

Efecto de la edad sobre el tamaño de los proteoglicanos del cartílago articular equino[#]

Age related effect on proteoglycans size in equine articular cartilage

H Adarmes*, L Aracena, M Galleguillos, E González

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of age on proteoglycans size in equine articular cartilage. Cartilage samples were obtained from metacarpophalangeal joints of crossbred equines immediately after slaughter, and allotted in three groups according to the equine's age: 1.5-2 years (n = 7); 4-5 years (n = 6) and over 10 years (n = 4). The cartilage extracts (100 mg /pair joints) were pooled for each age group and fractionated by exclusion and ion exchange gel chromatography. Proteoglycan content of each fraction was determined by colorimetric reaction with safranin-O. The elution profile of Sepharose CL-2B, showed that proteoglycans appear as an polydisperse population of different size and similar molecular mass per age group. The size of proteoglycans decreased with age. A similar result was obtained measuring molecular mass and hydrodynamic radio values of proteoglycans when maximal absorbance values of each age group were used. These results show an inverse relationship between age and proteoglycans size of equine articular cartilage, which could affect the cartilage ability to undergo reversible compression.

Palabras clave: cartílago, edad, proteoglicanos, glicosaminoglicanos.

Key words: cartilage, age, proteoglycans, glycosaminoglycans.

INTRODUCCION

El funcionamiento normal de las articulaciones móviles o diartrosis depende de la integridad del cartílago articular que contiene un 2-5% de condrocitos encargados de regular la composición de la matriz extracelular (MEC), la que a su vez proporciona a estas células las condiciones necesarias para sus funciones (Caplan 1984).

La MEC del cartílago articular contiene básicamente agua, colágeno y proteoglicanos. El colágeno predominante en el cartílago es el tipo II, que es un homopolímero de tres cadenas denominadas alfa 1(II) (Eyre 2002). Entre los proteoglicanos de la MEC del cartílago articular, el agregán se encuentra en mayor cantidad (Hedlund y col 1999) y está formado por una proteína central a la que se unen numerosas cadenas de carbohidratos modificados denominados glicosami-noglicanos (GAGs) de naturaleza polianiónica, debido a su contenido de grupos carboxilo y sulfato y que varían su composición, dependiendo del tejido considerado (Mc Ilwraith 1996, Platt 1996, Todhunter 1996). El agregán adopta formas muy extendidas, ocupando un gran volumen en relación a su masa y uniéndose a gran cantidad de agua, debido a la repulsión entre los grupos aniónicos, proporcionándole al cartílago su capacidad de amortiguación (Friedlander y Goldberg 1991). En el cartílago articular el GAG que

predomina es el condroitín sulfato, encontrándose menores cantidades de queratán sulfato (Alberts y col 1989).

El agregán, junto al ácido hialurónico y las proteínas de unión, forman agregados macromoleculares de gran tamaño que inmovilizan a los proteoglicanos en la MEC, impidiendo su degradación y difusión a través de los poros de la matriz (Hardingham y Bayliss 1990, Jackson y col 1991).

El envejecimiento del cartílago articular produciría una serie de modificaciones, tanto postranscripcionales de la cadena proteica central como del número, tamaño y proporción de condroitín sulfato y queratán sulfato, que se traduciría en la disminución del tamaño del agregán y del contenido total de proteoglicanos del cartílago. Así se ha descrito que a través de la edad disminuye el contenido de condroitín sulfato, mientras que aumentaría el contenido de queratán sulfato (Dziewiatkowski y col 1989). Además, aparecería una mayor heterogeneidad en la masa molecular de los proteoglicanos y una disminución del tamaño promedio de los agregados macromoleculares, conduciendo a una menor eficiencia para cumplir su función, la cual depende de la interacción de los proteoglicanos con otras moléculas de la MEC del cartílago que incluyen el agua (Hardingham y Bayliss 1990, Bayliss y col 2000). No hay antecedentes de trabajos que relacionen el ejercicio con el tamaño de los proteoglicanos, aunque el trauma generado por el mismo puede considerarse como un mecanismo iniciador de la activación de las cascadas de factores proinflamatorios asociados a la pérdida de componentes de la MEC del cartílago. En un trabajo *in vitro* (Bachrach y col 1995), que utilizó explantes de cartílago sometidos a

[#] Proyecto DTI-A-3135/1992. Universidad de Chile.

