subcutânea e intrarretal nos coelhos pertencentes ao grupo submetido a ozonioterapia após osteotomia e osteossíntese femoral.



Figura 2. Primeira aplicação local de gás ozônio por via subcutânea (perilesional) utilizando seringa de 10ml e agulha hipodérmica 45mmx13mm, 72 horas após a cirurgia de osteotomia e osteossíntese femoral em coelho.



Figura 3. Primeira aplicação sistêmica de gás ozônio por via intrarretal utilizando uma seringa de 10ml com gás ozônio e com auxílio de uma sonda uretral nº 6 introduzida cerca de 5cm através do esfíncter anal, 72 horas após a cirurgia de osteotomia e osteossíntese femoral em coelho

Avaliação clínica dos animais

A avaliação clínica dos animais foi realizada diariamente com inspeção da ferida cirúrgica, palpação femoral para verificar a existência de reação inflamatória, instabilidade do foco de fratura, hipotrofia muscular e sensibilidade dolorosa. A deambulação dos animais foi observada para avaliar a presença de alteração locomotora.

Avaliação radiográfica

Os exames radiográficos foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário de Uberaba. O aparelho radiográfico usado foi convencional/analógico com revelação via processadora. A técnica radiográfica utilizada foi de 200 mA com tempo de 10 milissegundos e KV 31 para as projeções mediolateral e KV 33 para as projeções craniocaudal. Foi utilizado filme¹⁴ de tamanho 24cmx30cm para a revelação das imagens.

Foram realizadas avaliações radiográficas no período pós-operatório imediato e aos 15, 30 e 45 dias, em todos os animais e aos 60, 75 e 90 dias em metade dos animais de cada grupo. Não foram realizadas as radiografias nos tempos 60, 75 e 90 dias de todos os animais pois metade dos animais de cada grupo foram eutanasiados aos 45 dias pós-operatório para que fosse realizada a avaliação histológica.

¹⁴ ORTHO CP-GU FILME MEDICAL X-RAY da marca Agfa

As imagens radiográficas foram analisadas de forma cega, por três avaliadores distintos os quais classificaram a evolução do processo de consolidação óssea. Para isso foram atribuídos escores para avaliar alinhamento, aparato, aposição e atividade biológica. Os critérios para inclusão em cada escore foram adaptados de Yuehue e Friedman (1999) e estão detalhados nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1. Escore adaptado de Yuehue e Friedman (1999), utilizado na avaliação radiográfica de alinhamento das articulações adjacentes após osteossíntese para correção de osteotomia experimental em fêmur de coelhos.

| Escore | Especificações |
|---------------|--|
| 1 | Articulações adjacentes perfeitamente alinhadas |
| 0 | Perda do alinhamento das articulações adjacentes |

Tabela 2. Escore adaptado de Yuehue e Friedman (1999), utilizado na avaliação radiográfica de aparato empregado em osteossíntese para a correção de osteotomia experimental em fêmur coelhos.

| Escore | Especificações |
|---------------|--|
| 3 | Nenhuma alteração dos implantes e da sua fixação |
| 2 | Uma alteração nos implantes ou na sua fixação sem a necessidade de reintervenção cirúrgica |
| 1 | Alterações nos implantes ou na sua fixação com a necessidade de reintervenção cirúrgica |
| 0 | Falha completa dos implantes ou da sua fixação |

Tabela 3. Escore adaptado de Yuehue e Friedman (1999), utilizado na avaliação radiográfica de aposição dos fragmentos após osteossíntese para a correção de osteotomia experimental em fêmur coelhos.

| Escore | Especificações |
|---------------|--|
| 4 | Não visibilização da linha de fratura com fragmentos alinhados |
| 3 | Observação da linha de fratura com aposição completa dos fragmentos alinhados |
| 2 | Observação da linha de fratura com discreto desvio entre os fragmentos |
| 1 | Observação da linha de fratura evidente com discreto afastamento entre os fragmentos |
| 0 | Perda total da aposição dos fragmentos |

Tabela 4. Escore adaptado de Yuehue e Friedman (1999), utilizado na avaliação radiográfica de atividade biológica após osteossíntese para a correção de osteotomia experimental em fêmur coelhos.

| Categoria | Escore | Especificações |
|-------------------|---------------|-------------------------------------|
| Reação periosteal | 3-Exuberante | Ultrapassa 60% do diâmetro do osso. |
| | 2-Moderado | Entre 30 e 60% do diâmetro do osso. |
| | 1-Discreto | Menor que 30% do diâmetro do osso. |
| | 0-Ausente | Não existe reação |

| | | |
|---------------------------------|---------------------|--|
| Formação de calo ósseo | 3-Exuberante | Longitudinalmente ultrapassa 60% do fragmento ósseo e/ou transversalmente é maior do que o diâmetro do osso. |
| | 2-Moderado | Longitudinalmente está entre 30 e 60% do fragmento ósseo e/ou transversalmente está entre 50 e 100% do diâmetro do osso. |
| | 1-Discreto | Longitudinalmente é menor que 30% do fragmento ósseo e/ou transversalmente é menor que 50% do diâmetro do osso. |
| | 0-Ausente | Não existe formação de calo ósseo |
| Formação de ponte óssea | 3-União completa | O calo ósseo está completamente unido bilateralmente |
| | 2-União moderada | Visão de linha radioluscente parcial e pouco definida |
| | 1-União discreta | Visão de linha radioluscente pouco definida bilateralmente |
| | 0-Não união | Visão nítida de linha radioluscente bilateralmente |
| Presença de linha de osteotomia | 3-Ausente | União completa do calo ósseo e das corticais |
| | 2-Pouco Definida | Ponte completa do calo ósseo com presença de linha de osteotomia nas corticais |
| | 1-Reduzida | União unilateral do calo ósseo sem união das corticais |
| | 0-Completa | Não união do calo ósseo e das corticais |
| Remodelação | 4-Total | Ausência do calo ósseo |
| | 3-Moderada avançada | Discreto calo ósseo com radiopacidade similar ao osso e/ou visibilização do canal medular |
| | 2-Moderada inicial | Discreto calo ósseo com radiopacidade aumentada |
| | 1-Discreta | Superfície do calo ósseo regular |
| | 0-Ausente | Calo ósseo com superfície irregular |
| TOTAL | | |

Avaliação histológica

Seis animais de cada grupo foram avaliados aos 45 dias de pós-operatório e os outros seis animais aos 90 dias de pós-operatório.

A análise histológica foi realizada após a eutanásia dos animais. Para a realização da eutanásia foi aplicado o midazolam (2mg/kg) IM, a veia auricular marginal lateral foi

cateterizada para a aplicação de propofol (10mg/kg) IV e em seguida a aplicação de cloreto de potássio 19,10% (100mg/kg) IV.

Após a eutanásia foi realizada a colheita dos fêmures direitos e os mesmos foram fixados em solução de formalina a 10% por dez dias consecutivos, em recipiente plástico individual de formato cilíndrico com diâmetro de aproximadamente 6,5cm e altura de aproximadamente 11cm, devidamente identificado. Após a fixação foram retirados os implantes dos fêmures, e as epífises foram seccionadas e descartadas e os fragmentos centrais contendo a diáfise foram destinados à preparação para análise histológica.

Toda a preparação para a confecção das lâminas histológicas foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e no Laboratório de Histologia da Universidade de Uberaba.

Os fragmentos ósseos foram colocados em solução aquosa de ácido fórmico 10% v/v e citrato de sódio 9% v/v para o processo de descalcificação, os quais permaneceram nessa solução por 90 dias, sendo a solução trocada a cada 72 horas.

Após a descalcificação os fragmentos ósseos foram seccionados longitudinalmente obtendo dois cortes colocados nos cassetes, identificados e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Cortes de 4 μ m de espessura incluindo a região do foco de fratura e interface osso-implante foram obtidos no micrótomo RM2145 da marca Leica e montados em lâminas de vidro. De cada bloco foram obtidas duas lâminas que foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisadas à microscopia de luz.

Para a análise histológica foi realizado o escaneamento de todas as lâminas através do equipamento Aperio Scanscope AT- Leica. O escaneamento foi realizado na Rede de Laboratório Multiusuários da Universidade de Uberlândia. A análise foi feita às cegas por um único profissional com experiência em avaliação de histologia de tecido ósseo.

Para a avaliação histomorfométrica foram selecionados dez campos por lâmina no aumento de 10 X, sendo seis campos no calo periosteal em toda sua extensão distribuídos de forma equidistantes, dois campos no calo endosteal e dois campos no calo interfragmentar, para mensuração da área de tecido ósseo e contagem de osteócitos. Para isso foi utilizado o programa Image J 1.52k, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado, fatorial 2 x 6 para as avaliações radiográficas, com dois grupos de tratamento (controle e ozônio) e seis tempos de avaliação (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias pós-operatório), e fatorial 2 x 2 para as avaliações histológicas com

dois grupos de tratamento (controle e ozônio) e dois tempos de avaliação (45 e 90 dias de pós-operatório). Para os dados não paramétricos referentes a escores de atividade biológica, alinhamento, aparato e aposição foram gerados gráficos e calculadas as medianas e as distâncias interquartílicas. As medianas dos grupos (controle e ozônio) foram comparadas em cada tempo de avaliação pelo teste de Mann Whitney (por não ser pareado – coelhos diferentes). As medianas do mesmo grupo foram comparadas no tempo pelo teste de Wilcoxon (por ser pareado – mesmo coelho). Os dados paramétricos referentes à histomorfometria (área de neoformação óssea e número de osteócitos) foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e à análise de variância. Foram calculadas as médias, desvio padrão e coeficientes de variação de cada grupo em cada tempo. As médias foram comparadas pelo teste T de Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) adotado um nível de 95% de confiança (p valor $\leq 0,05$ indica diferença significativa) (SAMPAIO, 2015).

