



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Efeitos comparativos de vitamina C sobre os efeitos dos anestésicos locais ropivacaína, bupivacaína e lidocaína em condrócitos humanos



Jun Tian* e Yan Li

Departamento de Anestesiologia, Hospital Central Xinxiang da Província de Henan, Xinxiang, China

Recebido em 16 de janeiro de 2015; aceito em 26 de janeiro de 2015

Disponível na Internet em 28 de novembro de 2015

PALAVRAS-CHAVE

Condrócitos;
Vitamina C;
Anestésicos locais;
Ropivacaína;
Bupivacaína;
Lidocaína

Resumo

Justificativa: Injeções de anestésicos locais por via intra-articular são comumente usadas para melhorar a analgesia no período pós-operatório de cirurgia ortopédica como artroscopia. No entanto, relatos recentes de complicações graves devido ao uso de anestésico local por via intra-articular causou preocupações.

Objetivos: O objetivo do estudo foi avaliar o uso de vitamina C para reduzir os efeitos adversos dos anestésicos mais comumente usados (ropivacaína, bupivacaína e lidocaína) sobre condrócitos humanos.

Métodos: A viabilidade dos condrócitos após a exposição à bupivacaína a 0,5% ou ropivacaína a 0,75% ou lidocaína a 1,0% e/ou vitamina C em doses de 125, 250 e 500 μ M foi determinada pelo ensaio Vivo/Morto e coloração com anexina v. Os níveis de expressão das caspases 3 e 9 foram avaliados com o uso de anticorpos pela técnica *Western blotting*. Citometria de fluxo foi feita para analisar a geração de espécies reativas ao oxigênio.

Resultados: Na exposição aos anestésicos locais, condrotoxicidade foi encontrada na seguinte ordem: ropivacaína < bupivacaína < lidocaína. A vitamina C efetivamente melhorou a redução da viabilidade dos condrócitos e diminuiu os níveis elevados de apoptose após a exposição à anestesia. Em doses mais altas, a vitamina C foi eficiente para reduzir a geração de espécies reativas ao oxigênio e assim regular negativamente a expressão das caspases 3 e 9.

Conclusões: Observamos que a vitamina C foi eficaz na proteção dos condrócitos contra a agressão tóxica dos anestésicos locais ropivacaína, bupivacaína e lidocaína.

© 2015 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

* Autor para correspondência.

E-mail: juntian2004@gmail.com (J. Tian).

KEYWORDS

Chondrocytes;
Vitamin C;
Local anesthetics;
Ropivacaine;
Bupivacaine;
Lidocaine

Comparative effects of vitamin C on the effects of local anesthetics ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine on human chondrocytes

Abstract

Background: Intra-articular injections of local anesthetics are commonly used to enhance post-operative analgesia following orthopedic surgery as arthroscopic surgeries. Nevertheless, recent reports of severe complications due to the use of intra-articular local anesthetic have raised concerns.

Objectives: The study aims to assess use of vitamin C in reducing adverse effects of the most commonly employed anesthetics – ropivacaine, bupivacaine and lidocaine – on human chondrocytes.

Methods: The chondrocyte viability following exposure to 0.5% bupivacaine or 0.75% ropivacaine or 1.0% lidocaine and/or vitamin C at doses 125, 250 and 500 μM was determined by Live/Dead assay and annexin v staining. Expression levels of caspases 3 and 9 were assessed using antibodies by Western blotting. Flow cytometry was performed to analyze the generation of reactive oxygen species.

Results: On exposure to the local anesthetics, chondrotoxicity was found in the order ropivacaine < bupivacaine < lidocaine. Vitamin C effectively improved the reduced chondrocyte viability and decreased the raised apoptosis levels following exposure to anesthesia. At higher doses, vitamin C was found efficient in reducing the generation of reactive oxygen species and as well down-regulate the expressions of caspases 3 and 9.

Conclusions: Vitamin C was observed to effectively protect chondrocytes against the toxic insult of local anesthetics ropivacaine, bupivacaine and lidocaine.

© 2015 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Os anestésicos locais são comumente usados em várias situações clínicas para a prevenção ou o alívio da dor sintomática. Durante a prática da ortopedia, são administrados por muitas vias, como espinal, epidural ou intra-articular, para o alívio da dor no pós-operatório ou como uma modalidade no tratamento de osteoartrite. Vários estudos clínicos demonstraram que a injeção intra-articular de anestésicos locais tem taxas elevadas de sucesso quando administrada para analgesia no pós-operatório.¹⁻³

A preocupação com os efeitos prejudiciais dos anestésicos locais veio a público quando vários estudos de caso demonstraram toxicidade grave em cartilagem e condrólise após infusões de anestésico local na articulação glenoumeral após artroscopia.⁴⁻⁸ Como as evidências de condrotoxicidade devido a anestésicos locais estão aumentando, pesquisas sobre o uso de outras substâncias para inibir ou reduzir a toxicidade estão sendo feitas. Em cirurgias ortopédicas, além dos efeitos dos anestésicos locais, a limitação do potencial de cura da cartilagem articular hialina também é problema bem conhecido.⁹

