

Perfil sérico da fosfatase alcalina após o reparo de defeitos osteocondrais com células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea em coelhos

Luiz Augusto de Souza^{1*}
Benito Juarez Nunes Alves de Oliveira²
Duvaldo Eurides³
Ednaldo Carvalho Guimarães³
Luiz Antônio Franco da Silva²
Lorena Borges Alves³
Ana Flávia Delben Pereira Arruda³
Taís Andrade Dias²

¹Faculdade Anhanguera, Anápolis – GO, Brasil

²Universidade Federal de Goiás – GO, Brasil

³Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil

*Autor para correspondência

Avenida Domingos Lemos do Prado, 452; Q.31; Lt.06; casa 04

CEP 74563-090, Goiânia – GO, Brasil

souza_vet@yahoo.com.br

Submetido em 03/04/2011
Aceito para publicação em 02/08/2011

Resumo

Verificou-se a atividade da fosfatase alcalina sérica em resposta ao reparo de defeitos osteocondrais em vinte e quatro coelhos da raça Nova Zelândia. Distribuídos em três grupos, o controle (GC), o tratado com células mononucleares da medula óssea (GCM) e o que recebeu células mononucleares autólogas com proteína morfogenética óssea (GCM+BMP). Após exposição do sulco troclear da articulação fêmoro-tíbio-patellar esquerda removeu-se um segmento em forma de cunha. O local foi preenchido com enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98%. No GC foi realizada a enxertia óssea, no GCM além do enxerto foi inoculado 2×10^6 células mononucleares e no GCM+BMP foi administrada intra-articularmente o mesmo número de células associadas à $1 \mu\text{g}$ de proteína morfogenética óssea. A resposta osteoblástica foi mensurada por meio da análise sérica de fosfatase alcalina no dia 0 (pré-operatório) 3, 15, 30, 45 após cirurgia, além do acompanhamento por exames radiográficos. Procedeu-se a análise de variância em blocos ao acaso, esquema fatorial e teste de Tukey ($p=0,05$). A média geral do GCM foi superior quando comparada aos outros grupos e as maiores taxas estiveram entre o 15° e 45° dias de pós-operatório. A discrepância dos valores entre os indivíduos do mesmo grupo proporciona dúvidas na veracidade do teste.

Palavras-chave: Células-tronco, Consolidação de fraturas, Marcador ósseo

Abstract

Profile of serum alkaline phosphatase after inoculation of mononuclear cells and bone morphogenetic protein in the repair of osteochondral defects in rabbits. In this study, serum alkaline phosphatase activity was measured in response to the repair of osteochondral defects in twenty-four New Zealand rabbits. The animals were divided into three groups: a control (GC), those treated with bone marrow mononuclear cells (GCM) and those that received mononuclear cells with autologous bone morphogenetic protein (BMP + GCM). After exposing the trochlear groove of the left stifle joint, a wedge-shaped segment was removed. Later, the defect was filled with an osteochondral autograft preserved in 98% glycerin. For the GC group, only the bone graft was performed. For the GCM, in addition to the graft, 2×10^6 seed mononuclear cells were implanted. For the GCM + BMP, the same number of cells, associated with $1 \mu\text{g}$ of bone morphogenetic protein, were intra-articularly administered. The osteoblastic response was measured by analyzing the serum alkaline phosphatase on day 0 (preoperative) 3, 15, 30, and 45 after surgery, and by radiographic examinations. Analysis of variance in randomized blocks, factorial and Tukey's test ($p = 0.05$) were made. The overall mean GCM was superior to the other groups and the highest rates were among the 15th and 45th days postoperatively. The discrepancy in values between individuals of the same group casts doubts on the veracity of the test.

Key words: Bone marker, Fracture healing, Stem cells

Introdução

O uso de métodos laboratoriais que permitam a avaliação do metabolismo ósseo de uma maneira confiável, rápida e prática tem sido um dos objetivos almejados pelos pesquisadores que atuam nessa área, pois o tecido ósseo apresenta uma série de características peculiares, referentes ao processo de regeneração óssea. Apesar de ser um tecido rígido e resistente é frequentemente lesionado e em casos de perda ou dano extenso, a capacidade de regeneração apresenta-se limitada. Nesse caso, técnicas e materiais para auxiliar no reparo de grandes defeitos e métodos para acompanhar o processo cicatricial da lesão tornam-se necessários (LUTOLF et al., 2003).