RESULTADOS

Os animais se recuperaram bem no pós-operatório e não tiveram complicações que pudessem comprometer o resultado do estudo. Dois animais do grupo submetido a ozonioterapia tiveram morte súbita alguns segundos após a aplicação do ozônio. Outros dois coelhos foram operados para substituir os que morreram, completando 12 animais por grupo.

Na análise radiográfica, as imagens obtidas nas projeções craniocaudal e mediolateral permitiram avaliar o alinhamento, aparato, aposição e atividade biológica. A técnica de fixação com placa em ponte forneceu a estabilidade necessária para a reparação do tecido ósseo de forma indireta com a formação de calos periosteais, medulares e intercorticais. Foi observada consolidação óssea clínica em todos os animais ao longo de 90 dias, com início do processo de remodelação óssea (Figura 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

Não foi visibilizada falha dos implantes e perda da redução e do alinhamento ao longo dos tempos de avaliação (Tabela 5). Embora a aposição não tenha sido perfeita em alguns animais (Figura 4) ela não atrapalhou a reparação óssea (Tabela 5). Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas dos escores de alinhamento, aparato e aposição, entre os grupos controle e ozônio, nos tempos avaliados.

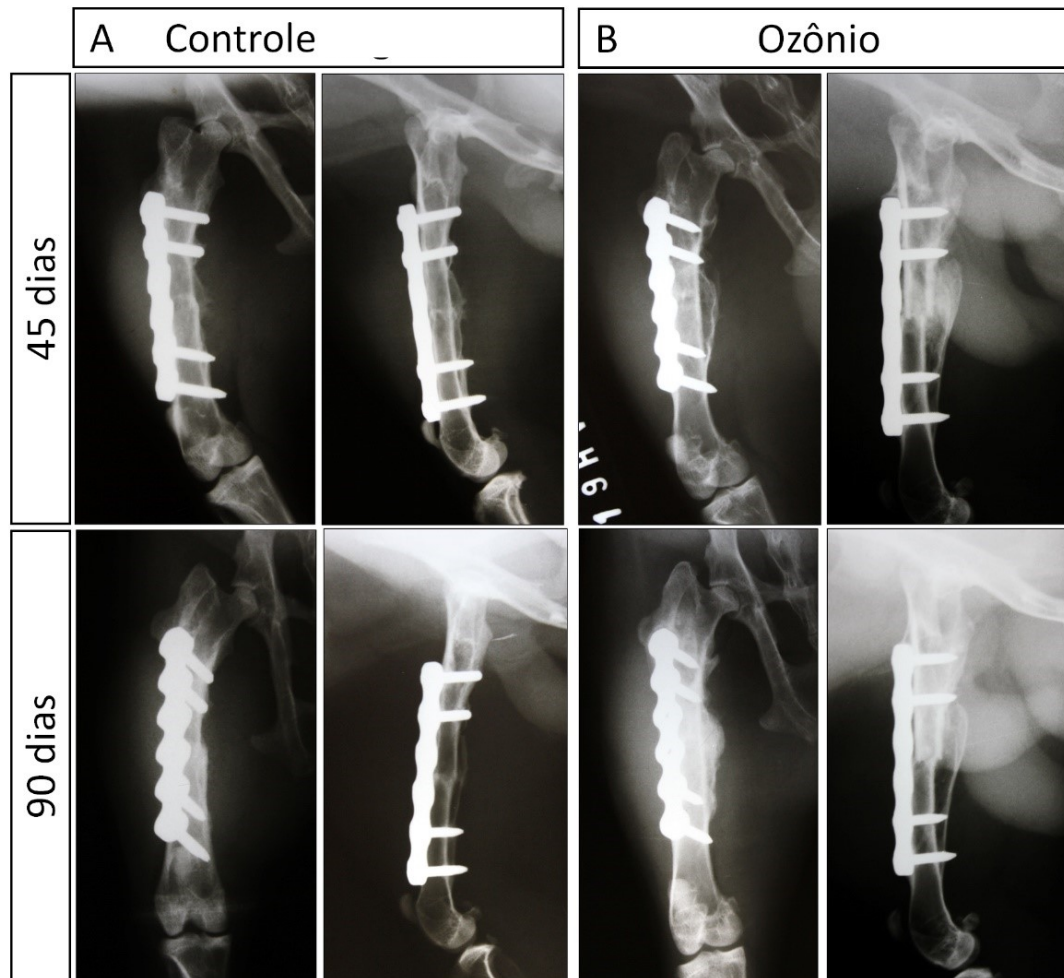


Figura 4 – Imagens radiográficas de fêmures de coelhos submetidos a osteotomia e fixação com placa e tratamento ou não com ozônio, avaliações pós-operatórias aos 45 e 90 dias. Observar que a reparação óssea foi secundária e que houve maior formação de calo ósseo no grupo tratado com ozônio (B).

Tabela 5: Medianas e distâncias interquartílicas de escores de alinhamento, aparato e aposição de fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos à osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.

| Parâmetro avaliado | Tempos de avaliação pós-operatória em dias | | | | | | |
|----------------------|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 1 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 |
| Alinhamento Controle | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) |
| Alinhamento Ozônio | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) | 1,00 ^{aA} (0,00) |
| Aparato Controle | 3,00 ^{aA} (0,00) | 3,00 ^{aA} (0,00) | 3,00 ^{aA} (0,00) | 3,00 ^{aA} (0,18) | 3,00 ^{aA} (0,00) | 3,00 ^{aA} (0,00) | 3,00 ^{aA} (0,00) |
| Aparato Ozônio | 3,00 ^{aA} (0,00) | 3,00 ^{aA} (0,18) | 3,00 ^{aA} (0,25) | 3,00 ^{aA} (0,00) | 3,00 ^{aA} (0,06) | 3,00 ^{aA} (0,12) | 3,00 ^{aA} (0,00) |
| Aposição Controle | 1,33 ^{aA} (1,00) | 2,25 ^{aA} (0,25) | 2,33 ^{aA} (0,47) | 2,87 ^{aA} (1,31) | 3,33 ^{aA} (0,79) | 3,33 ^{aA} (0,45) | 3,33 ^{aA} (0,81) |

| | | | | | | | |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aposição | 1,75 ^{aA} | 2,00 ^{aA} | 2,37 ^{aA} | 3,00 ^{aA} | 3,00 ^{aA} | 3,25 ^{aA} | 3,37 ^{aA} |
| Ozônio | (1,00) | (0,75) | (0,93) | (1,00) | (1,00) | (1,25) | (0,87) |

Medianas seguidas de letra minúsculas iguais não diferem pelo teste de Wilcoxon ($P>0,05$).

Medianas seguidas de letra maiúsculas iguais não diferem pelo teste de Mann Whitney ($P>0,05$).

As medianas e distâncias interquartílicas de escores de reação periosteal foram zero em todos os tempos de avaliação em ambos os grupos, não havendo diferenças significativas entre os grupos (Figura 5).