Entre os anestésicos locais que são usados com mais frequência para o alívio da dor, lidocaína e bupivacaína são membros do grupo amida, mas o tempo de ação da lidocaína é cerca de metade daquele de bupivacaína.¹⁰ Ropivacaína é um anestésico local do tipo amino-amida, de ação prolongada, que pertence ao grupo das pipercoloxilidase e é um substituto promissor para bupivacaína para raqui-anestesia.¹ Contudo, estudos recentes demonstraram os efeitos deletérios desses anestésicos sobre os condrócitos.¹¹⁻¹⁴ Lo et al.¹⁴

mostraram que bupivacaína, ropivacaína e lidocaína apresentam um efeito negativo de forma dependente da dose e da duração sobre a viabilidade dos condrócitos.

Estudos *in vitro* mostraram que lidocaína e bupivacaína podem ter efeitos citotóxicos sobre os neurônios e miócitos. A morte celular ocorre tanto por necrose quanto por apoptose.^{15,16} Em condrócitos, a exposição a esses anestésicos também leva à morte celular por apoptose e necrose de uma forma dependente da dose e da duração.^{1,17} Fedder et al.¹⁸ relataram que a exposição à ropivacaína, lidocaína e bupivacaína reduziu a viabilidade dos fibroblastos, o que está ligado à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Apoptose é um processo altamente regulado, diferente de necrose, que ocorre em resposta a trauma, toxinas, citocinas e agentes patogênicos.^{19,20} Portanto, a inibição da apoptose de condrócitos foi descrita como um meio potencial para reduzir a perda de condrócitos.^{20,21}

As vitaminas são consideradas vitais. A vitamina C, uma substância exógena solúvel em água,²² é um cofator na construção de vasos sanguíneos e assume o papel de um antioxidante,²³ atua como um doador de elétrons e agente redutor e, assim, impede a oxidação de lipídios, proteínas e DNA.²⁴ Há um reconhecimento crescente da importância de fatores nutricionais para a manutenção da saúde óssea e articular.²⁵ A matriz óssea contém mais de 90% das proteínas, como colágeno,²⁶ e a vitamina C é um cofator essencial para a formação de colágeno e síntese de hidroxiprolina e hidroxilisina.²⁷ Portanto, a vitamina C pode ajudar no fortalecimento dos ossos e prevenir fraturas. Deficiência de vitamina C induzida experimentalmente em animais leva ao dano de massa óssea, cartilagem e tecido conjuntivo.²⁸

Um estudo com acompanhamento por 17 anos conduzido por Sahni et al.²⁹ demonstrou que a suplementação de vitamina C diminui o risco de fratura de quadril e osteoporose. Por conseguinte, considerando os efeitos da vitamina C, o presente estudo investigou se a vitamina C inibe a perda de condrócitos e protege a cartilagem contra os efeitos adversos de anestésicos locais.

Métodos

Produtos químicos e células

Condrócitos humanos normais foram adquiridos da Promocell, Alemanha, e colocados em meio de cultura, sob condições laboratoriais padrão (atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 °C). A cultura de condrócitos em monocamada há muito é usada como um método para a avaliação *in vitro* de respostas celulares ao tratamento. As células na passagem 5 foram semeadas a uma densidade de 10³ células/cm² em placas de 96 poços e cultivadas até 75-80% de confluência. Ao atingir a confluência desejada, as células foram expostas aos anestésicos locais. Todos os produtos químicos usados no estudo foram obtidos de Sigma-Aldrich, MO, EUA; caso contrário, eles são mencionados.

Exposição anestésica

Os condrócitos foram expostos durante uma hora a 1 mL das soluções dos anestésicos locais bupivacaína a 0,5% ou ropivacaína a 0,75% ou lidocaína a 1,0%.^{21,30} Todas as amostras foram tratadas com o uso do mesmo protocolo. Especificamente, o meio de cultura foi aspirado; 1 mL de soro fisiológico normal a 0,9% ou de anestésico foi adicionado a cada poço; as amostras foram incubadas em CO₂ a 5% e a 37 °C por 60 minutos; e a solução de tratamento foi aspirada e o meio de cultura fresco foi adicionado. As amostras foram devolvidas ao incubador e a viabilidade dos condrócitos foi medida 24 horas mais tarde. Em experiências separadas, logo após a exposição à anestesia, as células foram incubadas em meio fresco suplementado com vitamina C (125 ou 250 ou 500 μM) por 24 horas e, em seguida, as células foram avaliadas para a viabilidade.

