

**EFICÁCIA CLÍNICA DA VISCOSUPLEMENTAÇÃO COMPARATIVAMENTE AO
TRATAMENTO CONSERVATIVO TRADICIONAL EM CÃES COM DISPLASIA
COXOFEMORAL**

GABRIEL DE OLIVEIRA LIMA CARAPEBA

**EFICÁCIA CLÍNICA DA VICOSSUPLEMENTAÇÃO COMPARATIVAMENTE AO
TRATAMENTO CONSERVATIVO TRADICIONAL EM CÃES COM DISPLASIA
COXOFEMORAL**

GABRIEL DE OLIVEIRA LIMA CARAPEBA

Dissertação de Mestrado apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:
Profa. Dra. Renata Navarro Cassu

636.708 9 Carapeba, Gabriel de Oliveira Lima.
C261e Eficácia clínica da viscosuplementação comparativamente ao tratamento conservativo tradicional em cães com displasia coxofemoral / Gabriel de Oliveira Lima Carapeba. – Presidente Prudente, 2015.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientador: Renata Navarro Cassu.

1. Analgesia. 2. Ácido hialurônico. 3. Canina. 4. Osteoartrose. I. Título.

GABRIEL DE OLIVEIRA LIMA CARAPEBA

**EFICÁCIA CLÍNICA DA VICOSSUPLEMENTAÇÃO COMPARATIVAMENTE AO
TRATAMENTO CONSERVATIVO TRADICIONAL EM CÃES COM DISPLASIA
COXOFEMORAL**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-
Graduação, Universidade do Oeste
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal - Área de Concentração:
Fisiopatologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Renata Navarro
Cassu

Presidente Prudente, 25 de novembro de
2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Navarro Cassu
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Lidia Mitsuko Matsubara
Universidade Estadual Paulista – Unesp
Araçatuba-SP

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda equipe de colegas que colaboraram para que esse projeto tomasse forma e criasse vida.

À minha orientadora por todo o suporte e auxílio na construção do meu título de mestre.

À UNOESTE pela oportunidade de participar deste programa de pós-graduação e do crescimento profissional advindo desta conquista.

À minha família que está sempre presente em minhas lutas e conquistas.

À minha amada esposa, mãe do meu Miguel, por me dar todo o apoio e conforto nas horas em que mais precisei.

“Deus não joga dados”

Albert Einstein

RESUMO

Eficácia Clínica da Viscosuplementação Comparativamente ao Tratamento Conservativo Tradicional em Cães com Displasia Coxofemoral

A viscosuplementação é um tratamento que consiste na administração intra-articular (IA) de derivados do ácido hialurônico, cuja eficácia clínica tem sido confirmada em seres humanos. Objetivou-se comparar a eficácia clínica da viscosuplementação em relação ao tratamento conservativo convencional (TCC) em cães com displasia coxofemoral (DCF). Quinze cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: AH (n=8) tratamento IA com ácido hialurônico (5 mg a 10 mg); Controle (n=7): tratamento IA com solução salina (0,5 mL a 1,0 mL), além do TCC por via oral com condroprotetor (750-1000 mg, BID, 90 dias) e carprofeno (2,2 mg/kg BID, 15 dias). Os sinais clínicos da DCF foram avaliados de forma encoberta, antes do tratamento (basal), 15, 30, 60 e 90 dias após a injeção IA, por sistema de escore pelo pesquisador e mediante questionários respondidos pelos proprietários dos cães, empregando-se o Breve Inventário de Dor Canina (BIDC) e o Indicador de Dor Crônica de Helsinque (IDCH). Intervenção analgésica foi permitida se o somatório dos escores do BIDC e/ou IDCH excedesse 50%. Os resultados foram analisados pelo teste t não-pareado, teste de Mann-Whitney e teste de Friedman ($P < 0,05$). Os escores avaliados pelo médico veterinário foram inferiores ($P = 0,0005$) aos 30, 60 e 90 dias em relação ao basal no grupo AH, e aos 15 dias no grupo Controle ($P = 0,0003$). Na comparação entre grupos, escores inferiores foram observados aos 30, 60 e 90 dias no grupo AH em relação ao grupo controle, pela avaliação do pesquisador e pelo BIDC. Na comparação ao longo tempo, os escores totais do BIDC foram inferiores aos 60 e 90 dias em relação ao basal nos grupos Controle e AH, respectivamente ($P = 0,0145$, AH e $P = 0,0291$, Controle). Na avaliação pelo IDCH escores inferiores foram observados aos 15 e 90 dias em relação ao basal nos grupos Controle e AH, respectivamente ($P = 0,0054$, AH e $P = 0,041$, Controle). Intervenção analgésica não foi necessária durante o período de avaliação. Ambos os tratamentos reduziram os sinais clínicos associados à DCF, porém resultados mais expressivos foram alcançados com a viscosuplementação.

Palavras-chave: Analgesia, Ácido hialurônico, Canina, Osteoartrose.

ABSTRACT

Clinical Efficacy of Viscosupplementation in Comparison with Conventional Conservative Treatment in Dog with Hip Dysplasia

Viscosupplementation is one of the treatment modalities for osteoarthritis which consist in an intraarticular (IA) injection of hyaluronic composts. The aim of this randomized, double-blind study was to compare the clinical efficacy of viscosupplementation with conventional conservative treatment (CCT) in dogs with hip dysplasia (HD). Fifteen dogs were distributed into two groups: HA (n=8): IA injection of hyaluronic acid (5-10 mg); Control (n=7): IA injection with saline solution (0.5-1.0 mL) in combination with a CCT using an oral nutraceutical (750-1000 mg, every 12 h, 90 days) and carprofen (2.2 mg/kg, every 12 h, 15 days). The clinical signs of HD were evaluated prior to treatment (baseline), 15, 30, 60, and 90 days after the IA injection by the veterinary using a score system and by the owners with a questionnaire about their dog's condition using the Canine Brief Pain Inventory (CBPI) and Helsinki Chronic Pain Index (HCPI). The data were analyzed using test unpaired-t, Mann-Whitney-U test and Friedman test, followed by post-hoc Dunn's test ($P < 0.05$). The scores measured by the veterinary decreased from 30 to 90 days in relation to the baseline in the HA group ($P = 0.0005$), and at 15 days in the Control group ($P = 0.0003$). The scores evaluated by veterinary and by CBPI were significantly lower in the HA than in the Control from 30 to 90 days. Compared with baseline, both groups had lower total CBPI scores from 60 to 90 days after IA injection respectively ($P = 0.0145$, HA and $P = 0.0291$, Control). The HCPI scores were significantly lower in the Control and HA groups at 15 and 90 days after treatment, respectively ($P = 0.0054$, HA and $P = 0.041$, Control). Both treatments reduced the clinical signs of HD, however better results were reached with viscosupplementation.

Key-words: Analgesia, Hyaluronic acid, Canine, Osteoarthritis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH Ácido hialurônico
AINE Anti-inflamatório não esteroidal
BID Duas vezes ao dia
BIDC Breve Inventário de Dor Canina
CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais
COX-2 Ciclooxygenase 2
DAD Doença articular degenerativa
DCF Displasia coxofemoral
FCI Federação Cinológica Internacional
GD Gravidade da dor
IA Intra-articular
ID Interferência da dor
IDCH Indicador de Dor Crônica de Helsinque
IM Intra-muscular
mg/kg Miligramas por quilograma
mL Mililitros
OA Osteoartrose
OFA *Orthopedic Foundation for Animals*
P Nível de significância
SC+GL Sulfato de Condrotina+Glucosamina
TCC Tratamento conservativo convencional
TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido
VO Via oral

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	9
	ANEXO 1 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PERANTE ÀS COMISSÕES INSTITUCIONAIS (CAPI e CEUA).....	39
	ANEXO 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS GRAUS DA DISPLASIA COXOFEMORAL CONFORME A FCI.....	40
	ANEXO 3 - BREVE INVENTÁRIO DE DOR CANINA (BIDC).....	41
	ANEXO 4 - INDICADOR DE DOR CRÔNICA DE HELSINQUE (IDCH)....	43
	ANEXO 5 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ACTA VETERINARIA SCANDINAVICA.....	46

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Acta Veterinaria Scandinavica

Artigo de Pesquisa

Eficácia clínica da viscosuplementação comparativamente ao tratamento conservativo tradicional em cães com displasia coxofemoral

Gabriel OL Carapeba, Poliana Cavaleti, Gabriel M Nicácio, Rejane B Brinholi, Renata N Cassu*

Correspondência: navarro@unoeste.br

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil

Resumo

Introdução: A viscosuplementação é um tratamento que consiste na administração intra-articular (IA) de derivados do ácido hialurônico, cuja eficácia clínica tem sido confirmada em seres humanos. Objetivou-se comparar a eficácia clínica da viscosuplementação em relação ao tratamento conservativo convencional (TCC) em cães com displasia coxofemoral (DCF). Quinze cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: AH (n=8) tratamento IA com ácido hialurônico (5 mg a 10 mg); Controle (n=7): tratamento IA com solução salina (0,5 mL a 1,0 mL), além do TCC por via oral com condroprotetor (750-1000 mg, BID, 90 dias) e carprofeno (2,2 mg/kg BID, 15 dias). Os sinais clínicos da DCF foram avaliados de forma encoberta, antes do tratamento (basal), 15, 30, 60 e 90 dias após a injeção IA, por sistema de escore pelo pesquisador e mediante questionários respondidos pelos proprietários dos cães, empregando-se o Breve Inventário de Dor Canina (BIDC) e o Indicador de Dor Crônica de Helsinque (IDCH). Intervenção analgésica foi permitida se o somatório dos escores do BIDC e/ou IDCH excedesse 50%. Os resultados foram analisados pelo teste t não-pareado, teste de Mann-Whitney e teste de Friedman ($P < 0,05$).