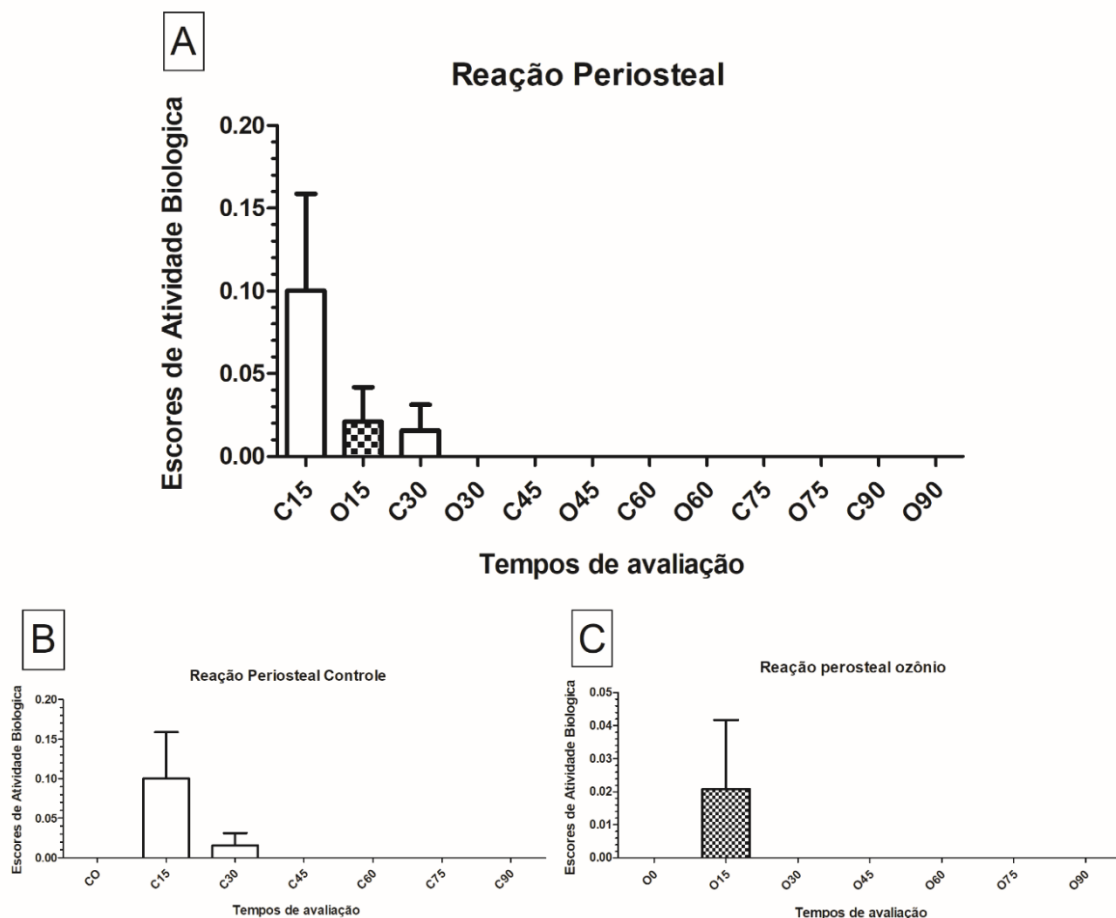


Figura 5: Dispersão dos escores de reação periosteal em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos à osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C).

As medianas e distâncias interquartílicas de escores de formação de calo ósseo aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório foram respectivamente: 0,00 (0,00), 1,71 (2,00), 1,88 (1,46), 1,50 (1,00), 2,25 (0,75), 2,25 (0,81) e 2,25 (0,63), no grupo controle e 0,00 (0,00), 2,00 (0,88), 2,25 (1,38), 2,13 (1,19), 2,13 (0,88), 2,13 (0,81) e 2,13 (0,81), no grupo ozônio. Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas de formação de calo ósseo

dos grupos controle e ozônio em nenhum dos tempos avaliados (Figura 6A). Por outro lado, quando realizada comparação dentro de um mesmo grupo, os escores de formação de calo ósseo foram maiores ($p < 0,05$) aos 15 dias pós-operatório quando comparado ao dia 0 e aos 30 dias de pós-operatório quando comparado ao dia 15 em ambos os grupos experimentais (Figura 6 B e C).

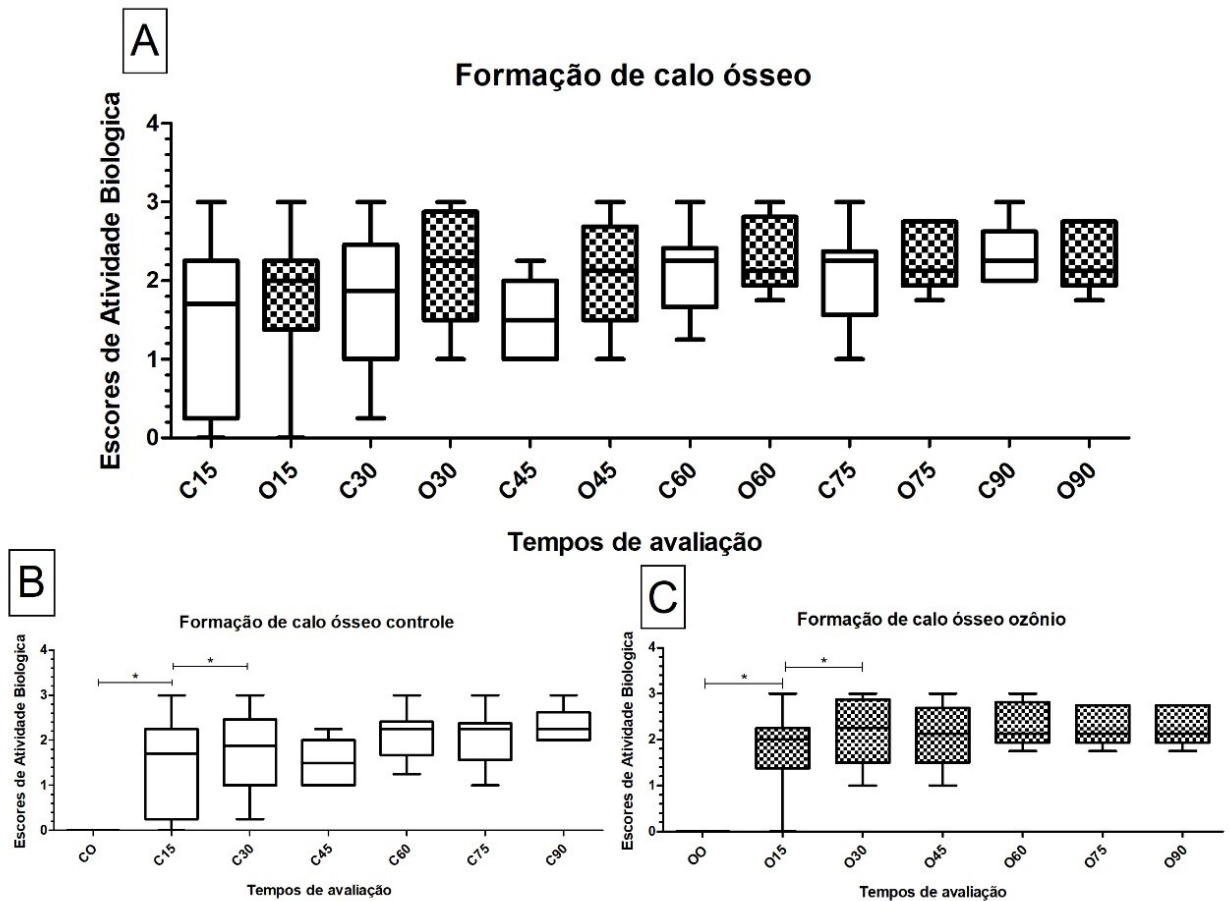


Figura 6: Dispersão dos escores de formação de calo ósseo em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C).

As medianas e distâncias interquartílicas de escores de ponte óssea aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório foram respectivamente: 0,00 (0,00), 1,00 (1,33), 1,83 (1,75), 2,13 (1,81), 2,75 (0,46), 3,00 (0,44) e 3,00 (0,13), no grupo controle e 0,00 (0,00), 1,58 (0,63), 2,58 (0,94), 2,88 (0,83), 3,00 (0,25), 3,00 (0,25) e 3,00 (0,25) no grupo ozônio. Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas de ponte óssea dos grupos controle e ozônio em nenhum dos tempos avaliados (Figura 7A). Foram observados aumentos

significativos ($p < 0,05$) dos escores de formação de ponte óssea aos 15 e 30 dias de avaliação em ambos os grupos experimentais (Figura 7 B e C).

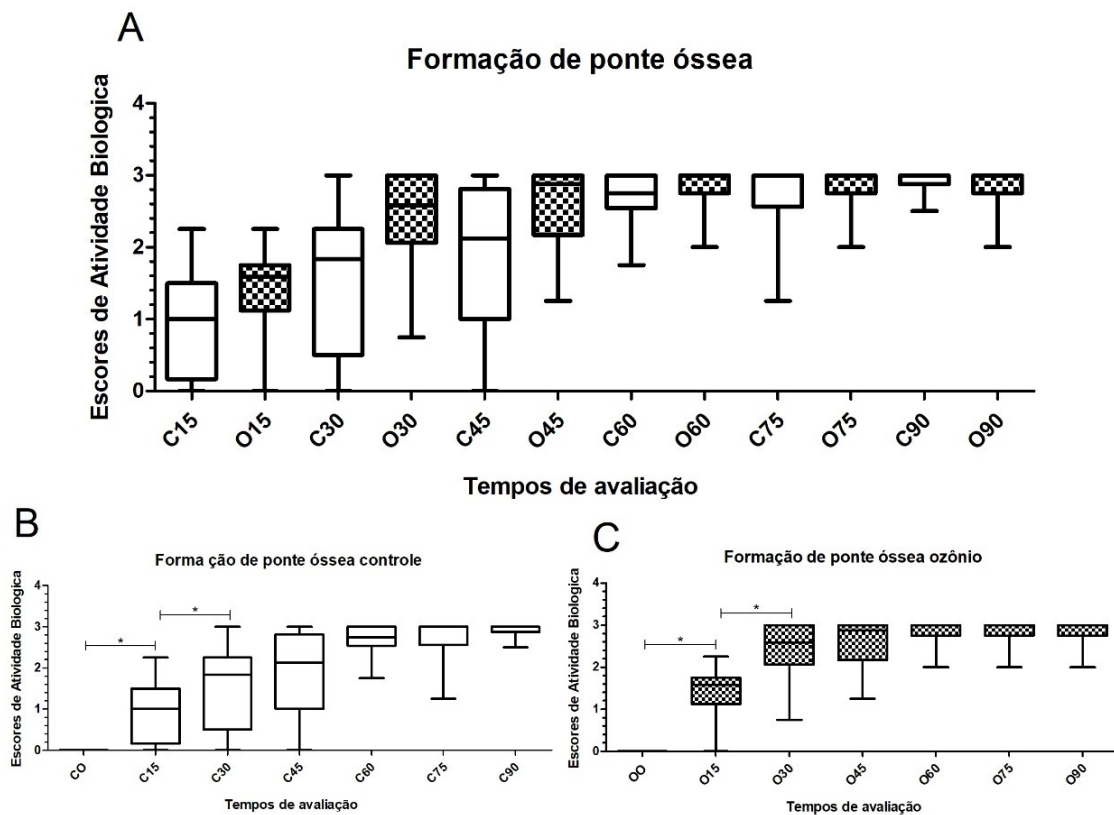


Figura 7: Dispersão dos escores de formação de ponte óssea em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C).