Como a regeneração do tecido ósseo é determinada pela proliferação celular e deposição de sais de cálcio que restabelecem a arquitetura e funcionalidade do tecido, o processo depende do estado nutricional do osso e de fatores bioquímicos e imunológicos. Quanto à taxa de formação e degradação óssea, esta pode ser estimada por meio de marcadores bioquímicos específicos como as fosfatases alcalinas que indicam a atividade de osteoblastos e osteoclastos no organismo (DOBLARÉ et al., 2004). O aumento da atividade sérica da fosfatase alcalina pode também estar associado às condições de colestase, indução por drogas ou hormônios, animais em crescimento, filhotes e em fêmeas gestantes (DIAL, 1995).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, do inglês *Bone Morphogenetic Proteins*) são um subgrupo da superfamília dos fatores de crescimento de transformação beta (TGF- β) e atuam como fatores sinalizantes na formação de osso e cartilagem (VIDAL et al. 2008). A rhBMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein-2 Human Recombinant*) regula a expressão do mRNA das BMP-2 e -4 em células osteoblásticas, sugerindo sua atuação em fatores autócrinos e parácrinos durante a diferenciação de osteoblastos (GHOSH-CHOUDHURY et al., 2001). Além disso, quando injetada na articulação estimula a síntese de matriz extracelular pelos condrócitos, bem como a formação de colágeno tipo II, proteoglicanos e cartilagem hipertrófica, sendo esta rapidamente substituída por osso, em um processo que mimetiza a ossificação endocondral (JORGENSEN et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade sérica da fosfatase alcalina em coelhos após o reparo de defeitos osteocondrais com aplicação intra-articular de células mononucleares da medula óssea e associação de células mononucleares autólogas com proteína morfogenética óssea.

Material e Métodos

Foram colhidas 24 articulações fêmoro-tíbio-patelares de 12 cadáveres de coelhos adultos em matadouro. Após exposição da articulação mensurou-

se uma área de $\pm 0,4\text{cm}$ largura x $1,0\text{cm}$ comprimento, na superfície articular, sobre o sulco troclear femoral e na sequência a região foi removida por um disco diamantado acoplado a uma micro-retifica. O material foi armazenado em frascos contendo solução de glicerina a 98%, à temperatura ambiente durante um período mínimo de 30 dias.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em 24 coelhos adultos, machos da raça Nova Zelândia, com peso entre 3,0kg a 4,5kg. Distribuídos aleatoriamente em três grupos, o controle (GC), o tratado com células mononucleares autólogas da medula óssea (GCM) e o grupo que recebeu as mesmas células associadas à proteína morfogenética óssea (GCM+BMP). Após jejum hídrico e sólido de duas e quatro horas, respectivamente os animais foram submetidos à medicação anestésica com 30,0mg/kg de cloridrato de cetamina e 5,0mg/kg de cloridrato de xilazina por via intramuscular (IM). Na sequência, foram realizadas tricotomias nas regiões da articulação escápulo-umeral, fêmoro-tíbio-patelar esquerda e da região cervical para colheita da medula, realização do procedimento cirúrgico e colheita do sangue através da jugular externa para posterior análise sérica da fosfatase alcalina, respectivamente.

A colheita da medula óssea foi realizada por meio de uma agulha metálica de Rosenthal 16G heparinizada inserida na região do tubérculo umeral. Foram aspirados 2,0mL de medula óssea íntegra empregando seringa contendo 0,1mL de solução estéril heparinizada (5000U/mL). No laboratório as amostras foram acondicionadas em tubos Falcon 15mL e diluídas (volume/volume, 1:1) em solução salina tamponada (PBS). Posteriormente, as soluções foram lentamente depositadas sobre 2mL do gradiente de densidade Ficoll-Paque® Plus 1.077g/mL conforme recomendado por Boyüm (1968).

Em seguida, o sangue e o gradiente ficoll foram centrifugados a 495 x g por 30 minutos a 15°C e as células mononucleares colhidas com pipeta de Pasteur na interface entre o plasma e o ficoll. Duas lavagens do sedimento celular foram realizadas utilizando 10mL de PBS, e uma terceira lavagem com 10mL de meio de cultivo modificado de Dulbecco com baixa glicose (DMEM) e suplementado com soro fetal bovino a 10%.

Em todas as lavagens se realizou centrifugação a 493 x g por 10 minutos a 4°C.