Resultados: Os escores avaliados pelo médico veterinário foram inferiores ($P = 0,0005$) aos 30, 60 e 90 dias em relação ao basal no grupo AH, e aos 15 dias no grupo Controle ($P = 0,0003$). Na comparação entre grupos, escores inferiores foram observados aos 30, 60 e 90 dias no grupo AH em relação ao grupo controle, pela avaliação do pesquisador e pelo BIDC. Na comparação ao longo tempo, os escores totais do BIDC foram inferiores aos 60 e 90 dias em relação ao basal nos grupos Controle e AH, respectivamente ($P = 0,0145$, AH e $P = 0,0291$, Controle). Na avaliação pelo IDCH escores inferiores foram observados aos 15 e 90 dias em relação ao basal nos grupos Controle e AH, respectivamente ($P = 0,0054$, AH e $P = 0,041$, Controle). Intervenção analgésica não foi necessária durante o período de avaliação.

Conclusões: Ambos os tratamentos reduziram os sinais clínicos associados à DCF, porém resultados mais expressivos foram alcançados com a viscosuplementação.

Palavras-chave: Analgesia, Ácido hialurônico, Cão, Osteoartrose.

Abstract

Background: Viscosupplementation is one of the treatment modalities for osteoarthritis which consist in an intraarticular (IA) injection of hyaluronic composts. The aim of this randomized, double-blind study was to compare the clinical efficacy of viscosupplemantion with conventional conservative treatment (CCT) in dogs with hip dysplasia (HD). Fifteen dogs were distributed into two groups: HA (n=8): IA injection of hyaluronic acid (5-10 mg); Control (n=7): IA injection with saline solution (0.5-1.0 mL) in combination with a CCT using an oral nutraceutical (750-1000 mg, every 12 h, 90 days) and carprofen (2.2 mg/kg, every 12 h, 15 days). The clinical signs of HD were evaluated prior to treatment (baseline), 15, 30, 60, and 90 days after the IA injection by the veterinary using a score system and by the owners with a questionnaire about their dog's condition using the Canine Brief Pain Inventory (CBPI) and Helsinki Chronic Pain Index (HCPI). The data were analyzed using test unpaired-t, Mann-Whitney-U test and Friedman test, followed by post-hoc Dunn's test ($P < 0.05$).

Results: The scores measured by the veterinary decreased from 30 to 90 days in relation to the baseline in the HA group ($P = 0.0005$), and at 15 days in the Control group ($P = 0.0003$). The scores evaluated by veterinary and by CBPI were significantly lower in the HA than in the Control from 30 to 90 days. Compared with baseline, both groups had lower total CBPI scores from 60 to 90 days after IA injection respectively ($P = 0.0145$, HA and $P = 0.0291$, Control). The HCPI scores were significantly lower in the Control and HA groups at 15 and 90 days after treatment, respectively ($P = 0.0054$, HA and $P = 0.041$, Control).

Conclusions: Both treatments reduced the clinical signs of HD, however better results were provided by the viscosupplementation.

Key-words: Analgesia, Hyaluronic acid, Dog, Osteoarthritis.

Introdução

A displasia coxofemoral (DCF) representa uma das doenças ortopédicas de maior incidência na espécie canina, caracterizada pelo desenvolvimento anormal da articulação do quadril, cuja etiologia é multifatorial [1,2]. Trata-se de uma doença articular degenerativa, que progressivamente pode desencadear o desenvolvimento da osteoartrose (OA) da articulação acometida [3], que é caracterizada por lesões da cartilagem articular, remodelação óssea com presença de osteófitos, inflamação e dor [4].

Os sinais clínicos da DCF são variáveis, podendo ocorrer claudicação, deslocamento do peso corporal em direção aos membros torácicos, com rotação lateral desses membros e marcha desordenada [1,2,5]. Dentre as manifestações clínicas precoces, a mais proeminente é a dor articular, que varia em função do grau da DCF, sendo detectada entre quatro meses a um ano de idade, na maioria dos cães [3, 6,7].

O tratamento farmacológico é paliativo e visa principalmente o alívio da dor e a melhora funcional da articulação acometida, sendo utilizados, sobretudo, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) [6-10]. No entanto, o uso prolongado desses medicamentos está associado a efeitos colaterais, sobretudo no sistema digestório e renal, em função da redução da síntese de prostaglandinas [11]. Paralelamente, as prostaglandinas são componentes vitais da cartilagem articular, de modo que a inibição da síntese desses neurotransmissores pode resultar em efeitos deletérios sobre a homeostase da matriz cartilaginosa [12].

Ademais, a utilização de condroprotetores tem sido uma opção terapêutica altamente empregada no tratamento da OA, cujos efeitos foram relatados em estudos laboratoriais

[13,14] e clínicos [15-17]. Dentre os condroprotetores, os precursores da matriz cartilaginosa como sulfato de condroitina, glucosamina e ácido hialurônico são comumente empregados no tratamento clínico da OA [14,18,19].

Em cães, uma das principais condutas terapêuticas conservativas empregadas para o controle dos sinais clínicos da OA, envolve a administração oral de condroprotetores, cuja formulação é composta principalmente de sulfato de condroitina/glucosamina (SC+GL), além do uso de AINES por períodos controlados [20]. Entretanto, apesar da popularidade desse tratamento, poucos estudos avaliaram a eficácia dos medicamentos compostos pela associação SC+GL em pequenos animais [20, 21, 22]. Estudo prévio desenvolvido em cães com sinais clínicos e radiográficos de OA no ombro e no quadril revelou que o uso da associação SC+GL foi capaz de reduzir os escores de dor apenas aos 70 dias após o início do tratamento [20]. Em contrapartida, estudos clínicos desenvolvidos no homem não constataram melhora nas condições clínicas ou na evolução da doença articular em pacientes com OA no joelho tratados com SC+GL ou placebo [23,24].

Dessa forma, alguns pesquisadores têm sugerido a administração intra-articular de fármacos com propriedades condroprotetoras [17,19], visando o alcance de altas concentrações do medicamento no local da lesão, fator que favorece o efeito anti-inflamatório e analgésico, com a vantagem de reduzir o requerimento dos AINES sistêmicos e consequentemente seus efeitos adversos [26].

Neste contexto, o ácido hialurônico (AH) é um das substâncias mais empregadas por via IA para o controle da OA em seres humanos [17, 19, 25]. Essa técnica terapêutica é denominada de viscosuplementação [19]. As propriedades moleculares do AH favorecem a viscosidade e a lubrificação da cartilagem, fatores essenciais para o adequado desempenho articular. Em casos de doenças articulares degenerativas ocorre drástica redução na concentração de AH, comprometendo a viscosidade do fluido sinovial, de modo a agravar a

integridade da cartilagem [26]. Deste modo, uma das causas da dor e do comprometimento da mobilidade articular parece estar associada à diminuição do efeito protetor deste meio visco-elástico nos receptores dolorosos do tecido sinovial [19, 27].

No homem, vários estudos clínicos têm demonstrado resultados promissores após o tratamento IA com AH em casos de OA, com evidências de redução da dor e melhora da função articular [17, 25, 28]. Contudo, poucos estudos avaliaram o uso clínico do AH administrado por via IA em cães portadores de OA [29,30]. Paralelamente, além da escassez de estudos clínicos na área, não foi encontrado na literatura atual nenhum estudo com foco na avaliação do tratamento IA com AH em cães portadores de DCF.

Objetivou-se comparar a eficácia analgésica da viscosuplementação em relação ao TCC (condroprotetor/AINE) administrado por via oral em cães portadores de DCF. A hipótese do presente estudo é que a viscosuplementação possa determinar efeitos superiores em relação ao TCC no concernente à analgesia e qualidade de vida de cães com DCF.