As medianas e distâncias interquartílicas de escores de linha de osteotomia aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório foram respectivamente: 0,00 (0,00), 1,00 (0,75), 1,29 (1,25), 2,00 (1,25), 2,33 (0,50), 3,00 (0,81) e 2,88 (0,56) no grupo controle e 0,00 (0,00), 0,88 (0,63), 1,50 (0,69), 2,00 (0,63), 2,00 (0,88), 2,25 (0,69) e 2,38 (0,63) no grupo ozônio. Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas de linha de osteotomia dos grupos controle e ozônio em nenhum dos tempos avaliados (Figura 8A). Foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) dos escores de linha de osteotomia aos 15, 30 e 45 dias de avaliação em ambos os grupos experimentais (Figura 8B e C).

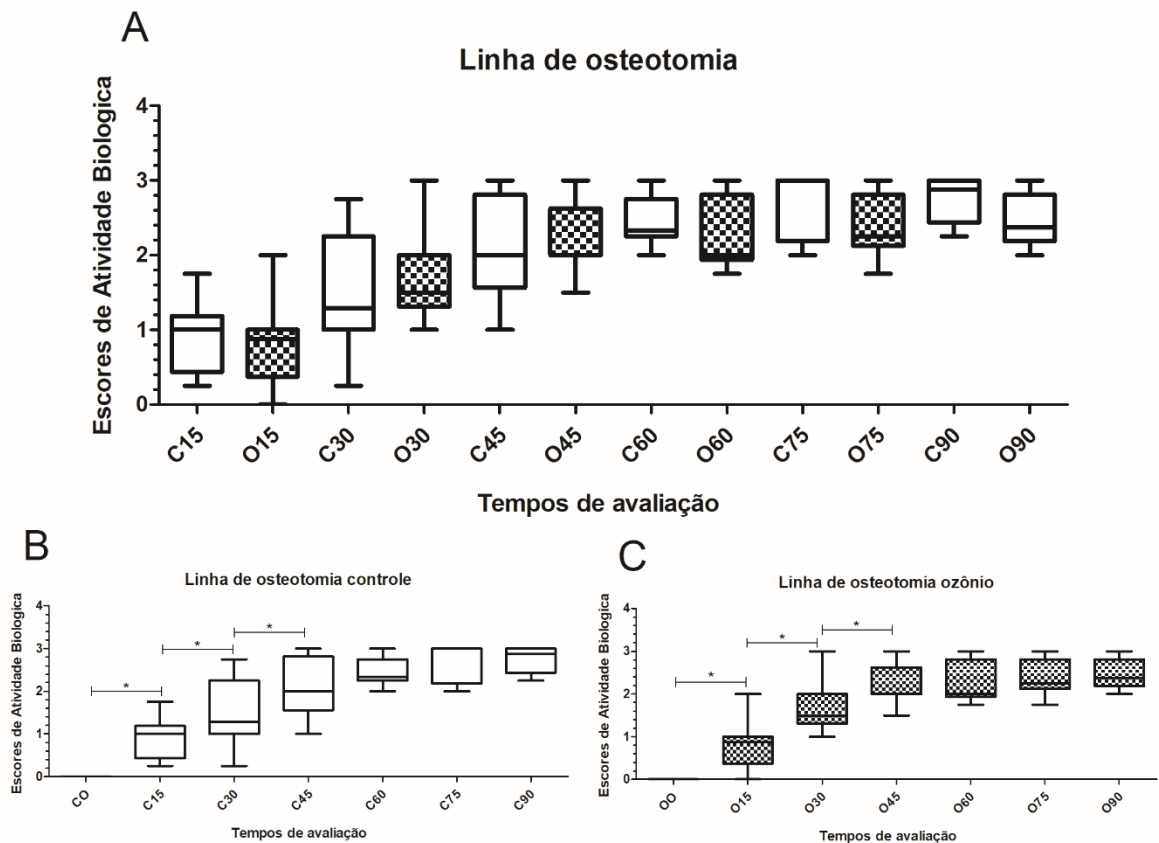


Figura 8: Dispersão dos escores de linha de osteotomia em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C).

As medianas e distâncias interquartílicas de escores de remodelação óssea aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório foram respectivamente: 0,00 (0,00), 0,00 (0,00), 0,00 (0,00), 0,00 (0,88), 0,50 (0,71), 0,50 (1,06) e 1,71 (1,25), no grupo controle e 0,00 (0,00), 0,00 (0,00), 0,00 (0,25), 0,25 (0,38), 0,75 (0,75), 1,00 (1,19) e 1,25 (1,38), no grupo ozônio. Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas de remodelação dos grupos controle e ozônio em nenhum dos tempos avaliados (Figura 9A). Foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) dos escores de remodelação aos 90 dias no grupo controle e aos 45 dias no grupo ozônio (Figura 9B e C).

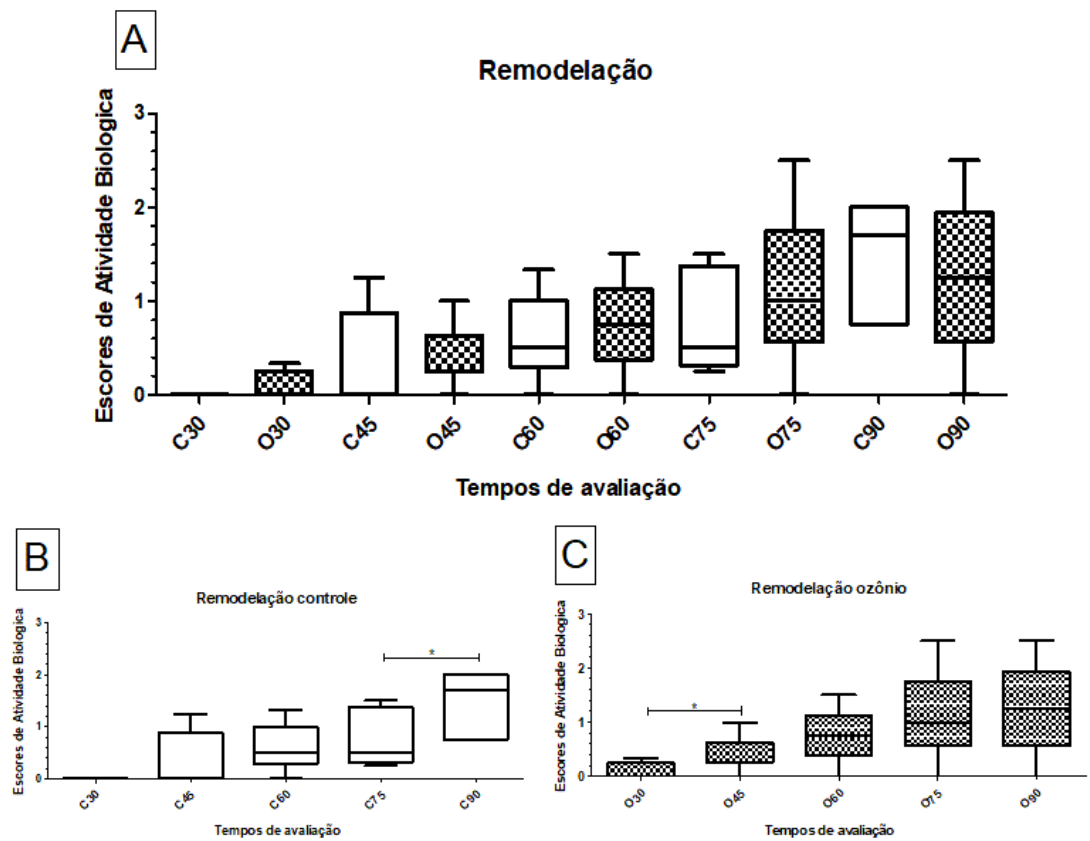


Figura 9: Dispersão dos escores de remodelação em fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney ($p < 0,05$) (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$) (Gráficos B e C).

