

PERFIL BIOQUÍMICO E IMUNOLÓGICO DE RATOS COM ARTROSE DE JOELHO, TRATADOS POR IONTOFORESE ISOLADA E COM ACIDO L-ASCÓRBICO

Mauricio Ferraz de Arruda

Doutor pelo Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia FCFAR - UNESP, Pós Doutorando pelo Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, Docente do Departamento de Ciências da Saúde do IMES - Instituto Municipal de Ensino Superior de Catanduva. Email: zigomaticoah@ig.com.br.

Maria Rita Pacheco

Maria Rita Pacheco

Lucas Langoni Cassettari

Doutorando do Departamento de Bases da Cirurgia Geral da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu. Email: lu.cassettari@hotmail.com.

Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira

Docente; Doutora do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara IQ - UNESP e do Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia FCFAR – UNESP; Email: vctre@ig.com.br.

RESUMO: Parâmetros bioquímicos e imunológicos são muito utilizados para determinar as características de uma lesão e/ou possíveis alterações metabólicas derivadas de um tratamento. Assim, este artigo representa uma das maneiras à compreensão de uma patologia articular. O presente trabalho traça um perfil do cálcio, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, e interleucina 10, em ratos com artrose frente ao tratamento com iontoforese. Para avaliação desses objetivos realizou-se análise quantitativa. Os resultados demonstraram que no presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem dos íons cálcio e da fosfatase alcalina obtida nas médias finais, exceto dosagem de fosfatase alcalina no grupo IFAA que apresenta menor valor que os demais, embora se analisarmos os animais individualmente nota-se uma tendência na maioria deles por um aumento do índice de cálcio e fosfatase alcalina no grupo C+, se comparado aos grupos C-, IFSF, IFAA, sugerindo assim uma maior mobilização deste íon derivada da busca na tentativa do reparo. Considerando uma análise bioquímica do índice lesional, o resultado da atividade da enzima lactato desidrogenase não mostra uma diferença significativa de valores entre os grupos, apesar de haver também tendências em alguns animais dos grupos IFSF e IFAA em ter redução dessa enzima em detrimento ao grupo C+. Já o resultado imunológico expõe uma diferença significante quanto ao índice de IL-10, onde sua produção foi estimulada no grupo IFAA obtendo a maior média se comparado ao grupo controle patológico C+.

PALAVRAS CHAVE: Lontoforese, Lesão, Bioquímica, Imunologia.

BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PROFILE IN RATS WITH KNEE ARTHROSIS AND TREATED BY ISOLATED IONTOFORESIS AND L-ASCORBIC ACID

ABSTRACT: Biochemical and immunological parameters are employed to determine the characteristics of a lesion and possible metabolic changes by treatment. Current research presents one manner for the understanding of articular pathology and describes a profile for calcium, alkaline phosphatase, dehydrogenase lactate and interleukin 10 in rats with arthrosis when treated with iontoforesis. A quantitative analysis was undertaken and results showed that there was no statistically significant difference in dosage of calcium ions and alkaline phosphatase in final means. Exception occurred in the alkaline phosphatase dosage in the IFAA group with lower rates than the others. If animals are analyzed one by one, a trend for an increase in calcium index and alkaline phosphatase in Group C+ may be perceived in most of them when compared to C-, IFSF and IFAA groups. High mobilization of the ion is suggested, derived

from repair attempts. When a biochemical analysis of the lesion index is taken into account, results from dehydrogenase lactate enzyme activity do not show any significant difference in rates among the groups, in spite of trends in some animals of the IFSF and IFAA groups in reducing the enzyme to the detriment of group C+. Immunological results show a significant difference with regard to IL-10 index. Its production was stimulated by the IFAA group with a higher average when compared to the pathological C+ control group.

KEYWORDS: Iontoforesis; Lesion; Biochemistry; Immunology.