Metodologia

Animais

Após aprovação da Comissão de Uso de Animais em Experimentação (CEUA, protocolo n.1611, Anexo 1) e termo de consentimento do proprietário do animal (TCLE), foram avaliados quinze cães, com peso de $19,5 \pm 9$ kg (3,2 – 35 kg), idade de 12 ± 5 anos (1,5 – 15 anos), portadores de DCF de graus D e E, provenientes da rotina do Hospital Veterinário (HV) da Universidade do Oeste Paulista. Foram incluídos no estudo apenas cães portadores de dor crônica (com sinais de dor por um período de pelo menos três meses) e que não estivessem utilizando qualquer tipo de fármaco analgésico (AINES ou corticosteroides) e condroprotetores por no mínimo oito semanas. Além disso, participaram do estudo apenas os cães cujos proprietários descreveram pelo menos dois sinais clínicos frequentes em cães portadores de DCF, como dificuldade em: deitar ou se levantar da posição deitada, de pular ou de recusa em pular, de subir ou descer escadas ou claudicação. Foram excluídos animais com alterações em outras articulações além da coxofemoral, alterações na coluna vertebral, presença de déficits neurológicos, gestantes, histórico de gastrite recorrente ou úlceras gástricas, portadores de doenças renais e/ou hepáticas e doenças sistêmicas graves.

Todos os animais foram avaliados mediante exames laboratoriais (hemograma completo, dosagem sérica de uréia, creatinina, enzimas alanino aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina), antes do início do tratamento e mensalmente durante o período de avaliação (90 dias).

Avaliação física pelo veterinário

A avaliação física do animal foi realizada por médico veterinário ortopedista que desconhecia o tratamento efetuado. Nessa avaliação foi realizada a mensuração da dor, do grau de claudicação e da habilidade de pular e subir escadas mediante sistema de score, da

seguinte forma: Dor à palpação: (0) Sem sinais de dor a palpação ou da articulação afetada; (1) Sinais moderados de dor à palpação da articulação afetada, o cão vira a cabeça em reconhecimento; (2) Sinais de dor moderada à palpação da articulação afetada, cão puxa o membro em reação de defesa; (3) Sinais de dor severa à palpação, o cão vocaliza ou se torna agressivo; (4) O cão não permite à palpação [31]; Grau de claudicação: (0) Normal, não claudica; (1) Claudicação leve, não é tão difícil se mover; (2) Claudicação clara, não se move livremente; (3) Claudicação evidente; (4) Claudicação total, evita sustentar o peso no membro acometido [32]; Habilidade em pular em uma mesa/banco: (0) Pula normalmente; (1) Pula com leve cuidado; (2) Pula com um pouco de dificuldade; (3) Pula ou sobe com grande dificuldade; (4) Nem tenta devido à dificuldade/dor [31]; Habilidade em subir escadas: (0) Sobe e desce as escadas normalmente; (1) Levemente cuidadoso, utiliza ambas as patas sucessivamente; (2) Algumas vezes utiliza ambas as patas ao mesmo tempo, não se move evidentemente de maneira livre; (3) Sobe a escada como coelho durante todo o tempo, sobe a escada com grande dificuldade; (4) Nem tenta subir, devido à dificuldade/dor [31].

Para a confirmação da DCF foi realizado o exame radiográfico. Para o adequado posicionamento radiográfico, os cães foram sedados pela associação de maleato de acepromazina 0,2%¹ (0,03 mg/kg) e morfina² (0,5 mg/kg) pela via intramuscular (IM). Em casos de analgesia insuficiente para o correto posicionamento do animal, foi administrada anestesia geral intravenosa, com o propofol³, efeito dose-dependente. Avaliações radiográficas incluíram as projeções ventrodorsal, lateral e craniocaudal e seguirão os padrões estabelecidos pela *Orthopedic Foundation for Animals* (OFA) para avaliação da DCF [33]. A projeção ventrodorsal para o diagnóstico de displasia coxofemoral incluiu a pelve e o terço proximal da tíbia, com os membros pélvicos paralelos, estendidos caudalmente e rotacionados medialmente para manutenção da patela no sulco troclear. A projeção lateral foi efetuada com o membro pélvico mantido em posição anatômica de estação em flexão, no ângulo entre 140 e

150°, incluindo fêmur e terço proximal da tíbia [5,33]. O grau de DCF foi classificado de acordo com o padrão estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária e Federação Cinológica Internacional (FCI, Anexo 2) para avaliação da articulação coxofemoral [34].

Tratamentos

Estabelecido o diagnóstico da DCF, em delineamento duplo cego, os cães foram aleatoriamente distribuídos em dois tratamentos: AH (n=8): administração intra-articular (IA) de ácido hialurônico⁴ nas doses de 5 mg (para animais com peso igual ou inferior a 10 kg) ou 10 mg (para animais com peso igual ou superior a 11 kg); Controle (n=7): administração IA de 0,5 mL (para animais com peso igual ou inferior a 10 kg) ou 1,0 mL (para animais com peso igual ou superior a 11 kg) de solução salina em cada uma das articulações além da prescrição do TCC com condroprotetor⁵ (1000 mg VO, BID, durante 90 dias) e carprofeno⁶ (2,2mg/kg, VO, BID, durante 15 dias). A formulação do condroprotetor contém sulfato de condroitina, glucosamina e colágeno.

Após tricotomia, e antissepsia, o acesso articular foi guiado mediante ultrassonografia, com os animais sob anestesia geral inalatória. A artrocentese foi realizada por acesso lateral e confirmada pela aspiração do líquido sinovial. Para o procedimento anestésico, os animais foram mantidos em jejum sólido e hídrico de 12 e 3 horas, respectivamente. Todos os cães foram sedados com maleato de acepromazina 0,2%¹ (0,03 mg/kg, IM) em associação à morfina² (0,5 mg/kg, IM), ambas na mesma seringa. Vinte minutos após, foi realizada a cateterização da veia cefálica, procedendo-se a indução anestésica com propofol³ efeito dose-dependente. Ato contínuo, foi realizada a intubação endotraqueal, mantendo-se a anestesia inalatória com isoflurano⁷, em circuito circular valvular semi-fechado do aparelho de anestesia⁸, com fluxo de oxigênio de 1 L/min. Todos os cães foram mantidos em

fluidoterapia, com Ringer Lactato, administrado na velocidade de 5 mL/kg/h, mediante bomba de infusão peristáltica.

Vinte e quatro horas após a injeção IA, foi feito contato via telefone com o proprietário para informações a respeito do comportamento do cão nesse período, sendo questionada a presença de irritação na pele e desconforto do animal (como: lamber ou morder o local da injeção, aumento no grau de claudicação, maior dificuldade para levantar ou deitar, ocorrência de vocalização).

Avaliação do estado geral do cão pelo proprietário

Além das avaliações periódicas realizadas pelo médico veterinário, os cães foram avaliados pelos proprietários em casa, mediante dois questionários descritivos: Breve Inventário de Dor Canina [7, 35] incluindo os escores totais e os referentes à gravidade (GD) e a interferência da dor (ID) (BIDC - Anexo 3) e o Indicador de Dor Crônica de Helsinque [32] (IDCH – Anexo 4).

As mensurações feitas pelo médico veterinário e pelos proprietários dos cães foram realizadas antes do tratamento (basal), 15, 30, 60 e 90 dias após injeção IA. Durante o período de avaliação (90 dias), a administração oral de carprofeno⁶ (2,2mg/kg, VO, BID) foi permitida em casos de desconforto do animal. A terapia analgésica sistêmica foi permitida em casos do somatório dos escores avaliados pelo proprietário excederem 50% do valor total avaliado pelo BIDC e/ou IDCH. Em situações de alterações no sistema digestório, como hiporexia, anorexia e/ou episódios de vômito, foi permitida administração oral concomitante do protetor de mucosa gástrica, omeprazol (0,17 mg/kg, a cada 24 horas).

A sequência experimental está representada graficamente na Fig.1.

Efeitos adversos

Foi avaliada a ocorrência de efeitos adversos como: dor e presença de hematomas no local da injeção, ocorrência de artrite séptica, anorexia, vômitos e diarreia.

Análise Estatística

O tamanho amostral foi estimado em um número mínimo de sete animais por grupo, para um poder de teste de 80% e nível alfa de 5%, em identificar diferenças de pelo menos 30% entre os grupos.

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para identificar a sua distribuição. Para as variáveis, peso, idade e sexo, o teste t não pareado foi utilizado para comparação entre os grupos. O somatório dos escores avaliados pelo médico veterinário e pelos proprietários (BIDC e IDCH) foi avaliado pelo teste Mann-Whitney para comparação entre grupos, enquanto que o teste de Friedman foi empregado para avaliação ao longo do tratamento para um mesmo grupo, com contrastes verificados pelo teste de Dunn. O índice de melhora conferido pelos tratamentos foi avaliado pelo teste Mann-Whitney. O nível de significância utilizado em todos os testes foi de 5%. Foi utilizado o programa InStat 5,1 para a análise estatística.

Resultados

Foram selecionados para participar do estudo 18 cães portadores de DCF. No entanto, três proprietários não totalizaram a avaliação dos seus cães, de modo que foram excluídos do estudo.

As raças dos cães selecionados para o estudo foram: Labrador (3 animais), SRD (4 animais), Boxer (2 animais), Poodle (1 animal), Border Collie (2 animais), Lhasa apso (3 animais).

Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso (AH: 18 ± 8 kg; Controle: 21 ± 8 kg), idade (AH: 8 ± 5 anos; Controle: $4\pm 2,5$ anos), sexo (AH: 4 fêmeas e 4 machos; Controle: 3 fêmeas e 4 machos) e grau de displasia (AH: 7 animais - grau D, 1 animal – grau E; Controle: 7 animais - grau D, 1 animal – grau E). Com exceção de dois animais que apresentaram DCF unilateral (um de cada grupo), todos os outros animais apresentavam DCF bilateral.

No momento basal de avaliação o somatório dos escores avaliados pelo médico veterinário ou proprietários (BIDC e IDCH) não diferiu entre os tratamentos.

Com relação ao somatório dos escores avaliados pelo médico veterinário, no grupo AH os escores foram inferiores ($P = 0,0005$) aos 30, 60 e 90 dias em relação ao momento basal, enquanto que no grupo Controle a mesma resposta foi observada somente aos 15 dias de avaliação ($P = 0,0003$). Na comparação entre grupos, escores inferiores foram observados aos 15, 30, 60 e 90 dias de avaliação no grupo AH em relação ao grupo controle (Fig. 2).

Nas avaliações realizadas pelos proprietários dos cães pelo BIDC, os índices de avaliação inerentes à GD não diferiram entre os grupos e nem ao longo do tempo (Fig. 3a). Já, na avaliação referente à ID, os escores foram inferiores ($P = 0,0205$) aos 90 dias de avaliação nos animais tratados com AH em relação ao momento basal (Fig. 3b). Os escores totais avaliados pelo BIDC foram inferiores no grupo tratado com AH em relação ao grupo controle

aos 30, 60 e 90 dias de avaliação. Na comparação ao longo tempo, os escores totais referentes à avaliação pelo B IDC foram inferiores aos 60 e 90 dias em relação ao momento basal nos grupos Controle e AH, respectivamente ($P = 0,0145$, grupo AH e $P = 0,0291$, grupo Controle) (Fig. 3c).

Na avaliação feita através do IDCH escores inferiores foram observados aos 15 e 90 dias em relação ao momento basal nos grupos Controle e AH, respectivamente ($P = 0,0054$, grupo AH e $P = 0,041$, grupo Controle) (Fig. 4).

Com base no critério adotado para considerar diferenças relevantes entre os grupos e cálculo do poder do teste, o resultado esperado do tratamento era de uma redução de pelo menos 30% nos valores médios provenientes das avaliações feitas através dos questionários respondidos pelos proprietários. Dessa forma, foi constatada melhora clínica em 57,14% (4/7) dos animais do grupo Controle e 100% (8/8) dos animais do grupo AH pela avaliação pelo B IDC, cuja diferença foi considerada significativa ($P = 0,0289$). Já na avaliação pelo IDCH, a incidência de melhora clínica foi observada em 28,5% (2/7) dos animais do grupo Controle e 50% (4/8) dos animais do grupo AH pela avaliação com p B IDC, sem diferença entre os grupos ($P = 0,3969$).

Os índices totais avaliados pelos proprietários dos cães revelaram uma melhora clínica média de 56,38% e 32% nos animais dos grupos AH e Controle, respectivamente, pela avaliação do B IDC, sendo detectada diferença estatística entre os grupos ($P = 0,0205$). Pela avaliação do IDCH os índices de melhora foram de 34% e 24% nos animais dos grupos AH e Controle, respectivamente, sem diferença estatística entre os tratamentos ($P = 0,5358$).

Com relação à impressão geral do paciente ao término dos tratamentos, 75% dos proprietários avaliaram a qualidade de vida como muito boa a excelente nos cães do grupo AH, enquanto no grupo controle a maioria dos proprietários (71%) avaliou a qualidade de vida como boa, sendo detectada diferença estatística entre os grupos ($P = 0,0335$).

Com relação aos efeitos adversos, três animais (dois do grupo AH e um do grupo Controle) demonstraram sinais de dor nas primeiras 24 horas após a injeção IA.

Discussão

Este é o primeiro estudo que comparou o uso da vicossuplementação ao TCC em cães com DCF. Os resultados sugerem que ambos os tratamentos possibilitaram a redução dos sinais clínicos da DCF, contudo maior eficácia analgésica foi alcançada nos cães tratados com AH por via IA, confirmando a hipótese do estudo.

A dose de AH administrada foi embasada em estudos prévios realizados em cães [29,30]. Com relação ao número necessário de aplicações IA de AH para obtenção de resultados satisfatórios não há um consenso na literatura vigente. Estudos desenvolvidos no homem relataram sucesso com o tratamento IA efetuado a partir de aplicação única [36,37,38] ou múltiplas aplicações com intervalo semanal [39,40]. Em cães submetidos à correção cirúrgica de luxação de patela, a aplicação única IA de AH após o término da cirurgia resultou em efeitos semelhantes à aplicação de duas doses com intervalo semanal [29]. Em seres humanos, resultados similares foram relatados por Kolarz *et al.* [41], que demonstraram que o tratamento com AH via IA administrado em única ou em múltiplas aplicações resultou em efeitos benéficos similares em pacientes com sinais de OA. No atual estudo, optou-se pela aplicação única de AH, sem o uso de outros medicamentos associados, em função da escassez de dados publicados com esse tratamento para cães portadores de DCF. Dessa forma, foi possível a mensuração precisa dos resultados inerentes ao período de latência, tempo de duração e evolução clínica dos pacientes ao longo do período de avaliação.

O período de latência e de ação determinados pela administração IA do AH não estão completamente esclarecidos [17,19]. Estudos desenvolvidos no homem [39, 42] e em cães [29] demonstraram que a redução dos sinais clínicos decorrentes de DAD ocorre entre 2 a 5

semanas após a administração IA do AH. Essa resposta foi confirmada no atual estudo, sendo detectada redução significativa nos índices avaliados pelo médico veterinário na quarta semana (30 dias) após a injeção IA. Todavia, segundo às avaliações feitas pelos proprietários dos cães, apesar da tendência de redução dos escores em relação ao momento basal, a diferença significativa só foi constada aos 90 dias de avaliação. Já no grupo controle, aos 15 dias de avaliação, os escores mensurados pelo médico veterinário e pelos proprietários através do IDCH foram inferiores em relação ao basal. Esse resultado era esperado, uma vez que nesse período de avaliação, os animais do grupo controle foram medicados com carprofeno, enquanto que os animais do grupo AH não receberam nenhum tratamento anti-inflamatório. O tratamento prescrito para o grupo controle foi embasado na terapia comumente empregada para redução dos sinais clínicos da DCF em cães, pela maioria dos clínicos veterinários. O anti-inflamatório escolhido foi o carprofeno, em função de ser um dos AINES mais estudados em cães com OA [6,8,9,10], além do fato de diversos estudos clínicos terem confirmado a segurança desse medicamento por períodos superiores a 15 dias de tratamento [6, 11].

O exato mecanismo de ação do AH não está completamente elucidado. Esse fármaco é um importante modulador, principalmente em função da interação com receptores CD44 presentes nos sinoviócitos *fibroblast-like* [43,44]. Portanto, além dos efeitos mecânicos de promover melhor distribuição de forças, diminuir a pressão pelo peso e recuperar as propriedades reológicas do líquido sinovial [45], o AH também atua bioquimicamente, reduzindo a expressão gênica das citocinas e enzimas associadas à OA [46], diminuindo a produção de prostaglandinas [44] e a concentração intra-articular de metaloproteinases [47]. Ademais, o AH exógeno determina um incremento na produção de ácido hialurônico pelos sinoviócitos [48], estabiliza a matriz cartilaginosa [49], estimula a proliferação de condrócitos, aumenta a produção de colágeno tipo 2 e agregans pelo condrócito, além de diminuir a degradação do colágeno tipo 2 [50]. Paralelamente, foi demonstrado em animais de

laboratório, que o AH é capaz de estimular o receptor opioide kappa (κ), atuando como um agonista parcial, de modo a favorecer a síntese de peptídeos opioides endógenos, fator que também contribui na modulação da dor [51].

No atual estudo, os índices totais avaliados pelos proprietários dos cães pelo BIDC, revelaram uma melhora clínica superior nos animais tratados com AH (56,38%) quando comparados ao grupo controle (32%). Além disso, dos 30 aos 90 dias e dos 60 aos 90 dias de avaliação pelo médico veterinário e pelo BIDC, respectivamente, os escores totais referentes ao tratamento com AH foram inferiores em relação ao tratamento Controle, sugerindo efeito analgésico de longa duração. Resultados similares foram descritos em seres humanos com OA de joelho, sendo relatada maior eficiência na redução da dor articular durante 12 semanas nos pacientes tratados com AH em relação ao tratamento com triancinolona, ambos por via IA [37].

Outro aspecto importante é a correlação entre os índices de melhora clínica e a qualidade de vida dos cães. Nos animais tratados com viscosuplementação, 75% dos proprietários consideraram a qualidade de vida dos animais ao término do tratamento como muito boa a excelente. Esse resultado corrobora estudos prévios desenvolvidos no homem que atribuíram melhores índices de qualidade de vida aos pacientes que responderam de forma favorável às terapias antálgicas, demonstrando uma correlação direta entre o alívio da dor crônica e o incremento da qualidade de vida [19, 36, 37].