As medianas e distâncias interquartílicas de escores de atividade biológica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório foram respectivamente: 0,00 (0,00), 3,25 (4,25), 5,25 (4,50), 5,63 (4,75), 6,75 (1,88), 7,25 (2,56) e 8,25 (2,81), no grupo controle e 0,00 (0,00), 3,50 (5,19), 5,31 (7,44), 5,75 (8,19), 7,31 (8,88), 7,69 (9,50) e 7,75 (9,88), no grupo ozônio. A mediana do escore de atividade biológica do grupo ozônio foi significativamente superior ($p < 0,05$) a do grupo controle aos 30 dias de pós-operatório (Figura 10 A). Foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) dos escores de atividade biológica aos 15 e 30 dias no grupo controle e aos 15, 30 e 45 dias no grupo ozônio (Figura 10 B e C).

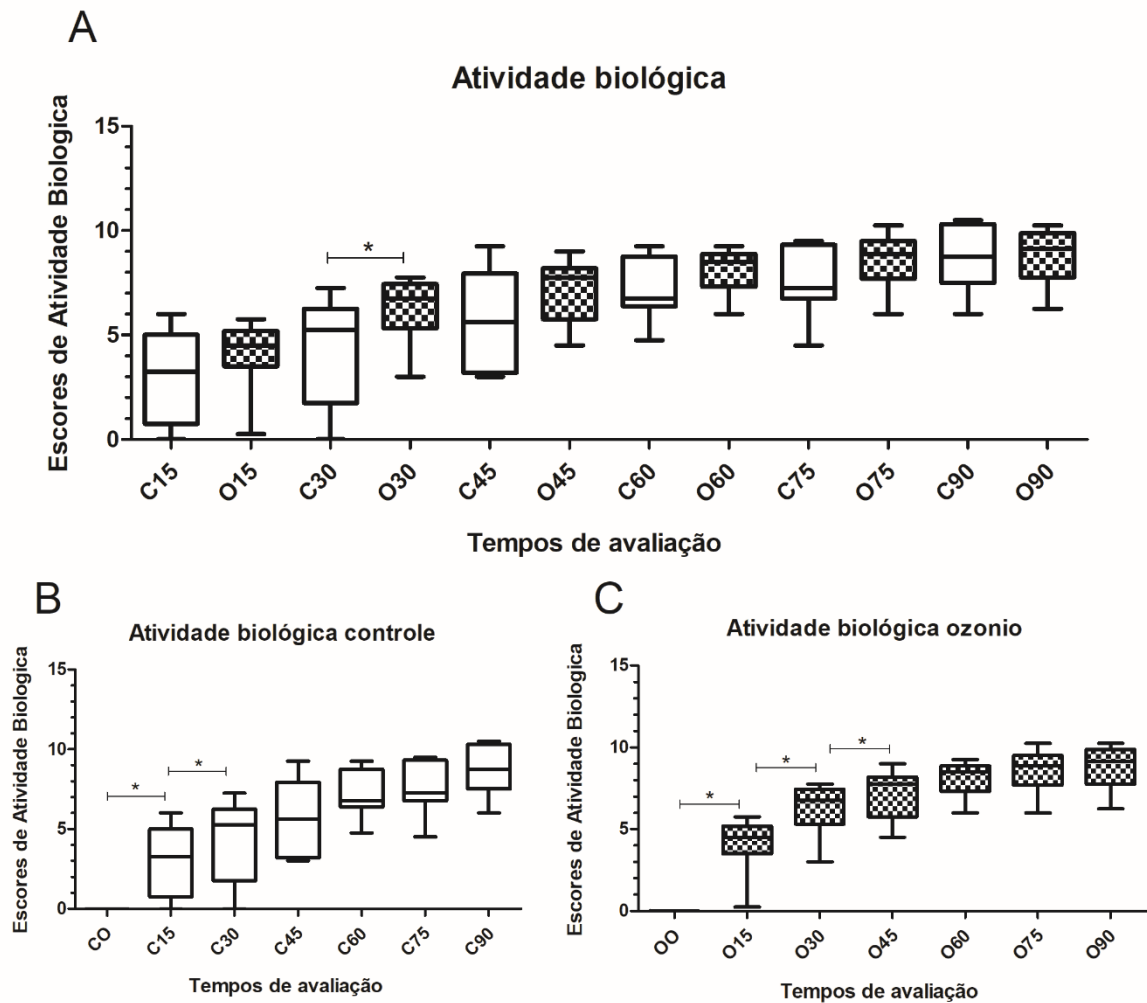


Figura 10: Dispersão dos escores de atividade biológica de fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação radiográfica aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. * Representa diferença significativa entre as medianas pelo teste de Mann Whitney (Gráfico A) e pelo teste de Wilcoxon (Gráficos B e C).

A avaliação histológica realizada aos 45 e 90 dias de pós-operatório mostrou regeneração óssea secundária com a formação de calos ósseos periosteal, interfragmentar e endosteal composto por osso esponjoso em ambos os grupos experimentais. O tecido ósseo neoformado no grupo controle era composto predominantemente por trabéculas de espessura intermediária recobertas por osteoblastos e repleta de osteócitos (Figura 11 A). No grupo ozônio, o osso neoformado era composto predominantemente por trabéculas espessas recoberta por osteoblastos volumosos e repleta de osteócitos ativos em lacunas alargadas (Figura 11 B). Não foi observado infiltrado inflamatório em nenhum dos animais de ambos os grupos.

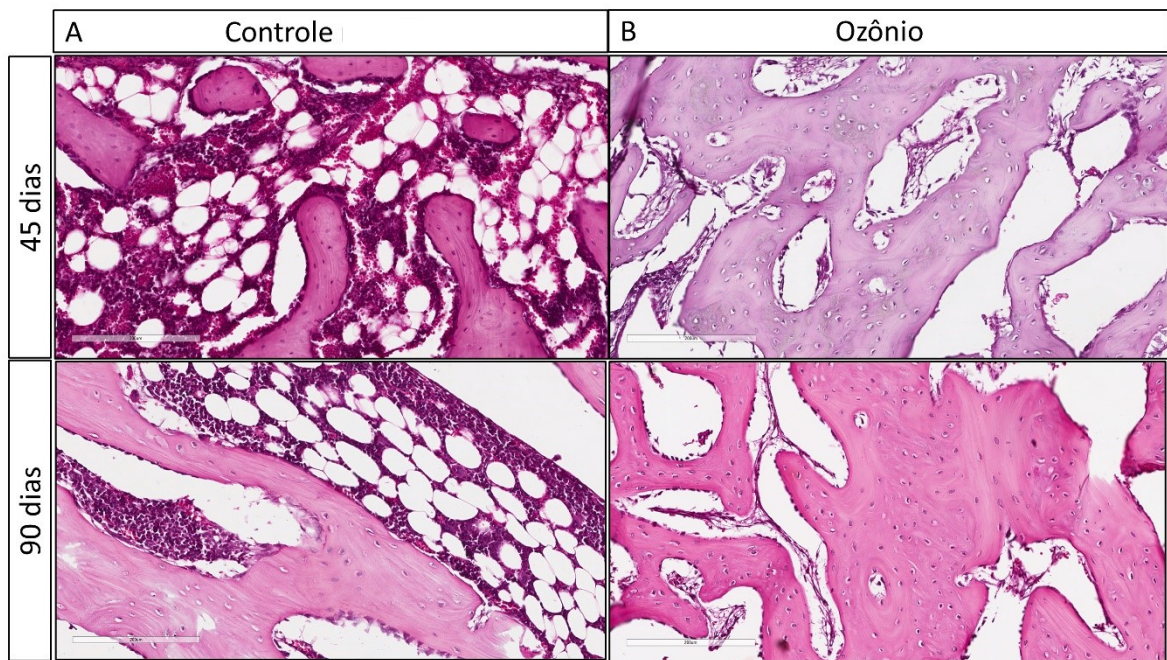


Figura 11- Fotografia de corte histológico do osso neoformado no calo ósseo de fraturas experimentais criadas em terço médio de diáfise de fêmur de coelhos, coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas em aumento 10X. (A) grupo controle e (B) tratados com ozônio, 45 e 90 dias pós-operatório. Régua: 200 μ m

As médias e desvio padrão da área de osso neoformado aos 45 e 90 dias de pós-operatório foram respectivamente: $17,08 \times 10^5$ ($4,05 \times 10^5$) e $14,25 \times 10^5$ ($3,10 \times 10^5$), no grupo controle, e $24,15 \times 10^5$ ($4,23 \times 10^5$) e $18,20 \times 10^5$ ($1,90 \times 10^5$) no grupo ozônio. Verificou-se as áreas de neoformação óssea significativamente ($p < 0,05$) maiores no grupo ozônio quando comparadas do grupo controle aos 45 e 90 dias de pós-operatório. Também foi observada redução significativa ($p < 0,05$) na área de osso neoformado no grupo ozônio aos 90 dias quando comparada aos 45 dias de pós-operatório (Figura 12).