INTRODUÇÃO

A osteoartrose, se caracterizada pela degeneração da articulação, perda de cartilagem e alterações no osso subcondral, afeta mais de 40 milhões de brasileiros, e nos Estados Unidos são mais de 50 milhões de pessoas afetadas (PIZZORNO, 1995), sendo uma das principais causas de incapacidade entre os adultos de sua população (CHUBINSKAYA; HURTIG; RUEGER, 2007). Há uma incidência de 35% nos joelhos, que aparece a partir dos 30 anos, aumentando dramaticamente com a idade e afetando 80% das pessoas acima de 50 anos. Até agora, o tratamento adotado é aliviar a dor tanto o quanto possível, enquanto os tecidos continuam se deteriorando (PIZZORNO, 1995).

Devido ao desgaste normal, os tecidos sofrem constantes estragos, podendo ser restabelecidos ou restaurados. No envelhecimento, doenças ou lesões criam condições inferiores às ideais, com isso os tecidos se estragam mais rapidamente do que podem ser regenerados. Quando o aumento da matriz degenerada por enzimas condrocitárias excede o aumento da nova matriz sintetizada, as cartilagens se degeneram naturalmente, condrócitos em excesso criam substâncias úteis à reposição da cartilagem como também criam enzimas que destroem seus componentes (GOODHEART, 1954). Algumas das ações para o combate a esse tipo de lesão degenerativa que não possui um reparo espontâneo são os transplantes de condrócitos, artroplastias

totais e parciais que podem por vezes ajudar, mas que de maneira invasiva causam grandes danos aos tecidos adjacentes (NAKAYAMA, 2009).

Um dos métodos usuais para pesquisa em osteoartrose, com o preceito de mimetizar esta situação, é o modelo experimental animal utilizando a inoculação intra-articular de (Zy) zymosan, onde este leva de forma determinante a perda de glicosaminoglicanos da matriz, gerando artrite em grau progressivo (FRASNELLI, 2005).

O ácido ascórbico é um dos precursores do colágeno que junto com a elastina e outras estruturas complexas como a trama de glicosaminoglicanas e proteoglicanas constitui a cartilagem (FENSKE, 1986)

Acredita-se que os fatores que influenciam o processo de cicatrização, local ou sistêmico, também influenciam na aparência final da cicatriz, assim os fatores sistêmicos como a desnutrição e falta de vitamina C, inibem a síntese de colágeno, e influenciam em diversos componentes da inflamação (BRASILEIRO, 1998; ROSS; ROWNELL, L. J., 1993).

A obtenção de uma técnica de administração do ácido ascórbico em tecido biológico foi fator substancial do presente trabalho, mostrando como uma terapêutica não invasiva baseada na passagem transdérmica ionizada pode contribuir com possíveis vantagens na resposta de íons cálcio, fosfatase alcalina e enzima lactato desidrogenase.

Buscou-se então no presente estudo avaliar quantitativamente perfil de íons cálcio, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, e interleucina 10, em ratos com artrose frente ao tratamento com iontoforese na presença e ausência de ácido L – ascórbico determinando a variação desses índices nas diferentes aplicações da iontoforese.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CONSTRUÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi aprovado pela comissão de

ética e bem estar animal (CEBEA), protocolo número (015994-07). Foram utilizados 24 ratos (*Norvegicus albinus*, *Wistar*) clinicamente sadios, machos, adultos, da mesma linhagem, de (250-300g) e com aproximadamente 16 a 20 semanas de idade, acondicionados, agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, 3 animais por gaiola, condições ambientais controladas (luminosidade 12h ciclo de claro e escuro) em temperatura controlada, alimentados com ração industrial, e água *ad libitum*. Os grupos experimentais foram divididos em 6 animais por grupo, sendo eles:

Grupo Iontoforese com solução fisiológica (IFSF): Ministrada injeção Zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*, *Sigma Chemical Co.*), seguido de tratamento com iontoforese salina 1ml (SF), (corrente galvânica), 1 miliamper (mA) por 10min, após tricotomia e anti-sepsia, tratamento 1 vez/dia durante 10 dias. **Grupo** Iontoforese com ácido ascórbico (IFAA): Ministrada injeção Zymosan, seguido de tratamento recebendo ácido ascórbico (*MERK®*) por iontoforese (corrente galvânica), a 1 miliamper (mA) por 10min após tricotomia e anti-sepsia na concentração de 100mg/kg em 1ml (SF), 1 vez /dia durante 10 dias. **Grupo** controle positivo (C+): Ministrada injeção Zymosan e sem terapia. **Grupo** controle negativo (C-): sem intervenção.