Um dos aspectos mais relevantes do atual estudo refere-se às vantagens conferidas pelo tratamento com AH em relação ao TCC em cães com DCF. Do ponto de vista clínico, o fator mais interessante diz respeito à possibilidade do uso isolado do AH, sem a necessidade de complementação analgésica durante 90 dias após administração IA, uma vez que os AINES podem induzir efeitos adversos, quando administrados por períodos prolongados, além de representarem um fator de risco para animais com histórico de desordens de

coagulação, alterações renais ou digestórias [11]. Paralelamente, a administração de dose única do AH por via IA representa uma forma de tratamento de maior praticidade, dispensando o uso diário de condroprotetores por VO, fator limitante do tratamento em casos de cães relutantes à ingestão de medicamentos, ou com comportamento agressivo.

Além dos efeitos favoráveis no que diz respeito à redução dos sinais clínicos da DCF, mínimos efeitos adversos foram observados em ambos os tratamentos, corroborando estudos prévios desenvolvidos em seres humanos [17,19] e cães [29, 30] que relataram baixa incidência de efeitos indesejáveis após o uso de AH por via IA. No atual estudo, dos 15 animais avaliados, somente três proprietários relataram sinais compatíveis com desconforto nas primeiras 24 horas após a injeção IA, o qual foi de caráter transitório, não representando relevância clínica.

De forma geral, a avaliação da dor em animais consiste num difícil desafio, em função da impossibilidade de expressão verbal, o que torna a mensuração desse parâmetro extremamente subjetiva por parte dos avaliadores. Muitos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de aprimorar as escalas empregadas na avaliação da dor crônica, envolvendo não somente a avaliação pelo pesquisador [31,32], mas também o emprego de questionários multifatoriais direcionados para os proprietários dos animais, considerando alterações de comportamento, capacidade de locomoção, sinais de dor e qualidade de vida [35,36]. No atual estudo, o delineamento experimental foi duplo-cego, visando minimizar qualquer resultado tendencioso por parte do pesquisador ou dos proprietários dos animais. Adicionalmente, a avaliação clínica dos cães foi conduzida por um veterinário ortopedista, experiente na avaliação de animais com DCF, que já havia participado previamente de outros estudos envolvendo cães com OA.

Os questionários empregados no atual estudo foram validados para avaliação de dor crônica em cães com OA [32,35]. Os resultados informados pelos proprietários revelaram

maior diferença entre os grupos pela avaliação com o BIDC. Em cães com OA, esse questionário foi capaz de identificar melhora clínica no grupo tratado com AINE em comparação ao placebo, sugerindo ser um método viável para avaliar a evolução clínica de cães com OA [7, 35]. Na avaliação feita através do IDCH não foram constatadas diferenças entre os grupos ao longo do tempo. Resultados similares foram observados por Teixeira [52] com o emprego desse questionário para avaliação dos sinais clínicos de cães com DCF submetidos a diferentes tratamentos. O IDCH é questionário minucioso que consta de 11 perguntas referentes ao estado geral do cão na sua vida cotidiana, envolvendo questões comportamentais, atividade geral e capacidade de locomoção. No atual estudo, muitos dos proprietários demonstraram algum grau de dificuldade para o preenchimento desse questionário, o que pode ter interferido no resultado final da avaliação. Cerca de 50% dos proprietários dos cães, apresentavam baixos níveis de escolaridade e de esclarecimento, fatores que podem ter dificultado a interpretação das perguntas. Além disso, apesar das orientações fornecidas no início do tratamento, bem como do esclarecimento inerente à importância da minuciosa avaliação do cão na sua vida cotidiana, alguns dos proprietários não demonstraram comprometimento satisfatório para contribuição na pesquisa.

Este estudo apresenta algumas limitações. Dentre elas, podemos destacar o número restrito de animais avaliados. É possível que um número maior de cães revelasse resultados mais consistentes no que diz respeito à redução dos sinais clínicos e da qualidade de vida dos animais estudados. No entanto, muitos dos cães encaminhados para participarem do estudo não foram selecionados em função de apresentarem outras lesões, além da DCF. Cerca de 40% do número total de animais selecionados para o estudo, apresentavam alterações de coluna vertebral, fator que excluiu a participação desses cães na pesquisa. Além disso, alguns dos proprietários se recusaram a participar do estudo pela necessidade da utilização de anestesia geral para o acesso da articulação coxofemoral. Muitos dos cães apresentavam idade

avançada, o que favoreceu o receio dos proprietários perante o procedimento. Outro fator limitante do estudo é a grande heterogeneidade da população avaliada. Apesar de não ter sido constatada diferença significativa nos dados demográficos, houve uma variação individual expressiva no que diz respeito ao peso corpóreo (3,2 a 30 Kg), idade (1,5 a 15 anos) e raças avaliadas. Inicialmente, a expectativa era de que o peso corpóreo fosse muito próximo, devido à maior incidência da doença nas raças de grande porte. Porém ao contrário do esperado, as raças foram diversas. Além disso, apesar da seleção de animais com DCF, graus D e E, a intensidade dos sinais clínicos e o tempo de evolução da doença diferiram entre os indivíduos. No entanto, essas diferenças são inerentes ao estudo clínico, e fazem parte daquelas variáveis que não podem ser totalmente controladas e que de fato revelam a realidade da rotina clínica.

Conclusões

Conclui-se que ambos os tratamentos possibilitaram a redução dos sinais clínicos da DCF, contudo melhores resultados foram alcançados nos cães tratados com AH por via IA, o qual pode representar uma alternativa viável para cães com DCF.

Notas

¹ Acepran®, Vetnil, Louveira, São Paulo, Brasil

² Dimorf®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil

³ Propovan®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil

⁴ Hyalovet®, Hetacarpe, São Paulo, Brasil

⁵ Condroton®, Vetnil, Louveira, São Paulo, Brasil

⁶ Rymadil®, Bayer, São Paulo, Brasil

⁷ Isoforine®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil

⁸ SAT 500 ®, Takaoka, São Paulo, Brasil

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento de Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. Tsai KL, Murphy KE. Clinical and genetic assessments of hip joint laxity in the Boykin spaniel. *Can J Vet Res.* 2006; 70: 148-50.
2. Alexander JW. The pathogenesis of canine hip dysplasia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1992; 22: 503-11.
3. Smith GK, Mayhew PD, Kapatkin AS, McKelvie PJ, Shofer FS, Gregor TP. Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associated with hip dysplasia in German

- shepherd dogs, Golden retrievers, Labrador retrievers, and Rottweilers. *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 219: 1719-24.
4. Johnston SA, McLaughlin RM, Budsberg SC. Nonsurgical management of osteoarthritis in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008; 38: 1449–70.
 5. Smith GK, Biery DN, Gregor TP. New concepts of coxofemoral joint stability and the development of a clinical stress radiographic method for quantitating hip joint laxity in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1990; 196: 59-70.
 6. Mansa S, Palmér E, Grøndahl C, Lønaas L, Nyman G. Long-term treatment with carprofen of 805 dogs with osteoarthritis. *Vet Rec.* 2007; 160: 427-30.
 7. Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT. Ability of the Canine Brief Pain Inventory to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc.* 2008; 233:1278-83.
 8. Lipscomb VJ, AliAbadi FS, Lees P, Pead MJ, Muir P. Clinical efficacy and pharmacokinetics of carprofen in the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec.* 2002; 150: 684-9.
 9. Edamura K, King JN, Seewald W, Sakakibara N, Okumura M. Comparison of oral robenacoxib and carprofen for the treatment of osteoarthritis in dogs: a randomized clinical trial. *J Vet Med Sci.* 2012; 74: 1121-31.
 10. Pollmeier M, Toulemonde C, Fleishman C, Hanson PD. Clinical evaluation of firocoxib and carprofen for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec.* 2006; 159: 547-51.
 11. Luna SP, Basílio AC, Steagall PV, Machado LP, Moutinho FQ, Takahira RK, et al. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. *Am J Vet Res.* 2007; 68: 258-64.

12. Benton HP, Vasseur PB, Broderick-Villa GA. Effect of carprofen on sulfated glycosaminoglycan metabolism, protein synthesis, and prostaglandin release by cultured osteoarthritic canine chondrocytes. *Am J Vet Res.* 1997; 286-92.
13. Bauerova K, Ponist S, Kuncirova V, Mihalova D, Paulovicova E, Volpi N. Chondroitin sulfate effect on induced arthritis in rats. *Osteoarthritis Cartil.* 2011; 19: 1373-9.
14. Permy M, Guede D, López-Peña M, Muñoz F, Caeiro JR, González-Cantalapiedra A. Comparison of various SYSADOA for the osteoarthritis treatment: an experimental study in rabbits. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015; 16: 120.
15. Hochberg MC. Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. *Osteoarthr Cartil.* 2010; 18 Suppl 1: 28–31.
16. Wildi LM, Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Beaulieu A, Bessette L, Morin F. Chondroitin sulphate reduces both cartilage volume loss and bone marrow lesions in knee osteoarthritis patients starting as early as 6 months after initiation of therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study using MRI. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 982-9.
17. Henrotin Y, Hauzeur JP, Bruel P. Intra-articular use of a medical device composed of hyaluronic acid and chondroitin sulfate (Structovial CS): effects on clinical, ultrasonographic and biological parameters. *BMC Res Notes.* 2012; 4: 407.
18. Salazar J, Bello L, Chavez M, Anez R, Rojas J, Bermudez V. Glucosamine for osteoarthritis: biological effects, clinical efficacy, and safety on glucose metabolism. *Arthritis.* 2014; doi: 10.1155/2014/432463.
19. Zóboli AA, Rezende MU, Campos GC, Pasqualin T, Frucchi R, Camargo OP. Prospective randomized clinical trial: single and weekly viscosupplementation. *Acta Ortop Bras.* 2013; 21: 271-5.