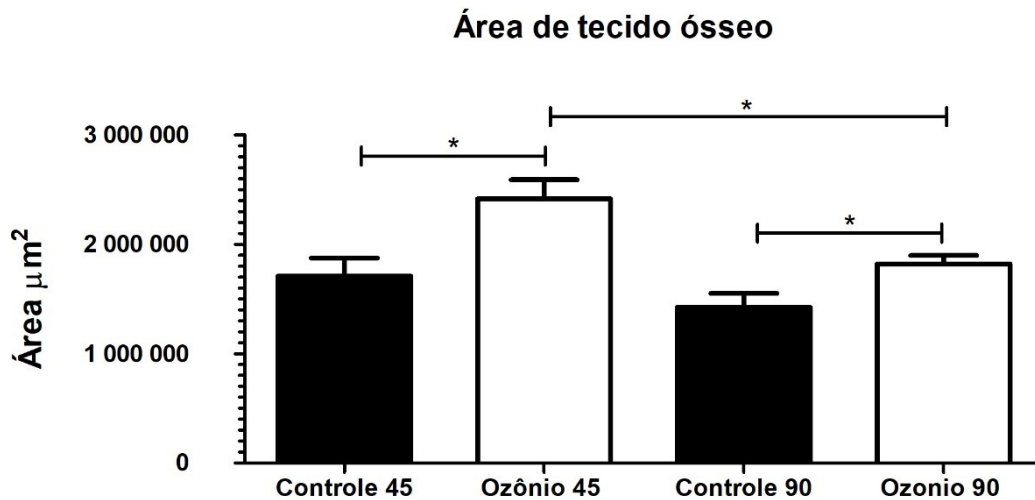


Figura 12. Média e desvio padrão da área óssea no calo ósseo de fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação histológica aos 45 e 90 dias de pós-operatório. *Representa diferença significativa pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

As médias e desvio padrão do número de osteócitos no osso neoformado aos 45 e 90 dias de pós-operatório foram respectivamente: $19,14 \times 10^2$ ($5,31 \times 10^2$) e $10,86 \times 10^2$ ($2,37 \times 10^2$), no grupo controle, e $26,17 \times 10^2$ ($8,48 \times 10^2$) e $14,92 \times 10^2$ ($1,56 \times 10^6$) no grupo ozônio. Verificou-se número de osteócitos significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo ozônio quando comparadas do grupo controle aos 90 dias de pós-operatório (Figura 13).

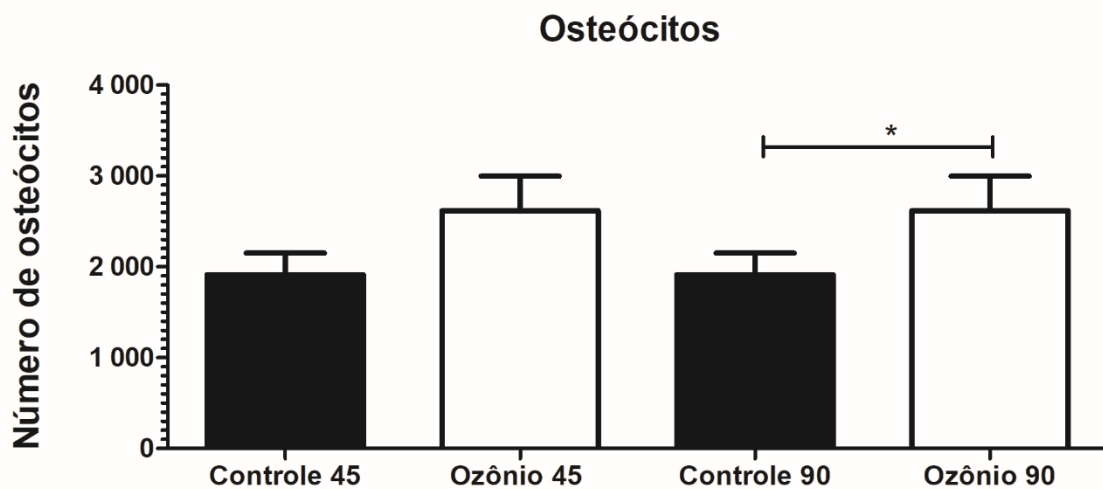


Figura 13: Média e desvio padrão do número de osteócitos no calo ósseo de fraturas experimentais em fêmur de coelhos submetidos a osteossíntese (C) e tratado com ozonioterapia (O), obtidos por avaliação histológica aos 45 e 90 dias de pós-operatório. *Representa diferença significativa pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

A escolha de ozonioterapia entre as demais terapias complementares no tratamento de fraturas foi devido ao fato de haver poucas contra-indicações, como por exemplo, em pacientes com quadro de anemia grave e hipotireoidismo e efeitos adversos mínimos, os quais não são relatados na medicina veterinária (HADDAD,2009). Outro requisito que torna a ozonioterapia uma escolha promissora é o seu baixo custo de investimento e sua facilidade de aplicação. Essa última característica foi facilmente perceptível durante as sessões de ozonioterapia realizadas no presente estudo. A aplicação é rápida, prática e com baixo custo de materiais utilizados. Também foi observado que os animais quase não demonstraram desconforto com as aplicações local (perilesional) e sistêmica (intrarretal). Não há estudos sobre a ozonioterapia na ortopedia veterinária, e poucos são os estudos na ortopedia humana, sendo assim é esperado que com esse estudo haja mais interesse em novas pesquisas sobre a ozonioterapia na área de ortopedia veterinária.

A definição da dose utilizada no presente estudo foi determinada com a intenção de respeitar o intervalo de concentração entre 1 a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sem alcançar os limites inferior e superior recomendado. Não há ainda uma padronização da concentração e dose a ser utilizada nas aplicações de ozônio na medicina veterinária. O que se sabe é que há um intervalo terapêutico, variando de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de concentração terapêutica que pode ser utilizada, e que o efeito do ozônio no organismo é dose dependente (ZULLYT *et al.*, 2018).

As concentrações utilizadas ficaram entre 1 a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sendo injetado 8ml de ozônio na concentração de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nas aplicações subcutâneas e 10ml de ozônio na concentração de 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nas aplicações intrarretais. E segundo a literatura o efeito alcançado com essa concentração é de imunomodulação. O efeito imunomodulador é resultado da interação das espécies reativas de oxigênio e produtos de oxidação lipídica com os leucócitos promovendo a produção de citocinas e interleucinas (ZULLYT *et al.*, 2018).

A dose do ozônio total é equivalente ao volume de gás (ml) multiplicado pela concentração de ozônio ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Os pacientes do presente estudo chegaram a receber 134 μg de ozônio quando as aplicações intrarretal e perilesional coincidiram, considerado um peso médio de 2,5 kg os animais receberam cerca de 53,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo, em sua dose máxima, sendo a dose mínima de 9,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo.

Concentrações dentro do intervalo terapêutico de 1 -20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ também foram utilizadas em estudos com ratos neonatos para avaliar o efeito da ozonioterapia no controle de lesões cerebrais (ROSSETO, 2020), nesse estudo foi utilizado concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Uma

pesquisa com humanos, para comparar a aplicação de ozônio intra-articular com placebo em osteoartrite do joelho, utilizou-se concentração de 20 µg /ml (LOPES *et al.*, 2017).

Conceitualmente concentrações inferiores a 10 µg /ml de ozônio são ineficientes para alcançar efeitos positivos do ozônio no organismo pois o gás é imediatamente neutralizado pelos antioxidantes sanguíneos e por isso não atinge seu efeito terapêutico (SAGAI; BOCCI 2011). Com base nos resultados encontrados, a aplicação do ozônio na concentração de 3 µg /ml por via subcutânea se mostrou eficaz, uma vez que nem sempre coincidiu a aplicação perilesional com a aplicação intrarretal. No entanto pode-se hipotetizar que a aplicação intrarretal causou um efeito sinérgico com a aplicação subcutânea, uma vez que não foi utilizado somente a concentração perilesional.

Mesmo utilizando concentrações recomendadas pela literatura, e preconizando utilizar doses não próximas ao limite superior foi possível observar efeitos adversos em dois animais do estudo que tiveram morte súbita após a aplicação do ozônio. Isso mostra que a dose segura para coelhos ainda não foi definida e que embora a literatura consultada não tenha relatado, a ozonioterapia pode sim levar à morte súbita. Os efeitos adversos da ozonioterapia são raros, e os danos já documentados estão relacionados a inalação do gás e que pode provocar rinite, irritação respiratória e náuseas. Em humanos já foram registradas quatro mortes por embolia pulmonar após administração por via endovenosa (BOCCI, 2004; NOGALES *et al.*, 2008).

A determinação das vias de administração se baseou na praticidade de aplicação, mecanismo de ação e doença a ser estudada. A via subcutânea peri-lesional é utilizada para se obter ação anti-inflamatória, analgésica e de regeneração tecidual (Zullyt *et al.*, 2018). Acredita-se que ao realizar a aplicação local, nesse caso a aplicação perilesional, pode haver um efeito direto no local de ação, e que isso pode ocasionar a otimização da interação do ozônio com compostos orgânicos como plasma e linfa. Na administração do ozônio por via intrarretal as células na parede intestinal absorvem o O₃ através do aumento de pressão retal, o gás reage com as membranas das células da mucosa intestinal, em seguida os produtos das reações são absorvidos pelo lúmen intestinal que passam para a via sanguínea (BOCCI *et al.*, 2009). A aplicação retal proporciona um efeito sistêmico mais acelerado e imediato em todo o corpo (BOCCI, 2006).