Análise de apoptose

Os condrócitos expostos aos anestésicos e/ou vitamina C foram lavados com PBS e usados para a análise de viabilidade celular. Para medir a apoptose, o ensaio para a viabilidade celular Vivo/Morto (kit de viabilidade celular Live/Dead, Invitrogen) foi feito. O ensaio detecta a atividade da esterase intracelular e a integridade da membrana plasmática para avaliar a viabilidade das células. Os condrócitos, células tratadas ou não tratadas com anestesia e/ou vitamina C, foram corados com 5 μmol/L de homodímero de etídio e 5 μmol/L de calceína-AM e incubados a 37 °C por 30 minutos. As células foram então analisadas sob um microscópio de fluorescência, Nikon Labophot-2. Os condrócitos vivos retêm a calceína-AM, um corante polianiônico não fluorescente, e produzem uma fluorescência verde por meio da conversão (esterase) enzimática. Subsequentemente, o homodímero

de etídio entra nas membranas danificadas das células mortas, liga-se aos ácidos nucleicos e dá origem a uma fluorescência vermelha.

A apoptose também foi detectada por mensuração da perda de assimetria da membrana ao se avaliarem as propriedades de ligação da anexina v. A propriedade de ligação da anexina v foi avaliada com o uso do kit de coloração de anexina v (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos antianexina v foram conjugados com um corante de fluoresceína isotiocianato (FITC). Resumidamente, 1 × 10⁶ células foram expostas à bupivacaína ou ropivacaína ou lidocaína por uma hora após o tratamento com vitamina C, ou apenas aqueles expostos aos anestésicos foram submetidos à coloração com anexina v. As células foram lavadas em PBS, suspensas novamente em tampão de ligação de 100 μL, com anticorpo antianexina v conjugado com FITC, e depois analisadas com citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences).

Western blot

Para saber se a ativação da caspase estava envolvida na iniciação da apoptose após a exposição aos anestésicos locais, uma análise adicional com o método *Western blot* foi feita para determinar a expressão das caspases 3 e 9, com o uso dos respectivos anticorpos (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Para o isolamento das proteínas celulares totais, as células foram lisadas em tampão de lise celular (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) e processadas de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram então fracionadas por SDS-PAGE, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose, marcadas com seus respectivos anticorpos e detectadas por quimioluminescência avançada (GE Healthcare). Os sinais da faixa de outras proteínas foram normalizados para os de β-actina com o uso de anti-β-actina em diluição de 1:2000 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA).

Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A geração de ERO intracelular foi medida por citometria de fluxo, com o uso de coloração com 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). DCFH-DA é um composto não fluorescente que pode ser enzimaticamente convertido em DCF, um composto altamente fluorescente na presença de ERO. Após a exposição ao anestésico e/ou vitamina C, as células foram adicionalmente incubadas com DCFH-DA (10 μM) por 30 minutos a 37 °C no escuro. Subsequentemente, as células foram lavadas duas vezes com PBS e a intensidade da fluorescência foi medida por citometria de fluxo.³¹

Análise estatística

Os resultados são representados como média ± DP. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, conforme determinado por uma análise de variância (Anova). As análises foram feitas com a versão 17.0 do programa estatístico SPSS.

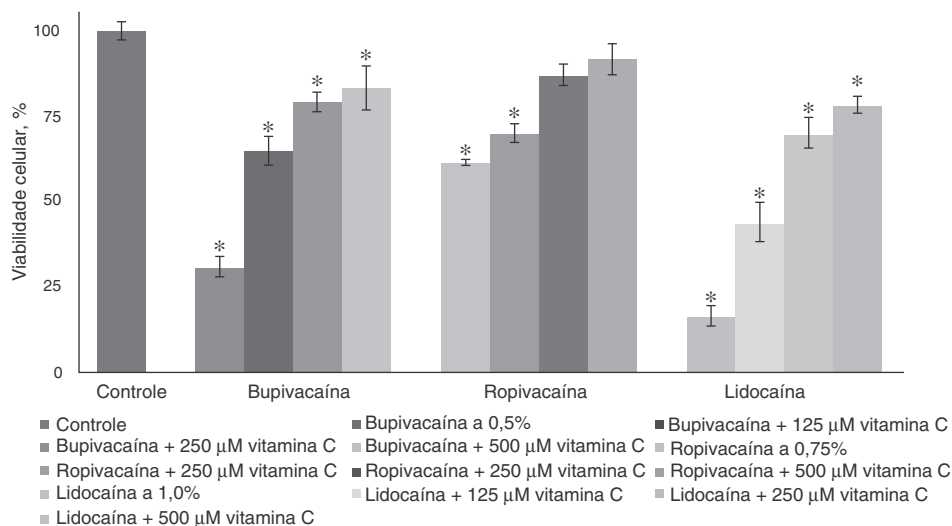


Figura 1 Influência de vitamina C sobre a viabilidade celular de condrócitos. Os valores são expressos como média \pm DP; $n=6$. *Representa $p < 0,05$, comparado com controles, conforme determinado pela análise de variância simples, Anova.