20. McCarthy G, O'Donovan J, Jones B, McAllister H, Seed M, Mooney C. Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet J.* 2007; 174: 54-61.
21. Sul RM, Chase D, Parkin T, Bennett D. Comparison of meloxicam and a glucosamine-chondroitin supplement in management of feline osteoarthritis. A double-blind randomised, placebo-controlled, prospective trial. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2014; 27: 20-6.
22. Sauvé F, Paradis M, Refsal KR, Moreau M, Beauchamp G, Dupuis J. Effects of oral administration of meloxicam, carprofen, and a nutraceutical on thyroid function in dogs with osteoarthritis. *Can Vet J.* 2003; 44: 474-9.
23. Fransen M, Agaliotis M, Nairn L, Votrubec M, Bridgett L, Su S, et al. Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a double-blind randomized placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74: 851-8.
24. Yang S, Eaton CB, McAlindon TE, Lapane KL. Effects of glucosamine and chondroitin supplementation on knee osteoarthritis: an analysis with marginal structural models. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67: 714-23.
25. Qvistgaard E, Christensen R, Torp-Pedersen S. Intraarticular treatment of hip osteoarthritis: a randomised trial of hyaluronic acid, corticosteroid, and isotonic saline. *Osteoarthritis Cartil.* 2006; 14: 163-70.
26. Bot PT, Hoefler IE, Piek JJ. Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis. *Curr Med Chem.* 2008; 15: 786-91.
27. Okazaki K, Iwamoto Y. Progress of research in osteoarthritis: gene expression and its regulatory mechanisms in the degenerative cartilage in osteoarthritis. *Clin Calcium.* 2009; 19: 1578-85.

28. Lo GH, Lavalley M, Mcalindon T. Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis-a meta-analysis. *J Am Med Assoc.* 2003; 290: 3115-21.
29. Nganvongpanit K, Boonsri B, Sripratak T, Markmee P. Effects of one-time and two-time intra-articular injection of hyaluronic acid sodium salt after joint surgery in dogs. *J Vet Sci.* 2013; 14: 215-22.
30. Franklin SP, Cook JL. Prospective trial of autologous conditioned plasma versus hyaluronan plus corticosteroid for elbow osteoarthritis in dogs. *Can Vet J.* 2013; 54: 881-4.
31. Hielm-Bjorkman AK, Kuusela E, Liman A, Markkola A, Saarto E, Huttunen P, et al. Evaluation of methods of assessment of pain associated with chronic osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2003; 222: 1552-8.
32. Hielm-Bjorkman AK, Rita H, Tulamo RM. Psychometric testing of the Helsinki chronic pain index by completion of a questionnaire in Finnish owners of dogs with chronic signs of pain caused by osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 2009; 70: 727-34.
33. Adams WM, Dueland RT, Meinen J, O'Brien RT, Giuliano E, Nordheim EV. Early detection of canine hip dysplasia: comparison of two palpation and five radiographic methods. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1998; 34: 339-47.
34. Verhoeven G, Coopman F, Duchateau L, Saunders JH, van Rijssen B, van Bree H. Interobserver agreement in the diagnosis of canine hip dysplasia using the standard ventrodorsal hip-extended radiographic method. *J Small Anim Pract.* 2007; 48:387-93.
35. Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT. Development and psychometric testing of an instrument designed to measure chronic pain in dogs with osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 2007; 68: 631-7.
36. Ertürk C, Altay MA, Altay N, Kalender AM, Oztürk IA. Will a single periarticular lidocaine-corticosteroid injection improve the clinical efficacy of intraarticular hyaluronic

- acid treatment of symptomatic knee osteoarthritis? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014; 2:56-62.
37. Skwara A, Ponelis R, Tibesku CO, Rosenbaum D, Fuchs-Winkelmann S. Gait patterns after intraarticular treatment of patients with osteoarthritis of the knee-hyaluronan versus triamcinolone: a prospective, randomized, double blind, monocentric study. *Eur J Med Res.* 2009; 14: 157-64.
 38. Chevalier X, Jerosch J, Goupille P, van Dijk N, Luyten FP, Scott DL. Single, intra-articular treatment with 6 ml hylan G-F 20 in patients with symptomatic primary osteoarthritis of the knee: a randomised, multicentre, double-blind, placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 113-9.
 39. Leardini G, Perbellini A, Franceschini M. Intra-articular injections of hyaluronate acid in the treatment of the painful shoulder. *Clin Ther.* 1988; 10: 521-5.
 40. Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 2: CD005321.
 41. Kolarz G, Kotz R, Hochmayer I. Long-term benefits and repeated treatment cycles of intra-articular sodium hyaluronate (Hyalgan) in patients with osteoarthritis of the knee. *Semin Arthritis Rheum.* 2003; 32: 310-9.
 42. Brzusek D, Petron D. Treating knee osteoarthritis with intra-articular hyaluronans. *Curr Med Res Opin.* 2008; 24: 3307-22.
 43. Takeshita S, Mizuno S, Kikuchi T. The in vitro effect of hyaluronic acid on IL-1 β production in cultured rheumatoid synovial cells. *Biomed Res.* 1997; 18: 187-94.
 44. Yasuda T. Hyaluronan inhibits prostaglandin E2 production via CD44 in U937 human macrophages. *Tohoku J Exp Med.* 2010; 220: 229-35.

45. Bagga H, Burkhardt D, Sambrook P. Long term effects of intraarticular hyaluronan on synovial fluid in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*. 2006; 33: 946-50.
46. Wang CT, Lin YT, Chiang BL. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2006; 14: 1237-47.
47. Sasaki A, Sasaki K, Konttinen YT. Hyaluronate inhibits the interleukin-1beta-induced expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 in human synovial cells. *Tohoku J Exp Med*. 2004; 204: 99-107.
48. Smith MM, Ghosh P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int*. 1987; 7: 113-22.
49. Kato Y, Mukudai Y, Okimura A. Effects of hyaluronic acid on the release of cartilage matrix proteoglycan and fibronectin from the cell matrix layer of chondrocyte cultures: interactions between hyaluronic acid and chondroitin sulfate glycosaminoglycan. *J Rheumatol Suppl*. 1995; 43: 158-9.
50. Ehlers EM, Behrens P, Wunsch L. Effects of hyaluronic acid on the morphology and proliferation of human chondrocytes in primary cell culture. *Ann Anat*. 2001; 183: 13-7.
51. Zavan B, Ferroni L, Giorgi C. Hyaluronic acid induces activation of the k-opioid receptor. *PLoS ONE* 2013; 8: e55510.
52. Teixeira LR. Owner assessment of chronic pain and gait analysis of dogs with hip dysplasia treated with acupuncture. 2015. Thesis (PhD). São Paulo State University.