Quando há a formação dos produtos da interação do ozônio com os compostos orgânicos (peróxido de hidrogênio e produtos de oxidação lipídica) estes estimulam a liberação de interleucinas. As interleucinas auxiliam na quimiotaxia atraindo os leucócitos da circulação para os tecidos lesionados através dos vasos sanguíneos (NOGALES *et al.*, 2008).

A atividade biológica pode ser avaliada por meio de análise de escores radiográficos. Essa avaliação só é possível em reparações ósseas secundárias que envolve a formação de calo ósseo. E todo o processo de reparação óssea secundária inicia com um processo inflamatório decorrente do trauma ósseo (GREEN et al., 2005). O escore de atividade biológica significativamente maior no grupo ozônio aos 30 dias comparado ao grupo controle pode ser devido à ação imunomoduladora e imunoestimulante causada pelo ozônio, mas levanta a questão se o O₃ não possa agir diretamente nas células envolvidas no processo de reparação como osteoblastos e células osteoprogenitoras.

Toda reação inflamatória é mediada por uma série de eventos interligados que envolve principalmente o aumento no fluxo sanguíneo, o envolvimento de diferentes tipos celulares como, neutrófilos e macrófagos e secreção de citocinas. A ação prolongada e crônica de citocinas inflamatórias resulta em um efeito desfavorável na reparação óssea. Portanto quando há uma ação das citocinas de forma regulada após uma lesão aguda favorece a regeneração óssea (GERSTENFELD et al., 2003). O ozônio quando entra em contato com o organismo é rapidamente oxidado e pode resultar em peróxido de hidrogênio, e quando essa espécie reativa de oxigênio interage com leucócitos promove a produção de interferon e interleucinas e estimula o sistema imune inato com a ativação de neutrófilos e liberação de citocinas de uma forma moderada a fim de ajudar as células a sobreviverem a uma lesão (BOCCI, 2006). As ações imunoestimulante e imunomoduladora provocadas pelo ozônio podem ter otimizado a atividade biológica dos animais que receberam o ozônio.

A área de osso neoformado significativamente maior aos 45 e 90 dias no grupo ozônio quando comparado ao grupo controle pode estar relacionada à ação oxigenante do ozônio que proporcionou uma otimização na osteogênese. A redução significativa da área óssea neoformada aos 90 dias comparada aos 45 dias do grupo ozônio provavelmente se deve ao processo de remodelação óssea. Apesar de não haver diferenças estatísticas no escore de remodelação entre os grupos, foi possível avaliar diante das radiografias o processo de remodelação. A remodelação óssea ocorre quando há ação dos osteoclastos, principalmente, em remover o calo ósseo e os resquícios de matriz cartilaginosa. Todo o processo de reparação óssea está diretamente relacionado com a angiogênese e posterior osteogênese (CROCI *et al*, 2003; PELISSIER *et al.*, 2004). O ozônio estimula o aumento dos níveis de TGF- β que atua na remodelação tecidual, esse efeito também pode ter colaborado para que a remodelação óssea ocorresse mais rápido nos animais do grupo ozônio (MANOTO; MAEPA; MOTAUNG, 2018). Para que haja osso neoformado na reparação de fratura é imprescindível que se obtenha o processo de angiogênese e obtenção de suprimento sanguíneo. Pois é através dessa

revascularização que ocorrerá o transporte de nutrientes essenciais para o desenvolvimento da osteogênese (CROCI *et al.*, 2003). O ozônio quando reage com os eritrócitos pode alterar a glicólise e com isso otimizar a formação de energia e transporte de oxigênio para o interior das células favorecendo a oxigenação tissular (BOCCI, 2004). A característica oxigenante atribuído ao ozônio, pode ter melhorado a circulação sanguínea através dos capilares e aumentado a capacidade de absorção e distribuição do sangue provocando melhoria da microcirculação e oxigenação tecidual e assim ter otimizado a formação de área de tecido ósseo neoformado nos pacientes que receberam o ozônio.

Resultado semelhante foi encontrado por Erdemci *et al.*, (2014), ao avaliar o efeito do ozônio sistêmico e tópico na reparação do osso alveolar após extração dentária em ratos por meio de avaliação histomorfométrica. Esse estudo mostrou que o ozônio é capaz de melhorar a reparação óssea em lesões causadas por extração dentária em ratos, e nesse caso houve otimização na reparação óssea aumentando a formação de novos vasos sanguíneos e a mineralização de trabéculas ósseas.

A contagem de osteócitos significativamente maior no grupo ozônio aos 90 dias comparado ao grupo controle pode estar relacionado ao potencial angiogênico do ozônio.

A contagem de osteócitos no foco de fratura permitiu avaliar o efeito do ozônio em uma das células mais importantes na reparação óssea e diretamente relacionada à produção de matriz óssea. O tecido ósseo é composto por quatro tipos de células principais: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras. No desenvolvimento do tecido ósseo ocorre a ação dos osteoblastos secretando matriz óssea. Conforme a matriz osteóide é secretada ao redor do osteoblasto e se torna mais rígida, os osteoblastos amadurecem e se tornam osteócitos. Os osteócitos são células de maior população no osso e possuem capacidade limitada para produzir e/ou absorver a matriz óssea ao redor da lacuna. A absorção da matriz óssea também pode ser executada pelos osteoclastos que também exercem a função de remodelação óssea através da atividade osteoblástica (ANDIA *et al.*, 2006; AKERS e DENBOW, 2008). A ação angiogênica do ozônio pode ter otimizado a revascularização e com isso pode ter promovido maior transporte de osteócitos para o sítio de ação, que é o foco da fratura, nos pacientes que receberam o ozônio, mas não se pode descartar uma ação direta do ozônio em outras células envolvidas no processo de reparação óssea.

A maior área de tecido ósseo assim como a maior contagem de osteócitos nos animais do grupo ozônio mostra que a ozonioterapia aumentou a osteogênese no foco de fratura, promovendo a otimização da reparação da fratura. Esses efeitos podem ser decorrentes da otimização da perfusão tecidual devido à maior oxigenação causada pelo efeito do ozônio.

A correlação dos resultados radiográficos e histológicos mostra concordância, uma vez que a maior atividade biológica observada na análise radiográfica aos 30 dias, foi acompanhada de maior número de osteócitos e maior área de tecido ósseo neoformado aos 45 dias, no grupo ozônio quando comparado ao grupo controle. Outro ponto a ser ressaltado foi o processo de remodelação com diminuição da área neoformada aos 90 dias quando comparada aos 45 dias no grupo ozônio, e essa remodelação foi observada nas avaliações radiográficas e histológicas.

O presente estudo também teve suas limitações. A causa da morte dos dois animais logo após a aplicação do ozônio não foi elucidada. Além disso, poderia ter sido investigados outros marcadores de reparação óssea, citocinas e fatores de crescimento potencialmente envolvidos no processo da reparação da fratura, bem como se o ozônio interferiu na produção dessas substâncias.

Com o presente estudo foi possível observar que o ozônio possuiu características benéficas para ser utilizado como tratamento adjuvante na reparação de fraturas, porém ainda há muito a se esclarecer sobre a ozonioterapia, como definição de doses e vias seguras de aplicação para cada espécie, os mecanismos envolvidos direta ou indiretamente nessa terapia.

A ozonioterapia é uma terapia complementar de ótimo custo benefício e se for melhor esclarecida quanto às suas concentrações, efeitos colaterais e mecanismo de ação poderá trazer inúmeros benefícios na medicina veterinária

CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi realizado conclui-se que o ozônio favorece a reparação de fraturas por meio do aumento do número de osteócitos e da produção de matriz óssea extracelular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERS, R. M.; DENBOW, D. M. Bones and Skeletal System. **Anatomy & Physiology of Domestic Animals**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008.
- ALVES, E. G. L.; REZENDE, C. M. F.; OLIVEIRA, H. P.; BORGES, N. F.; MANTOVANI, P. F.; ROSADO, I. R. Emprego experimental da placa de compósito poli-hidroxi-butilado/hidroxiapatita na fixação femoral em gatos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.5, p.1128-1134, 2010.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v.35, n.2, p.191-198, 2006.
- BOCCI, V. A. How Ozone acts and how it exerts therapeutic effects. In: LYNCH E. **Ozone: the revolution in dentistry**. Reino Unido: Quintessence Publishing Books, 2004.
- BOCCI, V. A. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. **Archives of Medical Research**, v.37, p.425-435, 2006.
- BOCCI, Velio et al. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. **Wiley Interscience**, Siena, p.646-682, 3 mar. 2009.
- BOIANIE R. M. Redução pelo método de rush em fraturas salter-harris em fêmur de cães. Universidade Castelo Branco Instituto Qualittas Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, São Paulo, fev. 2007.
- BULIES, E.J.C. Oxígeno-ozonoterapia como coadjuvante en el tratamiento de las infecciones óseas. **Revista Cubana Ortopedia Traumatologia**, Havana, v. 19, n. 1, 2005.
- COSTA R. C. E SCHOSSLER J. E.W. Fractures treatments of the radius and ulna in dogs and cats: A review. *Archives of Veterinary Science*, 7(1), 89-98. 2002.
- CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; BITAR, G.; PEREIRA, S.L.B.; MOREIRA, M.; FREITAS Jr, S. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortop. Bras.**, v.11, n.4, 2003.
- DALLABRIDA, A. L.; SCHOSSLER, J. E.; DE AGUIAR, E. S. V.; AMENDOLA, G. F.; DA SILVA, J. H. S.; SOARES, J. M. D. Análise biomacânica ex-vivo de dois métodos de osteossíntese de fratura diafisária transversal em fêmur de cães. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 116-120, 2005.
- DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S.J. **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. 4.ed. São Paulo: Roca, p. 466-468, 2006.
- DÜNNE, A. A. *et al.* Treatment with ozone/oxygen pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas. **Int. j. Cancer**, v.122, p.2360-2367, 2008.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia Veterinária**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. 872p.