A fração celular foi ajustada para 2×10^6 células mononucleares em 0,5mL, em seguida armazenadas em tubos de Eppendorff para aplicação no trans-operatório do GCM. No entanto no grupo GCM+BMP essas células receberam adição a 1µg de rhBMP-2 diluída em ácido acético 20mM.

Com o animal em decúbito dorsal foi realizada uma incisão na região parapatelar lateral do membro pélvico esquerdo, seguida de divulsão do tecido subcutâneo, exérese do retináculo lateral e incisão da cápsula articular. Em seguida a patela foi deslocada medialmente para exposição do sulco troclear femoral e com um paquímetro graduado mensurou uma área de 0,4cm de largura x 1,0cm de comprimento para ser removida. Na remoção empregou-se disco diamantado acoplado a uma micro-retifica sob refrigeração com gotejamento de solução fisiológica. O disco foi angulado em torno de 30° no intuito de remover a fração óssea em forma de cunha, além de preservar as trócleas, medial e lateral.

No grupo controle (GC) o local foi preenchido com enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98% previamente hidratado com solução fisiológica a 0,9%. Com a patela reposicionada sobre o sulco troclear procedeu-se à sutura capsular e a redução do espaço subcutâneo com fio poliglactina 910, nº 4-0 em padrão de sutura pontos simples isolados e ziguezague, respectivamente. A dermorráfia foi realizada com mononáilon nº 3-0 e sutura simples isolada.

Ao contrário do grupo controle, além do enxerto osteocondral alógeno, as unidades experimentais do grupo GCM receberam à administração intra-articular de 0,5mL com 2×10^6 células mononucleares autólogas da medula óssea e o grupo GCM+BMP o mesmo número de células, porém associadas com 1µg de rhBMP-2 pela mesma via.

Para o acompanhamento da fosfatase alcalina sérica foram colhidos de cada animal por venipunção da jugular externa 2mL de sangue no dia zero (dia do procedimento), 3°, 15°, 30° e 45° dia de pós-operatório. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos sem anticoagulante e mantidas até a completa

coagulação. Posteriormente centrifugadas a 720g por dez minutos para obtenção do soro e imediatamente determinou-se em cada amostra a concentração sérica total da fosfatase alcalina (método Cinético Optimizado – IFCC) em analisador automático utilizando kit comercial. Além disso, exames radiográficos foram realizados a fim de permitir o estudo comparativo entre os resultados encontrados. As imagens foram obtidas no 30° e 45° dia de pós-operatório.

Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados e procedeu-se à análise de variância em esquema fatorial com três tratamentos e cinco épocas. O procedimento de transformação logarítmica dos dados foi utilizado considerando-se que a distribuição de probabilidade se afastou da normal. Na comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey, sendo adotada a significância nominal de 5% ($p=0,05$). A variável analisada foi a fosfatase alcalina (FA) e as análises foram feitas no programa computacional SISVAR 4.0 (FERREIRA, 2000), adotando-se procedimentos descritos em Banzato e Kronka (1989).

Resultados e Discussão

O nível plasmático de fosfatase alcalina osso-específica reflete com precisão atividade osteoblástica e pode ser útil na rotina clínica para o acompanhamento da cicatrização de fraturas e o monitoramento de tumores ósseos (LEUNG et al., 1993). Embora a atividade da fosfatase alcalina não tenha sido completamente elucidada, a metodologia empregada no presente estudo demonstrou que ocorreram variações substanciais nos níveis séricos desta enzima. Sabe-se que o método de quantificação sérica não é tecido-específico e a existência de produção extra-óssea, frequentemente de origem hepática, não pode ser descartada. Todavia, as isoformas hepáticas e ósseas circulantes representam mais de 90% e estão em quantidades equivalentes, apresentando reatividade cruzada em torno de 15% (VIEIRA, 1999).

A mensuração da concentração sanguínea da fosfatase alcalina teve a finalidade precípua de auxiliar na avaliação da taxa de formação óssea. Como as isoenzimas da fosfatase alcalina osso-específica estão localizadas na membrana plasmática do osteoblasto,

grandes quantidades podem ser secretadas quando a matriz óssea encontra-se ativa (FREEMONT, 1998). Além disso, a mesma pode difundir-se pelo sangue na forma de um dímero (GUYTON; HALL, 1997) e a concentração sanguínea ser considerada um bom indicador da taxa de formação óssea, justificando a metodologia empregada.