Resultados

A vitamina C melhora a viabilidade dos condrócitos após a exposição a anestésicos

A viabilidade dos condrócitos em resposta à exposição a anestésico foi analisada com o uso do ensaio Vivo/Morto. Após a exposição das culturas de condrócitos aos anestésicos locais por 24 horas, a condrotoxicidade observada com lidocaína a 1% foi quase duas vezes maior do que a de ropivacaína a 0,75% (fig. 1). Houve uma diminuição acentuada na porcentagem de viabilidade das células após a exposição à lidocaína, ropivacaína ou bupivacaína. Comparando as concentrações equipotentes de ropivacaína (0,75%) e bupivacaína (0,5%), as taxas de viabilidade celular foram significativamente mais elevadas 24 horas após o tratamento com ropivacaína a 0,75% do que com bupivacaína a 0,5%. A condrotoxicidade foi mais pronunciada na exposição à lidocaína seguida por bupivacaína. A exposição à vitamina C após a anestesia resultou em uma melhoria significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de viabilidade celular. As contagens viáveis de condrócitos subiram com o aumento das concentrações de vitamina C. A concentração de 500 μM causou um aumento acentuado da viabilidade dos condrócitos, em comparação com doses mais baixas (125 e 250 μM).

A apoptose dos condrócitos após a exposição à anestesia também foi detectada por meio da mensuração da perda de assimetria da membrana por coloração com anexina v. A contagem de células em apoptose foi acentuadamente maior ($p < 0,05$) após a exposição à anestesia. Ropivacaína a 0,75% causou apoptose consideravelmente mais baixa, em comparação com lidocaína a 1% e bupivacaína a 0,5%. A incubação com vitamina C resultou em aumento da porcentagem de viabilidade, com contagens diminuídas de células em apoptose. Vitamina C em concentração de 500 μM foi mais potente para reduzir a apoptose após a exposição aos anestésicos locais do que em doses mais baixas (fig. 2).

A vitamina C suprime a apoptose por subregulação da expressão das caspases 3 e 9

Para avaliar o possível envolvimento da ativação de caspases em condrotoxicidade induzida por anestesia, a expressão da caspases 3 e 9 foi determinada 24 horas após a exposição à anestesia. Uma hora de exposição aos anestésicos causou sobrerregulação da caspase-3 e da caspase-9 da seguinte forma: lidocaína > bupivacaína > ropivacaína (fig. 3). Embora ropivacaína a 0,75% tenha causado o aumento da expressão das caspases, verificou-se que esse aumento não foi significativo em relação aos condrócitos controles não expostos aos anestésicos. No entanto, lidocaína a 1% resultou em melhoria acentuada do nível de expressão, o que indica a ativação da cascata de caspases na apoptose. A incubação com vitamina C para 24 horas reduziu acentuadamente a expressão das caspases de forma dependente da dose, o que está de acordo com os resultados do ensaio Vivo/Morto e da coloração com anexina v. A vitamina C a 250 e 500 μM foi mais eficaz em subregular as expressões das caspases 3 e 9.

Influência da vitamina C na geração de ERO

Determinamos os níveis de ERO por citometria de fluxo com o uso de coloração com 2',7'-diclorofluoresceína diacetate (DCFH-DA). Lidocaína, bupivacaína e ropivacaína causaram um aumento acentuado na produção de ERO. Lidocaína causou uma produção em dobro de ERO, em comparação com ropivacaína, e quase 10% a mais do que bupivacaína. Esse aumento, entretanto, foi suprimido em condrócitos incubados com vitamina C, em comparação com células sem vitamina C. O tratamento com vitamina C reduziu significativamente a produção de ERO, na seguinte ordem: 125 < 250 < 500 μM (fig. 4). A capacidade antioxidante da vitamina C pode ter sido responsável pela supressão acentuada de ERO.