Figuras

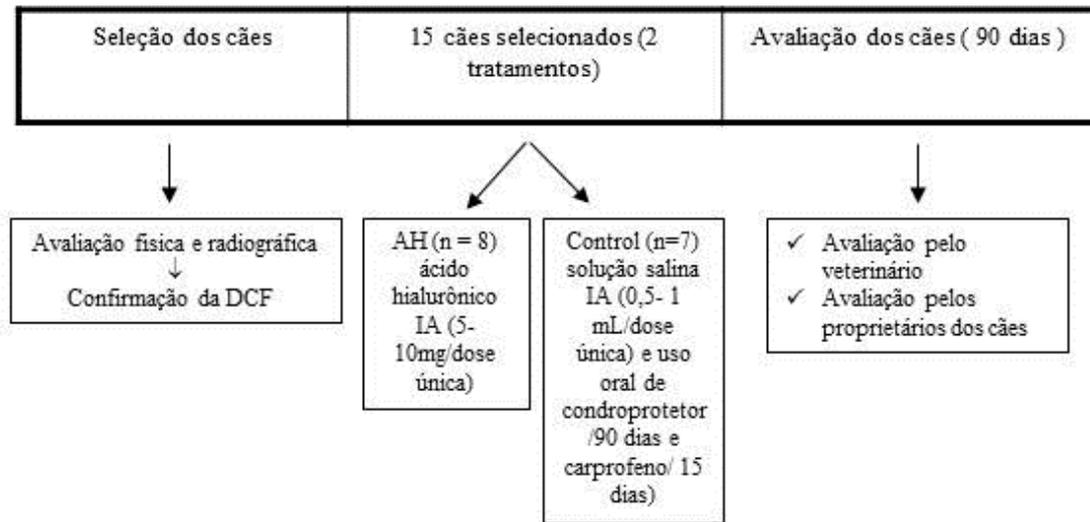
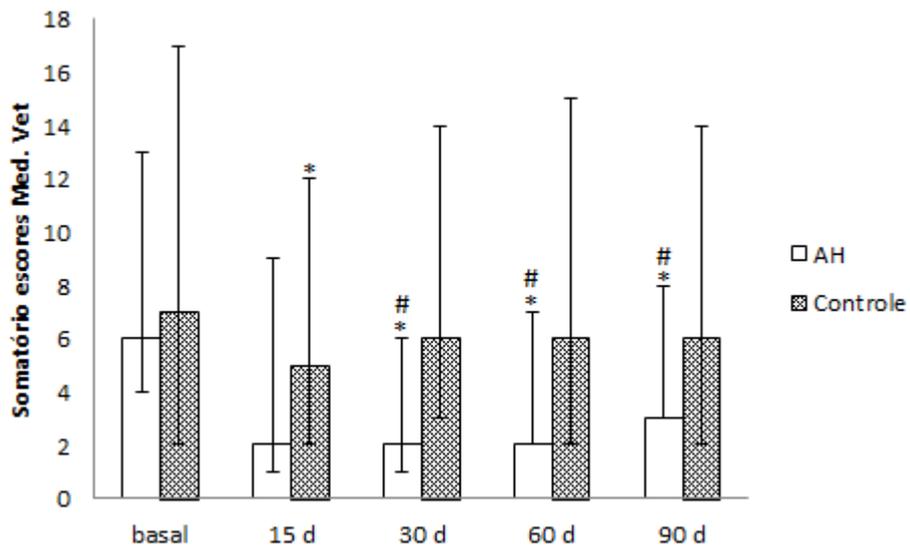


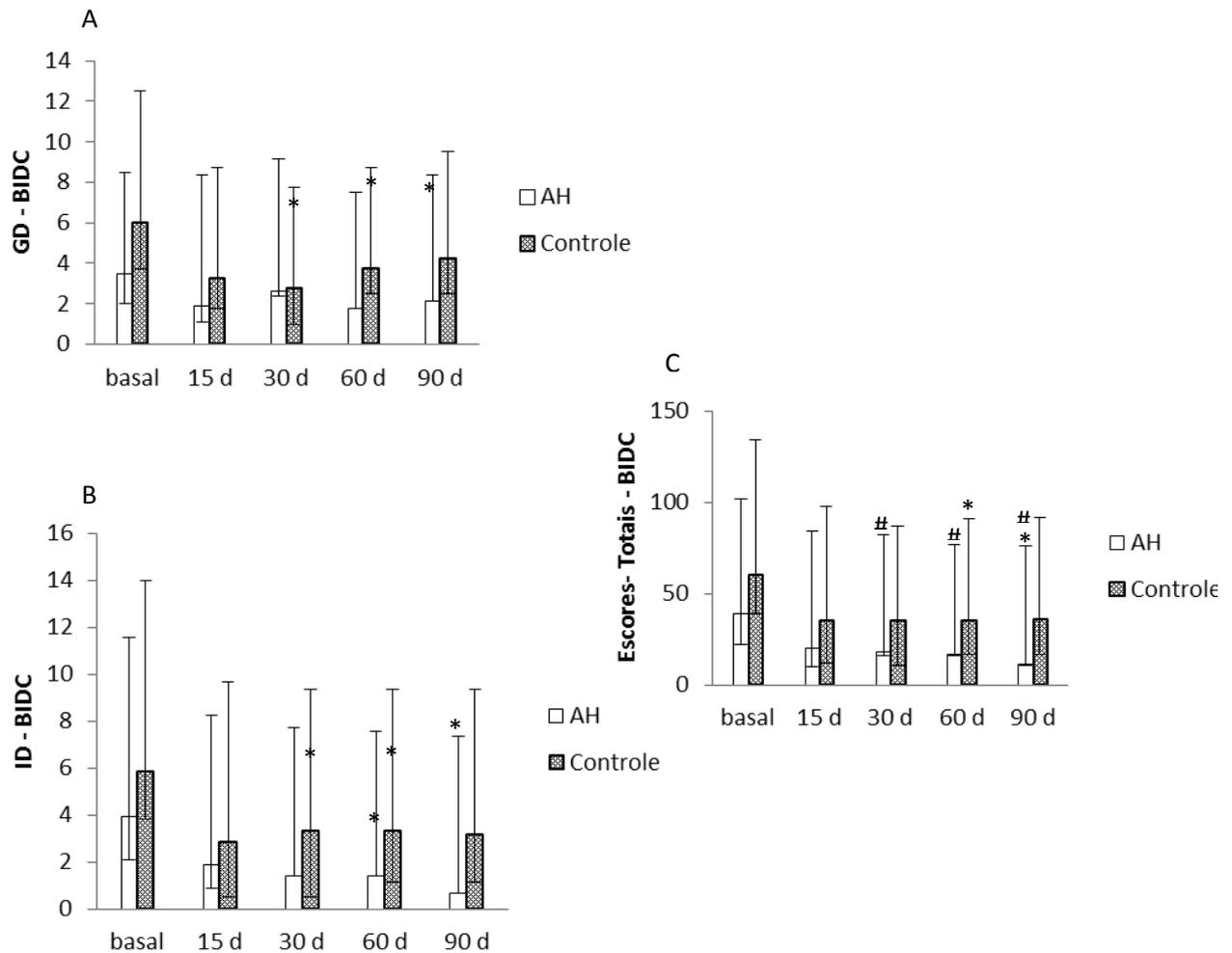
Fig 1. Sequência experimental utilizada nos cães com displasia coxofemoral tratados com ácido hialurônio por via intra-articular (AH) ou com tratamento conservativo tradicional (Controle).



Diferença significativa em relação ao basal (teste de Friedman; $P = 0,0005$: AH; $P = 0,0003$).

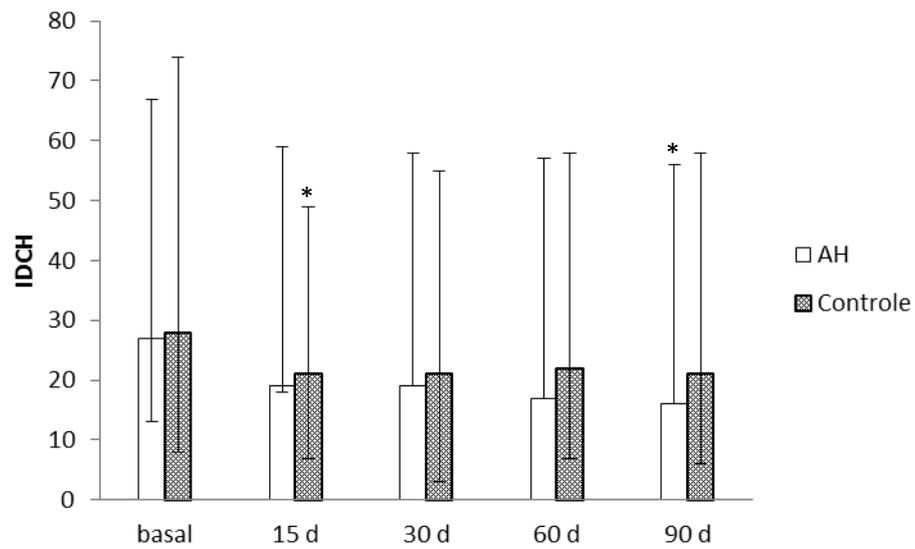
Diferença significativa entre os tratamentos (Mann-Whitney; $P < 0,05$).

Fig. 2. Mediana e intervalos semi-quartis do somatório dos escores avaliados pelo médico veterinário em cães com displasia coxofemoral tratados com ácido hialurônico por via intra-articular (AH, $n=8$) ou com tratamento conservativo tradicional (Controle, $n=7$).



*Diferenças significativas em relação ao basal para o GD-BIDC (teste de Friedman; $P = 0,0402$: AH e $P = 0,005$: Controle); ID-BIDC (Friedman $P = 0,0006$: AH e $P = 0,005$: Controle); Escores totais - BIDC (Friedman $P = 0,0145$: AH e $P = 0,0291$: Controle). # Diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Fig. 3. Mediana e intervalos semi-quartis dos escores avaliados pelo Breve Inventário da Dor Canina (BIDC) referentes à gravidade da dor (GD) (a), interferência da dor (ID) (b) e escores totais (c) de cães com displasia coxofemoral tratados com ácido hialurônico por via intra-articular (AH, n=8) ou com tratamento conservativo tradicional (Controle, n=7).



*Diferenças significativas em relação ao basal (teste de Friedman; $P = 0,0054$: AH e $P = 0,0041$: Controle)

Fig. 4. Mediana e intervalos semi-quartis do somatório dos escores totais avaliados pelo Índice de Dor Crônica de Helsinque (IDCH) de cães com displasia coxofemoral tratados com ácido hialurônico por via intra-articular (AH, $n=8$) ou com tratamento conservativo tradicional (Controle, $n=7$).