2.2 INDUÇÃO ANESTÉSICA

Previamente os ratos foram anestesiados proporcionalmente à massa corporal, com uma associação de ketamina (95mg/kg) e xilazina (12mg/kg), injetada por via intraperitoneal, utilizando uma seringa de insulina, para que em seguida passassem pelo protocolo de indução da artrose. Os animais foram contidos conforme o procedimento padrão e a agulha foi introduzida no quadrante inferior direito (evitando linha média) em direção à região cefálica. Aspirou-se um pouco para confirmar que não perfurou vaso sanguíneo ou alça intestinal. Todos os animais foram pesados ao final do experimento.

2.3 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA ARTROSE

A indução da artrose foi feita utilizando 1mg de Zymosan dissolvido em 5µl de solução fisiológica estéril a 0,9%, (ROCHA, 1999) sendo cuidadosamente injetado na interlinha articular do joelho esquerdo, (após tricotomia e anti-sepsia com Polvidona) pela face medial, logo abaixo do ligamento femoro-patelar, tentando evitar extravasamento pelos tecidos adjacentes, de tal sorte que a totalidade da solução permanecesse dentro da cavidade sendo dose única, com finalidade da promoção do processo inflamatório e posterior degradação condral, utilizado para tal, agulha de insulina.

2.4 PROTOCOLOS DE TRATAMENTO

Os animais do grupo IFSF foram utilizados como controle recebendo colocação de um eletrododo (3,0 x 5,0 cm), e um probe aplicador (1,0 x 1,0cm) do eletroestimulador (*Dyadinaction standard* KW eletrônica Campinas – SP - Brasil), respectivamente no dorso do animal e no joelho esquerdo, sendo que o eletrodo do dorso foi conectado ao ânodo (pólo positivo), e o do joelho ao cátodo (pólo negativo) [14]. Entre os eletrodos e a pele dos animais foram interpostas almofadas de gaze umedecidas com 1ml de solução fisiológica, e estas permaneceram nesta posição durante 10 minutos. O eletroestimulador emitiu corrente contínua com amplitude de 1mA, e tal tratamento foi aplicado durante 10 dias.

Os animais do grupo IFAA foram, também, submetidos aos mesmos procedimentos realizados no grupo IFSF, substituindo-se o (SF), encontrado na almofada de gaze sob o eletrodo negativo por 100mg/kg de ácido *L*-ascórbico solubilizado em 1ml de (SF). O tratamento foi aplicado durante 10 dias.

2.5 COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL

Após a indução e tratamentos especificados descritos anteriormente, os animais foram levemente anestesiados com éter levando em consideração o peso corporal, foram coletadas por punção

cardíaca, que possibilita um volume maior de sangue. Imobilizou-se a cabeça do animal pinçando o crânio entre o polegar e o indicador da mão esquerda, e introduziu-se a seringa no mediastino pós-palpação da pulsação cardíaca. Foi possível obter volumes de 0,5 a 1 ml de sangue utilizando seringa e agulha comuns, que foram armazenadas em tubos (*Vacutete Serum Sep Clot Activator* capacidade 4 ml). O plasma e o soro foram separados após centrifugação das amostras a 2500 (RPM) rotações por minuto por 10 minutos em centrífuga de bancada Excelsa® II Modelo 206 BL.