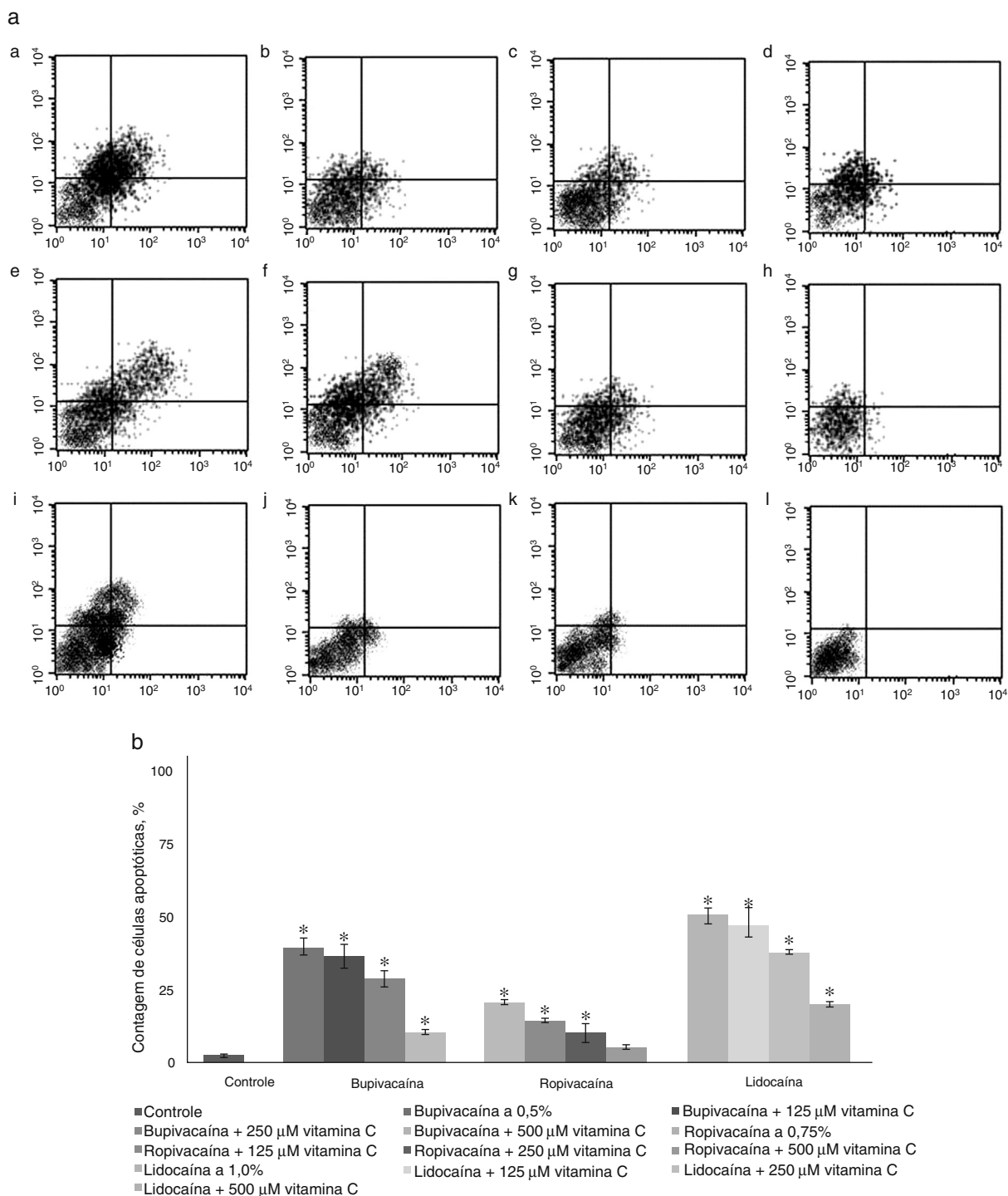
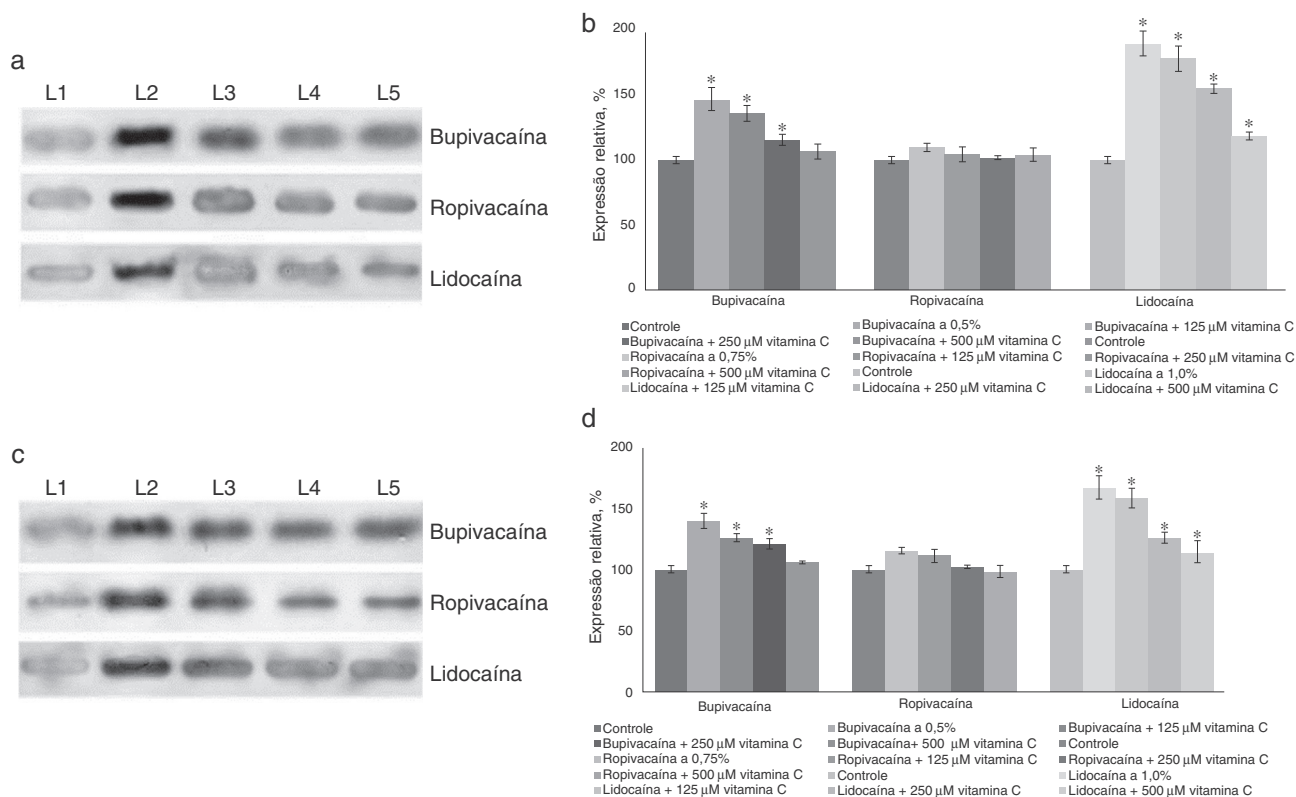