Os níveis séricos encontrados nos grupos variaram de 10,9 a 524 U/L, tal discrepância pode ser explicada pela constante modificação do tecido em diferentes fases da formação do calo ósseo (DOBLARÉ et al., 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008) e possivelmente pela influência da fosfatase hepática e intestinal (Tabela 1).

TABELA 1: Médias de fosfatase alcalina sérica em U/L de coelhos observadas nos grupos controle (GC), células mononucleares (GCM) e células mononucleares associadas à proteína morfogenética óssea (GCM+BMP). Nos períodos 0, 3, 15, 30 e 45 dias de pós-operatório submetidos à cirurgia de reparo do sulco troclear femural com enxerto osteocartilagenoso alógeno.

Tratamentos	Valor Referência	
	fosfatase alcalina sérica em U/L	Médias
Controle		83,36 ab
Células mononucleares	70-145	116,68 a
Células mononucleares+ BMP		64,97 b

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

Mesmo após realizar diversas pesquisas ainda não existe um consenso sobre os valores normais da fosfatase alcalina sérica em coelhos. No entanto, Quesenberry (1994), apontou valores limítrofes entre 70 a 145U/L o que condiz com a média geral dos grupos avaliados de 88,34U/L. Analisando as médias dos dias, notou-se que a média do dia zero (pré-operatório) foi estatisticamente superior. Tal fato é explicado pela elevada atividade sérica da FA de origem hepatobiliar que pode ser apresentada após a utilização de drogas indutoras (MEYER et al., 2000). Como apenas no dia zero os

animais estavam sobre efeito anestésico para realização dos procedimentos cirúrgicos e uma das drogas indutoras utilizadas foi a cetamina, o fármaco pode ter exercido influência sobre esses níveis. Segundo Fantoni e Cortopassi (2002) a cetamina é altamente solúvel em lipídeos e rapidamente absorvida e distribuída para os tecidos após a administração intramuscular, além de apresentar biotransformação hepática o que poderia ter promovido o aumento significativo da enzima fosfatase.

A análise da FA de cada grupo foi mensurada a fim de avaliar a resposta osteoblástica conforme realizado em humanos por Farley e Stilt-Coffing (2001). Durante a análise dos dados nos cinco momentos pré-estabelecidos os valores séricos foram maiores nos animais do grupo GCM, seguido pelo GC e GCM+BMP que em tese, apresentou resposta menos intensa (Figura 1).

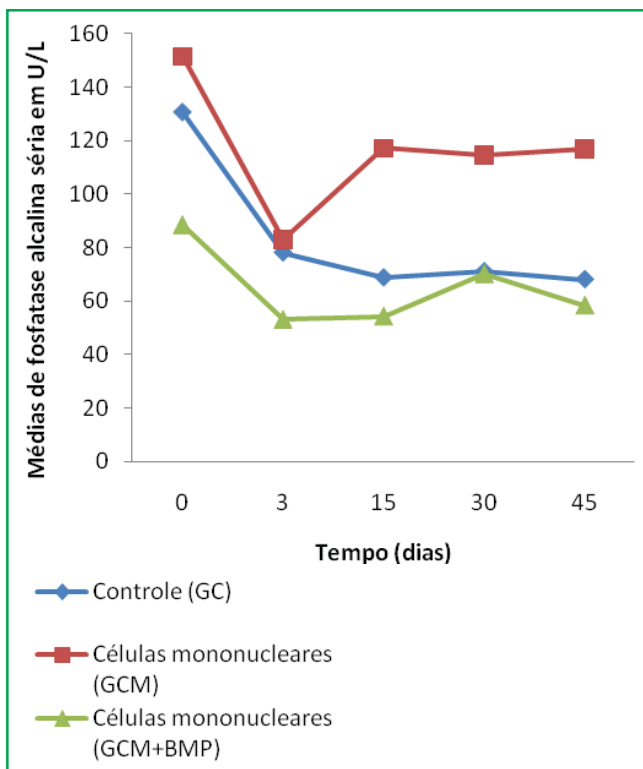


FIGURA 1: Médias de fosfatase alcalina sérica em U/L em cinco momentos pré-estabelecidos 0, 3, 15, 30 e 45 dias após a cirurgia de reparo do sulco troclear femoral com enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células-tronco mesenquimais e proteína morfogenética óssea.