A determinação dos níveis de íons cálcio (Ca^{2+}), fosfatase alcalina (FA), lactato desidrogenase (LDH) no sangue, foram realizadas: i) por reação de íons cálcio com arsenato III formando um complexo de cor azul, e as medidas foram feitas a 650nm, utilizando um fotolorímetro; ii) por reação catalítica da enzima fosfatase alcalina sobre o p-nitrofenilfosfato (incolor), produzindo por hidrólise íons fosfato e p-nitrofenol, que em pH alcalino apresenta cor característica (absorção a 405nm). A velocidade inicial de reação foi determinada pela formação do produto quanto tempo tende a zero; e iii) no caso da enzima lactato desidrogenase, utilizou-se como substrato o piruvato e a coenzima NADH. A reação foi seguida pela formação da coenzima oxidada NAD^+ à 340nm. Todos os ensaios foram feitos com kits *Wiener Laboratórios S.A.I.C.*; todas as leituras foram realizadas no aparelho fotolorímetro *Wiener lab. Metrolab 2300 plus Random Access Clinical Analyzer*.

A análise imunoenzimática foi realizada através da metodologia de citometria de fluxo por tecnologia Luminex. A Tecnologia Luminex™ xMAP envolve um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas onde cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento.

Os kits LINCOpex™ se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 100 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal.

As dosagens foram realizadas em colaboração com empresa a Gênese Produtos Diagnósticos, que possuía o equipamento necessário.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A organização e o preparo dos dados para análise estatística foram realizados utilizando o programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). O método da análise de variância foi realizado e este pode ser visto como uma extensão do teste t de student para amostras independentes.

O Teste de Levene foi aplicado a fim de obter a variabilidade da amostra intra-grupo.

Por fim o teste Tukey também foi aplicado para verificação de quais tratamentos são diferentes, adotando-se $p < 0,05$ como significativo.

3 RESULTADOS

Foram realizadas análises do conteúdo de íons cálcio, atividades da fosfatase alcalina e da lactato desidrogenase. Os dados constam nas tabelas 1 a 4, respectivamente.

Tabela 1 Dados dos valores obtidos para a variável íons cálcio em (mg/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico.

Ratos/ grupos	C-	C+	IFSF	IFAA
1	11.5	10.6	10.5	11.8
2	12.3	10.5	11.0	10.3
3	11.0	15.0	11.0	12.7
4	11.0	16.4	13.6	15.4
5	12.5	11.0	12.0	10.0
6	10.5	13.0	12.5	10.2
Média	11.4	12.7	11.7	11.7
D.P.	0.7	2.4	1.1	2

Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos não foi significativo ao nível de 5% considerando dosagem de cálcio em miligramas por decilitro, ($p > 0,05$). Ou seja, os tratamentos foram iguais $p = 0,36$.

De acordo com o Teste de Levene houve variância constante intra-grupo.

Tabela 2 Dados dos valores obtidos para a variável enzima fosfatase alcalina em (UA/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico.

Ratos/grupos	C-	C+	IFSF	IFAA
1	1986	1143	1436	986
2	1423	1675	1345	1003
3	1754	1718	1132	997
4	1100	1990	1400	1022
5	1452	1543	1463	956
6	1243	1835	1644	950
Média	1493	1650	1403	985,6
D.P.	327	542	167	27

Analisando o R² observou-se que o modelo considerado absorveu 51,42% da variabilidade dos

dados. Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos foi significativo ao nível de 5% considerando dosagem de fosfatase alcalina em unidades arbitrárias por mililitro, ($p < 0,05$). Ou seja, os tratamentos foram diferentes.

Sabendo que os tratamentos são diferentes, realizou-se um teste de Tukey. Verificou-se que todos os tratamentos realizados em relação à variável dosagem de fosfatase alcalina são iguais, com exceção do grupo IFAA que apresentou menor média (985, 667 UA/mL) $p < 0,004$.

De acordo com o Teste de Levene há homogeneidade de variância em relação à variável tratamento, ou seja, há variância constante intra-grupo.