Figura 2 Condrototoxicidade induzida por exposição a anestésicos: (a) bupivacaína a 0,5%; (e) lidocaína a 1%; (i) ropivacaína a 0,75%. Vitamina C sobre os efeitos dos anestésicos: (b) bupivacaína a 0,5% + 125 µM de vitamina C; (c) bupivacaína a 0,5% + 250 µM de vitamina C; (d) bupivacaína a 0,5% + 500 µM de vitamina C; (f) lidocaína a 1% + 125 µM de vitamina C; (g) lidocaína a 1% + 250 µM de vitamina C; (h) lidocaína a 1% + 500 µM de vitamina C; (j) ropivacaína a 0,75% + 125 µM de vitamina C; (k) ropivacaína a 0,75% + 250 µM de vitamina C; (l) ropivacaína a 0,75% + 500 µM de vitamina C. Contagens de células em apoptose. Valores apresentados como média ± DP; n = 6. *Representa $p < 0,05$, comparado com controles, conforme determinado pela análise de variância simples, Anova.

Discussão

Injeções intra-articulares de anestésicos locais são administradas com frequência em ambientes perioperatórios e

ambulatoriais.³² As injeções intra-articulares de anestésicos locais melhoram a analgesia no período pós-operatório.^{1,2,33} Lidocaína, bupivacaína e ropivacaína são anestésicos locais do tipo amida. Publicações recentes sugeriram potenciais



efeitos adversos desses três anestésicos locais sobre condrócitos articulares *in vitro*.^{1,11}

Vários estudos descreveram efeitos prejudiciais de anestésicos locais sobre a viabilidade dos condrócitos. Chu et al.³⁴ demonstraram grave toxicidade de bupivacaína. O estudo evidenciou a exposição à bupivacaína a 0,5% e

> 99% dos condrócitos bovinos foram encontrados mortos em todas as culturas expostas. Gomoll et al.³⁵ relataram acentuadas alterações histopatológicas e metabólicas em articulações de coelhos com infusão contínua de bupivacaína a 0,25%, com e sem epinefrina. Relatou-se que doses de lidocaína a 1% e 2% apresentaram toxicidade em condrócitos.¹¹

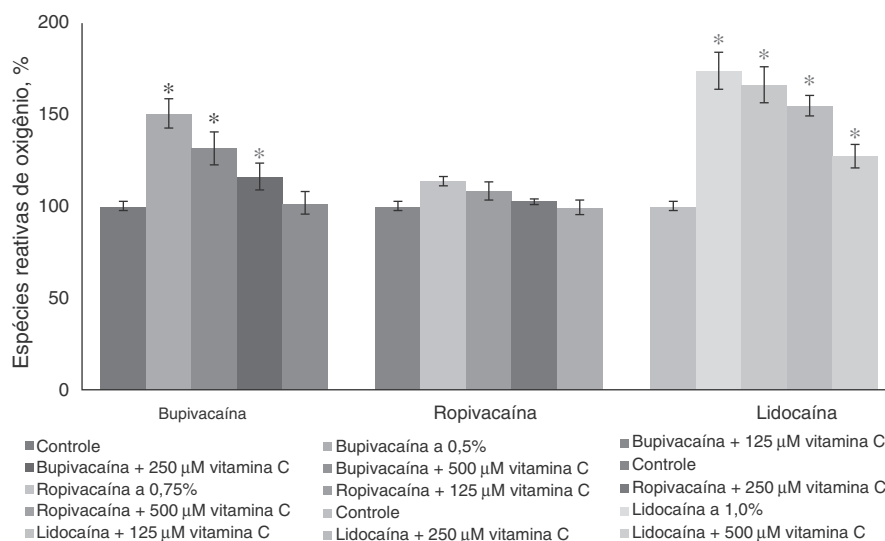


Figura 4 Influência da vitamina C na geração de ERO por citometria de fluxo. Os valores são apresentados como média \pm DP; $n=6$. *Representa $p < 0,05$, comparado com controles, conforme determinado pela análise de variância simples, Anova.