ERDEMCI, F.; GUNAYDIN, Y.; SENCIMEN, M.; BASSORGUN, I.; OZLER, M.; OTER, S.; GULSES, A.; GUNAL, A.; SEZGIN, S.; BAYAR, G. R.; DOGAN, N. GIDER, I. K. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. **Oral MaxillofacSurg**. v.6, p.777-783, 2014.

FERNANDEZ-CUADROS, M. E.; PEREZ-MORO, O. S.; MIRÓN-CANELO, J. A.; Could ozone be used as a feasible future treatment in osteoarthritis of the knee? *Divers. Equal. Health care*. v. 13, n. 3, 2016.

FIGUEIREDO, N. E. O.; LUNA, S. P. L.; JOAQUIM, J. G. F.; COUTINHO, H. D. Avaliação do efeito da acupuntura e técnicas afins e perfil clínico e epidemiológico de cães com doenças neurológicas e osteomusculares atendidos em serviço de reabilitação veterinária. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.19, 1-18, e-44570, 2018.

FRITZEN, M.; TORTELLY, N. R.; VONSOWSKI, J. R. T. Aplicação da ozonioterapia em um cão com otite – relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG** – Vol. 1, no 2, jul/dez 2018.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L.; GRAVES, D. T.; EINHORN, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental 33 process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulations. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.88, p.873-884, 2003.

GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T. A.; MARSH D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury-International Journal of The Care of the Injured* 38:3-6, 2007

GREEN, E.; LUBAHN, J. D.; EVANS, J. Risks factors treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. **Journal of Surgical Orthopaedic Advances**, Towson, v.14, n.2, p.64- 72, 2005.

HADDAD, M. A. *et al.* Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.539-546, 2009.

HARASEN, G. Common long bone fractures in small animal practice - part 1. **The Canadian Veterinary Journal**, 44, 333-334. 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** - Texto & Atlas, 13ª edição 2017.

KLOS, T. B.; COLDEBELLA, F.; JANDREY, F. C. Fisioterapia e reabilitação animal na medicina veterinária. **PUBVET**, v.14, n.10, a669, p.1-17, Out., 2020

KÖNIG, H. E. & LIEBICH, H.-G. **Anatomia dos Animais Domésticos**. Artmed Editora.2011

KRAUS, K. H., TOOMBS, J. P., NESS, M. G. **External Fixation in Small Animal Practice**. 1st edition. UK. Blackwell Science.2003

LAKE, J. C.; FELBERG, S.; MALAVAZZI, G. R.; GOULART, D. A.; NISHIWAKI-DANTAS, M. C.; DANTAS, P. E. C. Efeito terapêutico da aplicação intra-ocular de ozônio em modelo experimental de endoftalmite por *Staphylococcus epidermidis* em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**. V. 67, n. 4, p.575-579, 2004.

LOPES DE JESUS, C.C.; SANTOS, F.C.; JESUS, L.M.O.B.; MONTEIRO, I.; SANT'ANA, M.S.S.C.; TREVISANI, V.F.M. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. **PLoS One**, v.12, n.7, e0179185, p.1- 9, 2017.

LUCAS, S. S.; SCHOSSLER J.E.W.; CONY A.V.; ALIEVI, M. M. Fraturas distais de fêmur em cães e Gatos. Revisão de 55 casos. **Revista da FZVA Uruguaiana.**, v.7/8, n.1, p.75-83, 2001.

MACEDO, A. S; MARINHO, P. V. T, DAL-BÓ, I. S, BREGADIOLI, T.; DIAMANTE, G, FIUZA, B, ZOPPA, A. L. V, FERRIGNO, C. R. A Physics behind the implants used for high strain fractures: literature review. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 55:1-8. 2018.

MADEJ, P.; PLEWKA, A.; MADEJ, J. A.; NOWAK, M.; PLEWKA, D.; FRANIK, G.; GOLKA, D. Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. **Inflammation**. V. 30, n.1-2, p. 52-58, 2007.

MANOTO, S. L.; MAEPA, M. J.; MOTAUNG, S. K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis, **Saudi J Biological Sciences**. 25(4):672-679. 2018.

NESI A. K. **Ozonioterapia: o uso do ozônio na odontologia**. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Odontologia). Centro Universitário São Lucas. Porto Velho.

NOGALES, C.G.; FERRARI, P. H.; KANTOROVICK, E. O.; MARQUES, J. L. L. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry, **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.9, n.4, Maio, 2008.

PELLISSIER, P. H.; MASQUELET, A. C.; BAREILLE, R.; MATHOULIN, S.; AMEDEE, J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and cold stimulate bone regeneration. **Journal of Orthopaedic Research**, v.22, p.73-79, 2004.

PIERMATTEI, D., FLO, G., DECAMP, C., **Ortopedia e Tratamento de Fraturas de Pequenos Animais**. 4ª Ed. São Paulo. cap. 17, p.580-636, 2009.

PRYDIE, David; HEWITT, Isobel. **Practical Physiotherapy for Small Animal Practice**. West Sussex, Uk: John Wiley & Sons,Ltd 2015.

RODRÍGUEZ, Z. B.; GONZÁLEZ, E. F.; LOZANO, O. E. L.; URRUCHI, W. I. **Ozonioterapia em Medicina Veterinária**. 1 ed. São Paulo/SP: Multimídia, 2018.

ROSSETO, Laryssa Petrocini. **Terapia com ozônio no controle de lesões cerebrais em ratos neonatos com hidrocefalia experimental**. 2020. 64f. Tese (Doutorado). Faculdade de

Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2020.

ROUSH, J. K.; McLAUGHLIN, R. M. Fundamentals of fracture management. **Veterinary Medicine**, v. 9, n. 2, p. 1065-1079, 2005.

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. 2001.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 4º ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015.

SEVERO, M. S., TUDURY, E. A., DE FIGUEIREDO, M. L., KEMPER, B., SALVADOR, R. DA C. L., & LIMA, D. R. Estabilização de fraturas femorais e umerais de cães e gatos mediante pino intramedular e fixação paracortical com pinos e polimetilmetacrilato. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p.546-553, 2010.

SOUZA, Alexandre Navarro Alves de. **Análise cinética da locomoção de cães com osteoartrose coxofemoral submetidos ao tratamento de ondas de choque extracorpóreas**. 2013. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOUZA, V. L.; ALVARENGA, J.; FILHO, J. G. P.; CANOLA, J. C.; FERRIGNO, C. R. A. ALVEZ, J. M.; DUARTE, L. R. Ultra-som pulsado de baixa intensidade em fraturas diafisárias: aplicação clínica em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.4, jul, 2008.

TEIXEIRA, C.R.; RAHAL, S.C.; LIMA, A.F.M.; CORREA, M.A.; QUEIROZ, P.; VULCANO, L.C. Haste intramedular de polipropileno, combinada ou não a biomateriais, no tratamento de fraturas induzidas no úmero de pombos. **Archives of Veterinary Science** v. 9, n. 1, p. 67-72, 2004.

VAUPEL, P.; HOCKEL, M.; MAYER, A. "Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography". **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 8, p. 1221–1235, 2007.

YUEHUEI H.; FRIEDMAN, R. J. **Animal models in orthopaedic research**, CRC Press, p.208, 1999.

ZULLYT, B.; RODRIGUEZ, Z.; GONZÁLEZ, E. F.; OSCAR, E.; LOZANO, L.; URRUCHI, W. I. **Ozonioterapia en medicina veterinária**. 1ed. São Paulo:Mutimídia, 2018.

ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA

**Uniube**Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-062/2019

Uberaba, 05 de agosto de 2019.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo n° 011/2019 relativo ao projeto intitulado “Efeito da ozonioterapia na reparação de fraturas experimentais em fêmur de coelhos” que tem como responsável Prof. Endrigo Gabellini Leonel Alves, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei n° 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol n° 011/2019 related to the project entitled “Ozonotherapy effect in repairing experimental femoral fractures in rabbit”, under the supervision of Prof. Endrigo Gabellini Leonel Alves, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law n° 11.794/08.

Atenciosamente,

Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA-UNIUBE