Em relação à tabela 3, analisando o R² observou-se que o modelo considerado não absorveu variabilidade dos dados. Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos não foi significativo ao nível de 5% considerando dosagem de lactato desidrogenase, ($p > 0,05$). Ou seja, os tratamentos foram iguais.

Tabela 3 Dados dos valores obtidos para a variável enzima lactato desidrogenase em (UA/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico

Ratos/ grupos	C-	C+	IFSF	IFAA
1	261	362	300	294
2	305	342	332	298
3	266	371	302	306
4	300	322	298	218
5	309	296	311	332
6	302	289	284	300
Média	290.50	330.33	304.50	291.33
D.P.	21	33	16	38

De acordo com o Teste de Levene não há homogeneidade de variância em relação à variável tratamento, ou seja, rejeitamos a hipótese nula de homocedasticidade, e há variância constante intra-grupo.

A tabela 4 apresenta os dados referentes às análises de interleucina IL-10, em cada rato de cada grupo. E, a média de cada grupo.

Tabela 4 Dados dos valores obtidos para a variável interleucina IL-10 em (pg/mL), individual e média, em relação a cada animal dos grupos C⁺ controle positivo; C⁻ controle negativo; IFSF iontoforese soro fisiológico; IFAA iontoforese ácido ascórbico.

Ratos/ grupos	C-	C+	IFSF	IFAA
1	156.33	61.49	27.40	42.50
2	184.62	139.85	176.55	65.91
3	168.48	20.10	22.22	42.50
4	92.99	52.11	208.37	42.50
5	61.49	101.72	204.46	84.15
6	56.80	92.99	266.39	-----
Média	120.11	78.04	150.89	46.26
Log ₁₀	2.033	1.097	2.014	1.728

Para obter normalidade dos resíduos e satisfazer as suposições do modelo foi necessária a transformação da variável dosagem IL-10, aplicando o logaritmo na base 10, modificando a média.

Analisando o R² observou-se que o modelo considerado absorveu 66,29% da variabilidade dos dados. Neste teste, verificou-se que o tratamento nos ratos foi significativo ao nível de 5% considerando dosagem IL-10, (p-valor < 0,05). Ou seja, os tratamentos foram diferentes, segundo análise estatística baseada nos resultados das dosagens imunológicas. Sabendo que os tratamentos são diferentes, realizou-se um teste de Tukey. Verificou-se que o grupo que se diferencia dos demais é o C⁺, por apresentar menor valor (1.097 pg/mL), enquanto que o C⁻, IFSF e IFAA, podem ser considerados

iguais, com valores respectivos de (2.033, 2.014 pg/mL e 1.728 pg/mL).

De acordo com o Teste de Levene há homogeneidade de variância em relação à variável tratamento, ou seja, há variância constante intra-grupo.

4 DISCUSSÃO

A dosagem de cálcio foi realizada com o intuito de observar o comportamento deste íon frente ao processo de lesão e possível reparo da cartilagem articular, bem como a dosagem fosfatase alcalina por sua íntima relação de equilíbrio com o cálcio.

Segundo Shapiro (2008) a atividade da fosfatase alcalina e do cálcio está ligada à hipertrofia e a mineralização dos condrócitos. Antes do crescimento desta matriz óssea a atividade é baixa, com o crescimento deste tipo celular há uma elevação rápida desta atividade, sua relação com o ácido ascórbico mostra que os condrócitos se tornam degenerados na ausência desta vitamina havendo um alargamento da região da cartilagem calcificada onde ocorre uma recolocação imprópria de matriz óssea.

Deste modo, no presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem dos íons cálcio e da fosfatase alcalina obtidas nas médias finais, exceto dosagem de fosfatase alcalina no grupo IFAA que apresenta menor valor que os demais, embora se analisarmos os animais individualmente, nota-se uma tendência na maioria deles por um aumento do índice de cálcio e fosfatase alcalina nos grupo C⁺, se comparado aos grupos C⁻, IFSF, IFAA, sugerindo assim uma maior mobilização deste íon derivada da busca na tentativa do reparo.