**ANEXO 1 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PERANTE ÀS
COMISSÕES INSTITUCIONAIS (CAPI e CEUA)**

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "**HIALURONATO DE SÓDIO EM CÃES PORTADORES DE DISPLASIA COXO-FEMORAL**", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº **1611** e tendo como participante(s) **RENATA NAVARRO CASSU (responsável), GABRIEL DE OLIVEIRA LIMA CARAPEBA, GABRIEL MONTORO NICÁCIO (docente), POLIANA CAVALETI (discente)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 27 de Outubro de 2015.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq

Profª Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

ANEXO 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS GRAUS DA DISPLASIA COXOFEMORAL CONFORME A FCI

A	<ul style="list-style-type: none">• Sem sinais de Displasia Coxofemoral• A cabeça femoral e o acetábulo são congruentes. O espaço articular é estreito. O ângulo de Norberg é em torno de 105°
B	<ul style="list-style-type: none">• Articulação do quadril próxima do normal• A cabeça femoral e o acetábulo são ligeiramente incongruentes e o ângulo de Norberg próximo de 105° ou são congruentes e o ângulo de Norberg inferior a 105°
C	<ul style="list-style-type: none">• Displasia Coxofemoral Leve• A cabeça femoral e o acetábulo são incongruentes, e o ângulo de Norberg é de aproximadamente 100° e/ou ligeiros sinais de osteoartrose no acetábulo ou cabeça e colo femoral
D	<ul style="list-style-type: none">• Displasia Coxofemoral Moderada• Evidente incongruência entre cabeça femoral e acetábulo com subluxação presente. O ângulo de Norberg é de mais de 90°. Presença de sinais de osteoartrose
E	<ul style="list-style-type: none">• Displasia Coxofemoral Severa• Alterações displásicas acentuadas como subluxação ou clara subluxação. O ângulo de Norberg é inferior a 90°. Sinais avançados de osteoartrose

ANEXO 3 - BREVE INVENTÁRIO DE DOR CANINA (BIDC)

Descrição da dor:

Classifique a dor do seu cachorro.

1. Preencha o espaço oval do lado do número que melhor descreve a **pior** dor nos últimos sete dias
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2. Preencha o espaço oval do lado do número que melhor descreve a **menor** dor nos últimos sete dias
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
3. Preencha o espaço oval do lado do número que melhor descreve a **média** de dor nos últimos sete dias
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
4. Preencha o espaço oval do lado do número que melhor descreve como está **agora**
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Descrição da função:

Preencha o espaço oval do lado do número que melhor descreve como, durante os últimos sete dias, a **dor interferiu** no seu cachorro com relação a:

5. **Atividades em geral:**
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
6. **Prazer da Vida**
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
7. **Capacidade de se levantar de quando estava deitado:**
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
8. **Capacidade de andar:**
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
9. **Capacidade de correr**
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

10. Capacidade de subir (por exemplo, escada, passeio “calçada”)

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Impressão geral:

11. Preencha o espaço oval do lado da resposta que melhor descreve a qualidade de vida em geral do seu cachorro **nos últimos sete dias?**

Ruim razoável | M boa Exce e

ANEXO 4 - INDICADOR DE DOR CRÔNICA DE HELSINQUE (IDCH)

Estado geral do/a paciente agora

Marque com um "X" apenas uma resposta para cada pergunta: aquela que melhor explica o estado de seu/sua cachorro/cadela na semana passada.

1. Estado de ânimo está:

muito ativo	ativo	nem ativo, nem abatido	abatido	muito abatido
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. O cachorro/a cadela brinca:

com muita vontade	com vontade	com má vontade	com muita má vontade	não brinca
<input type="checkbox"/>				

3. O cachorro/a cadela chora de dor:

nunca	raramente	às vezes	frequentemente	muito frequentemente
<input type="checkbox"/>				

4a. O cachorro/a cadela anda:

com muita vontade	Com vontade	Com dificuldade	com muita dificuldade	não anda
<input type="checkbox"/>				

4b. O cachorro/a cadela anda:

muito facilmente	facilmente	razoavelmente	dificilmente	muito dificilmente
<input type="checkbox"/>				

5a. O cachorro/a cadela trota:

com muita vontade	Com vontade	Com dificuldade	com muita dificuldade	não trota
<input type="checkbox"/>				

5b. O cachorro/a cadela trota:

muito facilmente	facilmente	difícilmente	muito difícilmente	não trota
<input type="checkbox"/>				

6a. O cachorro/a cadela galopa:

com muita vontade	Com vontade	Com dificuldade	com muita dificuldade	não galopa
<input type="checkbox"/>				

6b. O cachorro/a cadela galopa:

muito facilmente	facilmente	difícilmente	muito difícilmente	não galopa
<input type="checkbox"/>				

7a. O cachorro/ a cadela pula (por exemplo no sofá, no carro):

com muita vontade	Com vontade	Com dificuldade	com muita dificuldade	não pula
<input type="checkbox"/>				

7b. O cachorro/ a cadela pula (por exemplo no sofá, no carro):

muito facilmente	facilmente	difícilmente	muito difícilmente	não pula
<input type="checkbox"/>				

8. O cachorro/ a cadela se deita:

muito facilmente	facilmente	razoavelmente	difícilmente	muito difícilmente
<input type="checkbox"/>				

9. O cachorro/a cadela se levanta de uma posição deitada:

muito facilmente	facilmente	razoavelmente	difícilmente	muito difícilmente
<input type="checkbox"/>				

10. Após um longo descanso, o cachorro/a cadela se move:

muito facilmente	facilmente	razoavelmente	difícilmente	muito difícilmente
<input type="checkbox"/>				

11. Após um esforço físico ou esforço intenso, o cachorro/a cadela se move:

muito facilmente	facilmente	razoavelmente	difícilmente	muito difícilmente
<input type="checkbox"/>				

Obrigado pela sua ajuda!

Observações do veterinário:

ANEXO 5 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ACTA VETERINARIA SCANDINAVICA

Acta Veterinaria Scandinavica

Instructions for authors

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The corresponding author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *Acta Veterinaria Scandinavica* levies an article-processing charge on all accepted Research articles; if the corresponding author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the corresponding author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Acta Veterinaria Scandinavica* prefers [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the '[About Acta Veterinaria Scandinavica](#)' page, and to declare any potential competing interests.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)

- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

TeX/LaTeX users: Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeX stylefile if you use TeX format. During the TeX submission process, please submit your TeX file as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by internal staff as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF. For all TeX submissions, all relevant editable source must be submitted during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the publication procedures.

Publishing Datasets

Through a special arrangement with [LabArchives](#), LLC, authors submitting manuscripts to Acta Veterinaria Scandinavica can obtain a [complimentary subscription to LabArchives](#) with an allotment of 100MB of storage. LabArchives is an Electronic Laboratory Notebook which will enable scientists to share and publish data files in situ; you can then link your paper to these data. Data files linked to published articles are assigned digital object identifiers (DOIs) and will remain available in perpetuity. Use of LabArchives or similar data publishing services does not replace preexisting data deposition requirements, such as for nucleic acid sequences, protein sequences and atomic coordinates.

Instructions on assigning DOIs to datasets, so they can be permanently linked to publications, can be found on the LabArchives website. Use of LabArchives' software has no influence on the editorial decision to accept or reject a manuscript.

Authors linking datasets to their publications should include an [Availability of supporting data](#) section in their manuscript and cite the dataset in their reference list.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *Acta Veterinaria Scandinavica* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Background](#)
- [Methods](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Endnotes](#)
- [References](#)
- [Illustrations and figures](#) (if any)
- [Tables and captions](#)
- [Preparing additional files](#)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- abbreviations within the title should be avoided
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “acknowledgements” section in accordance with the instructions below. Please note that the individual names may not be included in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the type of materials involved, a clear description of all comparisons, and the type of analysis used, to enable replication.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in ['About this journal'](#).

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past three years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.

- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to [ICMJE guidelines](#), An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the

statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, a department chair who provided only general support, or those who contributed as part of a large collaboration group.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

If you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the “acknowledgements” section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first six before adding 'et al.'..

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

An Endnote style file is [available](#).

Examples of the *Acta Veterinaria Scandinavica* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be

highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *Acta Veterinaria Scandinavica* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editor-in-chief@actavetscand.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Acta Veterinaria Scandinavica* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)

- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MP4 (MPEG 4)
 - MOV (Quicktime)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all

parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.

5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *Acta Veterinaria Scandinavica* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

Acta Veterinaria Scandinavica will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.

- All lines and pages should be numbered. Authors are asked to ensure that line numbering is included in the main text file of their manuscript at the time of submission to facilitate peer-review. Once a manuscript has been accepted, line numbering should be removed from the manuscript before publication. For authors submitting their manuscript in Microsoft Word please do not insert page breaks in your manuscript to ensure page numbering is consistent between your text file and the PDF generated from your submission and used in the review process.
- Use the *Acta Veterinaria Scandinavica* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type.

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).