Sendo a fosfatase alcalina um indicador de atividade osteoblástica durante a reparação de fratura,

o aumento dos níveis séricos concomitante à formação do calo ósseo sugerem deposição de matriz óssea (KOMNENOU et al., 2005), porém a grande variação dos valores entre os indivíduos remete a graus variados de atividade e pode diminuir a importância de tais resultados. Conforme Carano e Filvaroroff (2003) e Doblaré et al. (2004), o calo ósseo encontra-se formado ao final da segunda ou terceira semana e a partir deste período ocorre diminuição da atividade osteoblástica. Assim, quando se comparou às médias dos grupos em relação aos períodos avaliados não foi possível confirmar esse dado, pois os valores séricos da fosfatase alcalina não apresentaram diferenças estatísticas.

Como o grupo tratado com células mononucleares apresentou média superior quando comparada aos outros grupos, tal fato poderia justificar uma melhor resposta osteoblástica frente à lesão óssea encontrada. Porém, os achados radiográficos (Figura 2) não corroboram com os resultados expressos pela fosfatase alcalina sérica mensurada, pois o perfil da enzima indica que os resultados encontrados no GC foram superiores ao do GCM+BMP.

Devido à complexidade das respostas celulares aos diferentes estímulos é difícil determinar a função exata de marcadores bioquímicos de metabolismo ósseo, como a fosfatase alcalina total, osteocalcina e os pró-peptídeos do colágeno tipo I. Recentemente demonstrou-se que o perfil destas enzimas varia durante o reparo ósseo e em função do tipo de material implantado (LUTOLF et al., 2003). Segundo Solheim (1998), as proteínas morfogenéticas ósseas são fatores que estimulam a formação óssea, por ativarem as células-tronco mononucleares a se diferenciarem em osteoblastos. Neste contexto, esperava-se que a proteína morfogenética óssea em associação com as células mononucleares estimulasse maior liberação de fosfatase alcalina sérica que os outros grupos, o que não foi constatado já que as médias dos grupos GCM foram superiores as do grupo GCM+BMP.

Entretanto, apesar do valor numérico da média do grupo GCM ter sido superior, a análise estatística não acusou diferença significativa. Isto pode estar associado à grande variação dos resultados apresentados dentro de cada tratamento, o que produziu um coeficiente de