Considerando uma análise bioquímica do índice lesional, o resultado da atividade da enzima lactato desidrogenase não mostra uma diferença significativa de valores entre os grupos, apesar de haver também tendências em alguns animais dos

grupos IFSF e IFAA em ter redução dessa enzima em detrimento ao grupo C+.

A importância da IL-10 como um regulador negativo da inflamação está bem demonstrada no estudo com camundongos deficientes em IL-10 cujo crescimento celular ficou retardado, houve o desenvolvimento de anemia e de doença inflamatória crônica. Com a adição de IL-10 inibiu-se a artrite, enquanto que a neutralização dos anticorpos para IL-10 aumenta a severidade desta patologia (HOOIVELD, 2003). Desta forma os resultados do presente trabalho sugerem um efeito positivo da vitamina C, no período pós-indutório à lesão, e julgamos pertinente supor que a administração de vitamina C possa ser benéfica, mesmo na clínica, quando se trata de doenças crônicas ou degenerativas, já que pode ter agido no sistema imune. No nosso estudo os dados de dosagem de IL-10 mostraram diferença estatisticamente significativa no grupo IFAA em que se obteve maior valor de IL-10, em detrimento ao grupo C+, sugerindo assim um controle inibitório da ação danosa do zymosan.

Esta razão foi também relatada por Hooiveld (2003) que propôs uma intervenção adicional na prevenção da artropatia crônica hemofílica através da ação da interleucina 10 (IL-10). Nesses estudos experimentais os autores relataram que a IL-10 tem demonstrado desempenhar propriedades antiinflamatórias podendo controlar o quadro de sinovite, além de prevenir a produção de citocinas pró-inflamatórias dos monócitos e macrófagos. Em estudo realizado por Vale (2000) a administração IL-10 também mostrou atividade analgésica e melhora da incapacitação articular induzida por zymosan.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A IL-10 demonstrou um aumento no grupo IFAA em detrimento ao C+ sugerindo controle inibitório à lesão e seguindo as análises séricas.

Não houve diferença entre os grupos quanto às dosagens dos íons cálcio e fosfatase alcalina bem

como da atividade da enzima lactato desidrogenase quando se levou em conta a comparação das médias, mas houve contribuição na diferença entre as amostras se comparados alguns animais de forma isolada.

REFERÊNCIAS

- BRASILEIRO, G. et al. **Patologia geral**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1998.
- CHUBINSKAYA, S.; HURTIG, M.; RUEGER, D. C. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. **Int Orthop**, v. 31, n. 6, p. 773-781, dec. 2007
- FENSKE, N. A.; LOBER, C. W. Structural and functional changes of normal aging skin. **J Am Acad Dermatol**, v.15, n. 4 pt. 1, p.571-85, 1986.
- FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther.**, v. 7, n. 2, p. R370-R379, 2005.
- GOODHEART, G. J. A presentation of a new approach to correction of disc lesions. **ACA Journ. Chiro.**, p. 36-37, dec. 1954.
- HOOIVELD, M. J. et al. Initiation of degenerative joint damage by experimental bleeding combined with loading of joint: a possible mechanism of hemophilic arthropathy. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 6, p. 2024-2031, jun. 2003
- NAKAYAMA, J. et al. The effect of fibroblast growth factor-2 on autologous osteochondral transplantation. **Int Orthop.**, v. 33, n. 1, p. 275-280, feb. 2009.
- PIZZORNO, J. Natural Medicine Approach to Treating Osteoarthritis. **Alt & Comp Ther**, v. 1, n. 2, p. 93-95, jan./feb. 1995.
- ROCHA, A. C. et al. Periarthritis pramates gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res.**, v. 48, p. 485-490, 1999.
- ROSS, M. L.; ROWNELL, L. J. **Histologia texto e atlas**. São Paulo, SP: Panamericana, 1993. 928 p.
- SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair: The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **Eur Cell Mater.**, v. 15, p. 53-76, 2008.

Recebido em: 08 junho 2012

Aceito em: 12 julho 2012