Além disso, toxicidade em condrócitos foi relatada por Piper e Kim¹ após a exposição de explantes de cartilagem humana e condrócitos aos anestésicos locais bupivacaína e ropivacaína. Corroborando relatos anteriores, em nosso estudo, bupivacaína a 0,5%, ropivacaína a 0,75% e lidocaína a 1% induziram apoptose e reduziram a viabilidade dos condrócitos. Observamos que lidocaína foi potencialmente mais tóxica do que bupivacaína e ropivacaína. Semelhantemente a estudos anteriores, descobriu-se que ropivacaína foi menos condrotóxica do que bupivacaína em condrócitos humanos.^{1,36} A vitamina C melhorou de forma significativa a viabilidade celular dos condrócitos. Estudos demonstraram o efeito positivo da vitamina C na saúde dos ossos.²⁹

A apoptose pode ser induzida por meio de vias intrínsecas e extrínsecas, ambas envolvem a ativação de caspases celulares. Caspases são enzimas importantes envolvidas na regulação da clivagem proteolítica altamente específica de proteínas celulares que levam à morte celular. Evidências sugerem que a caspase-3 também pode estar envolvida na fragmentação do DNA.²¹ No nosso estudo, observamos que os anestésicos locais — lidocaína, bupivacaína e ropivacaína — induziram níveis de expressão de caspase que são indicativos de indução de apoptose em condrócitos por meio da ativação de caspases. Perez-Castro et al.¹⁶ demonstraram ativação das caspases 3 e 7 em células do neuroblastoma humano após incubação com lidocaína, ropivacaína e bupivacaína. No entanto, a vitamina C suprimiu a expressão das caspases 3 e 9, o que sugere de forma marcante a sua eficácia antiapoptótica.

Os mecanismos que levam à condrotoxicidade dos anestésicos locais não são totalmente compreendidos. Para analisar o envolvimento da apoptose mediada por ERO, a geração de ERO nos condrócitos foi avaliada. O aumento acentuado na geração de ERO após a exposição aos anestésicos foi reduzido para níveis quase normais nas incubações de condrócitos com várias concentrações de vitamina C. Isso pode ser devido à potente propriedade antioxidante da vitamina C. A vitamina C teria efetivamente impedido a geração de ERO e ou neutralizado as ERO. No entanto, observamos uma correlação surpreendente entre a viabilidade celular, a expressão de caspases e os níveis da produção de ERO. Park et al.³⁷ mostraram um aumento da concentração de ERO em correlação com a morte celular das células de Schwann após incubação com bupivacaína. Em nosso estudo, as concentrações de ERO aumentaram após a exposição à lidocaína e bupivacaína, mas níveis não significativos foram observados após a exposição à ropivacaína. Aumento semelhante na geração de ERO após a exposição a anestésicos locais foi relatado por Grishko et al.³⁸

Para resumir, mostramos que ropivacaína a 0,75%, embora tóxica para as células de condrócitos humanos, após 60 minutos de exposição, está na faixa consideravelmente menor de toxicidade em comparação com bupivacaína a 0,5% e lidocaína a 1%. Entre os anestésicos estudados, lidocaína em concentração de 1% apresentou a maior condrotoxicidade. O aumento da produção de ERO evidenciado em nosso estudo sugere que a condrotoxicidade pode ser devida à apoptose mediada por ERO. Contudo, a incubação com vitamina C ofereceu uma proteção significativa aos condrócitos, que poderia ser atribuída a sua capacidade antioxidante.