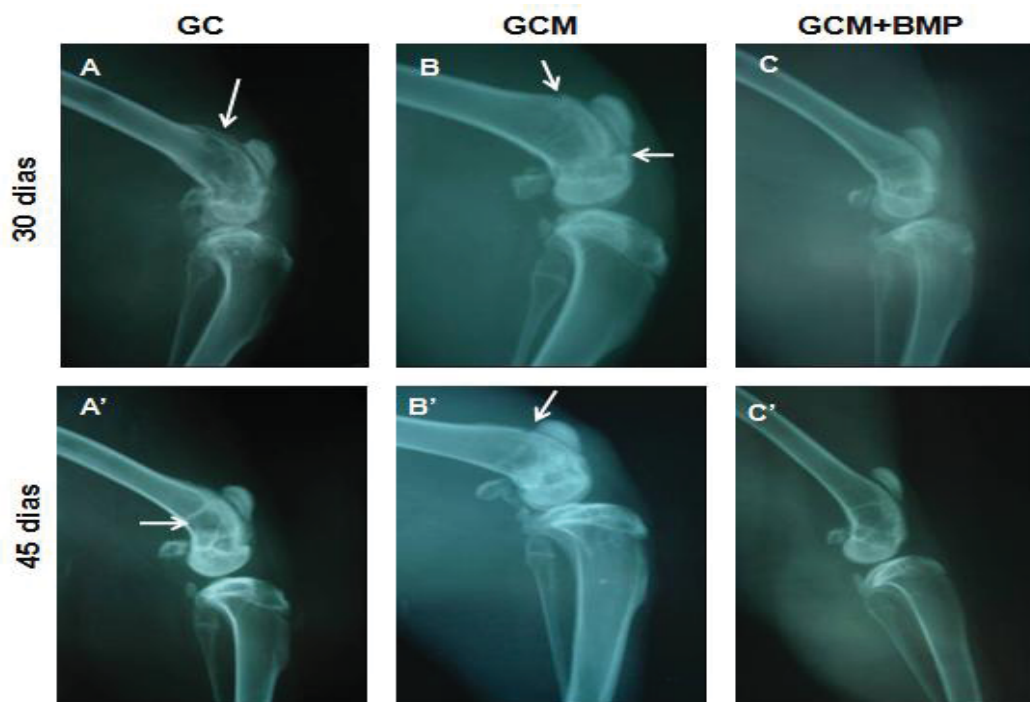


FIGURA 2: Aspectos radiográficos da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos na posição médio lateral após 30 e 45 dias de pós-operatório. Aos 30 dias notar em (A) animal do grupo controle com reação óssea exacerbada (seta), rarefação do osso subcondral (abaixo do enxerto), perda da linha de cartilagem, presença de osteófitos nas bordas trocleares e nos sesamóides. Observar também em (B) o exame radiográfico de um animal tratado com células mononucleares com aspecto articular normal, porém com o enxerto ainda não totalmente osteointegrado (seta). Em (C) animal do GCM+BMP, aspecto radiográfico normal da articulação fêmoro-tíbio-patelar. Aos 45 dias de (PO) podemos verificar respectivamente para os grupos GC, GCM e GCM+BMP: (A') persistência da rarefação óssea dos côndilos femurais com espaçamento entre as trabéculas ósseas (seta), (B') pequena depressão no local onde realizou o enxerto osteocondral (seta) e esclerose do osso subcondral e em (C') aspecto normal da articulação, com o enxerto integrado no leito receptor e sem sinais de osteoartrose.

variação relativamente alto ($CV = 69,91\%$). De acordo com Banzato e Kronka (1989), experimentos que apresentam variabilidade relativamente alta dificultam a detecção de diferenças significativas entre as médias.

Após a análise dos resultados da FA e das imagens radiográficas, podemos concluir que a variação expressiva nos níveis séricos da fosfatase alcalina em coelhos após o reparo de defeitos osteocondrais com aplicação intra-articular de células mononucleares da medula óssea e associação de células mononucleares autólogas com proteína morfogenética óssea não permite recomendar o método para determinação da atividade osteoblástica.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro

e aos Técnicos e Residentes do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

Referências

- BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: UNESP, 1989. 247 p.
- BOYÜM, A. Isolation of leukocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, Oslo, Suppl. 97, p. 31-50, 1968.
- CARANO, R. A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 8, n. 21, p. 980-989, 2003.
- DIAL, S. M. Clinicopathologic evaluation of the liver. **The Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v. 25, p. 257-273, 1995.
- DOBLARÉ, M.; GARCI, J. M.; GOMÉZ, M. J. Modelling bone tissue fracture and healing a review. **Engineering Fracture Mechanics**, Oxford, v. 71, p. 1809-1840, 2004.

- FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. 167 p.
- FARLEY, J. R.; STILT-COFFING, B. Apoptosis may determine therelease of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cells. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 68, p. 43-62, 2001.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FREEMONT, A. J. Bone. **Current Orthopaedics**, Edinburgh, v. 12, p. 181-192, 1998.
- GHOSH-CHOUHURY, N.; CHOUHURY, G. G.; HARRIS, M. A.; WOZNEY, J.; MUNDY, G. R.; ABOUD, S. R.; HARRIS, S. E. Autoregulation of mouse BMP-2 gene transcription is directed by the proximal promoter element. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 286, p. 101-108, 2001.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1013 p.
- JORGENSEN, C.; NOËL, D.; APPARAILLY, F.; SANY, J. Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 60, p. 305-309, 2001.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. S. F. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.
- KOMNENOU, A.; KARAYNNOPOULOU, M.; POLIZOPOULOU, Z. S.; CONTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, p. 35-38, 2005.
- LEUNG, K. S.; FUNG, K. P.; SHER, A. H.; LI, C. K.; LEE, K. M. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v. 75-B, n. 2, p. 288-292.
- LUTOLF, M. P.; WEBER, F. E.; SCHMOECKEL, H. G.; SCHENSE, J. C.; KOHLER, T.; MÜLLER, R.; HUBBELL, J. A. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 5, p. 513-518, 2003.
- MEYER, J.; EMBERT, H.; COLES, L. J. **Medicina de laboratório veterinária**. São Paulo: Roca, 2000. 320 p.
- QUESENBERRY, K. E. Rabbits. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. (Ed.). **Saunders manual of small animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. 1346 p.
- SOLHEIM, E. Osteoinduction by demineralized bone. **International Orthopaedics**, Berlin, v. 22, n. 5, p. 335-342, 1998.
- VIDAL, M.; ROBINSON, S. O.; LOPEZ, M. J.; PAULSEN, D. B.; BORKHSENIUS, O.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 37, p. 713-724, 2008.
- VIEIRA, J. G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 43, p. 415-422, 1999.