Conclusão

A vitamina C forneceu proteção acentuada aos condrócitos contra os efeitos tóxicos dos anestésicos locais: ropivacaína, bupivacaína e lidocaína.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Piper SL, Kim HT. Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90:986–91.
2. Piper SL, Kramer JD, Kim HT, et al. Effects of local anesthetics on articular cartilage. *Am J Sports Med.* 2011;39:2245–53.
3. Dragoo JL, Braun HJ, Kim HJ, et al. The in vitro chondrotoxicity of single-dose local anesthetics. *Am J Sports Med.* 2012;40:794–9.
4. Petty DH, Jazrawi LM, Estrada LS, et al. Glenohumeral chondrolysis after shoulder arthroscopy: case reports and review of the literature. *Am J Sports Med.* 2004;32:509–15.
5. Kamath R, Strichartz G, Rosenthal D. Cartilage toxicity from local anesthetics. *Skeletal Radiol.* 2008;37:871–3.
6. Gomoll AH, Yanke AB, Kang RW, et al. Long-term effects of bupivacaine on cartilage in a rabbit shoulder model. *Am J Sports Med.* 2009;37:72–7.
7. Solomon DJ, Navaie M, Stedje-Larsen ET, et al. Glenohumeral chondrolysis after arthroscopy: a systematic review of potential contributors and causal pathways. *Arthroscopy.* 2009;25:1329–42.
8. Anderson SL, Buchko JZ, Taillon MR, et al. Chondrolysis of the glenohumeral joint after infusion of bupivacaine through an intraarticular pain pump catheter: a report of 18 cases. *Arthroscopy.* 2010;26:451–61.
9. Hepburn, Walsh P, Mulhall KJ. The chondrotoxicity of local anaesthetics: any clinical impact? *Joint Bone Spine.* 2009;37:438–40.
10. McLure HA, Rubin AP. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol.* 2005;71:59–74.
11. Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose- and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes in vitro. *Am J Sports Med.* 2007;35:1621–7.
12. Baker JF, Walsh PM, Byrne DP, et al. In vitro assessment of human chondrocyte viability after treatment with local anaesthetic, magnesium sulphate or normal saline. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19:1043–6.
13. Park J, Sutradhar BC, Hong G, et al. Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. *Vet Anaesth Analg.* 2011;38:127–33.
14. Lo IK, Sciore P, Chung M, et al. Local anesthetics induce chondrocyte death in bovine articular cartilage disks in a dose- and duration-dependent manner. *Arthroscopy.* 2009;25:707–15.
15. Zink W, Graf BM. Local anesthetic myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med.* 2004;29:333–40.
16. Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, et al. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg.* 2009;108:997–1007.
17. Dragoo JL, Korotkova T, Kim HJ, et al. Chondrotoxicity of low pH, epinephrine, and preservatives found in local anesthetics containing epinephrine. *Am J Sports Med.* 2010;38:1154–9.
18. Fedder C, Beck-Schimmer B, Aguirre J, et al. In vitro exposure of human fibroblasts to local anaesthetics impairs cell growth. *Clin Exp Immunol.* 2010;162:280–8.

19. Costouros JG, Dang AC, Kim HT. Inhibition of chondrocyte apoptosis *in vivo* following acute osteochondral injury. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11:756–9.
20. Takahashi T, Yamamoto H, Ogawa Y, et al. Role of apoptosis inhibition in various chondrocyte culture systems. *Int J Mol Med*. 2003;11:299–303.
21. Rao A, Johnston TR, Harris AH, et al. Inhibition of chondrocyte and synovial cell death after exposure to commonly used anesthetics chondrocyte apoptosis after anesthetics. *Am J Sports Med*. 2014;42:50–8.
22. Gaby AR. Natural approaches to epilepsy. *Altern Med Rev*. 2007;12:9–24.
23. Gasiorowski A, Dutkiewicz J. Weight training and appropriate nutrient supplementation as an alternative method to pharmacological treatment in rehabilitation of post-myocardial infarction patients. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19:333–8.
24. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 2003;22:18–35.
25. Okma-Keulen P, Hopman-Rock M. The onset of generalized osteoarthritis in older women: a qualitative approach. *Arthritis Rheum*. 2001;45:183–90.
26. Termine JD. American Society for Bone and Mineral Research. Bone matrix proteins and the mineralization process. California: Kelseyville; 1990.
27. Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:1135S–40S.
28. Kipp DE, McElvain M, Kimmel DB, et al. Scurvy results in decreased collagen synthesis and bone density in the guinea pig animal model. *Bone*. 1996;18:281–8.
29. Sahni S, Hannan MT, Gagnon D, et al. Protective effect of total and supplemental vitamin C intake on the risk of hip fracture – a 17-year follow-up from the Framingham Osteoporosis Study. *Osteoporos Int*. 2009;20:1853–61.
30. Breu A, Eckl S, Zink W, et al. Cytotoxicity of local anesthetics on human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Arthroscopy*. 2013;29:1676–84.
31. Lu HF, Sue CC, Yu CS, et al. Diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells. *Food Chem Toxicol*. 2004;42:1543–52.
32. Koyonos L, Yanke AB, McNickle AG, et al. A randomized, prospective, double-blind study to investigate the effectiveness of adding DepoMedrol to a local anesthetic injection in postmeniscectomy patients with osteoarthritis of the knee. *Am J Sports Med*. 2009;37:1077–82.
33. Dragoo JL, Korotkova T, Kanwar R, et al. The effect of local anesthetics administered via pain pump on chondrocyte viability. *Am J Sports Med*. 2008;36:1484–8.
34. Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, et al. *In vitro* exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. *Arthroscopy*. 2006;22:693–9.
35. Gomoll AH, Kang RW, Williams JM, et al. Chondrolysis after continuous intra-articular bupivacaine infusion: an experimental model investigating chondrotoxicity in the rabbit shoulder. *Arthroscopy*. 2006;22:813–9.
36. Farkas B, Kvell K, Czompoly T, et al. Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468:3112–20.
37. Park CJ, Park SA, Yoon TG, et al. Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line. *J Dent Res*. 2005;84:852–7.
38. Grishko V, Xu M, Wilson G, et al. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92:609–18.