* Fax 6785526, hadarmes@uchile.cl, casilla 2 correo 15, Santiago.

cargas compresivas, se estableció una relación entre la duración de la compresión y la síntesis de proteoglicanos, pero no se aportan antecedentes respecto del tamaño de los mismos.

En este trabajo se plantea la hipótesis sobre la existencia de una relación inversa entre la edad de los equinos y el tamaño de los proteoglicanos de la matriz extracelular del cartílago articular, empleándose una metodología basada en la separación cromatográfica con el objetivo de purificar parcialmente los proteoglicanos y luego determinar su tamaño relativo.

MATERIAL Y METODOS

Obtención y selección de muestras. Se utilizaron cartílagos de articulación metacarpofalángica de equinos mestizos recién beneficiados en un matadero de la zona central de Chile, cuya edad fue determinada por cronometría dentaria con el fin de seleccionar 3 grupos etarios: grupo A de 1,5 a 2 años ($n = 7$), grupo B de 4 a 5 años ($n = 6$) y grupo C mayor de 10 años ($n = 4$). Con las articulaciones obtenidas se procedió a disectar y seleccionar los cartílagos provenientes de articulaciones normales desde el punto de vista macroscópico (Adarmes y col 2003). De cada equino se seleccionaron ambas articulaciones metacarpofalángicas, obteniéndose de ellas 100 mg de cartílago desde la misma zona de la superficie articular y que corresponde a la que generalmente se encuentra alterada en los cuadros osteoartroticos. Posteriormente los cartílagos se agruparon de acuerdo con la edad, en una sola muestra representativa de cada grupo etario y finalmente se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

Debido a nuestro interés en caracterizar una zona definida de la superficie articular, la que aparece habitualmente dañada al examen visual en los procesos degenerativos articulares, se obtuvo de articulaciones macroscópicamente normales una cantidad limitada de cartílago, que impide el trabajo y tratamiento individual de las muestras, debido a las restricciones cuantitativas de la metodología colorimétrica. Para describir la variación del tamaño de los proteoglicanos a través de la edad, las muestras de cartílago se agruparon en los rangos de edad descritos, con el objetivo de purificar una cantidad suficiente de proteoglicanos detectable por la metodología colorimétrica, al igual como se ha descrito en otros trabajos como el de Carrino y col (2000).

Obtención del extracto de cartílago. El cartílago fue triturado en frío y resuspendido en una solución de extracción que contenía acetato de sodio 0,05 M, pH 6 (acetato de sodio 0,05 M; guanidina 4 M; benzamidina 5 mM; ácido 6 aminocaproico 0,1 M; EDTA 0,01 M; PMSF 0,001 M; NEM 0,001 M; azida de sodio 0,02%), con agitación por 18 horas a 4°C y posteriormente filtrado para obtener el extracto de cartílago.

Procedimiento para la purificación y cuantificación de los proteoglicanos. Para purificar el extracto de cartílago, se realizaron sucesivamente cromatografías de exclusión y de intercambio iónico, midiendo en los eluidos de cada cromatografía la presencia de proteínas por su absorbancia a 280 nm y el contenido de proteoglicanos por su unión a un colorante catiónico como es la safranina-O al 0,02% en acetato de sodio 50 mM, pH 4,8, en una membrana de nitrocelulosa utilizando un aparato de microfiltración "dot-blot" (Carrino y col 1991). El complejo coloreado se disolvió en una solución de cetilpiridinio al 10% y luego se midió su absorbancia a 536 nm. El método de la safranina-O permitió una estimación cuantitativa de los proteoglicanos, obteniéndose una relación lineal entre la absorbancia y la cantidad de proteoglicanos.

En una primera etapa de purificación se realizó una cromatografía de exclusión en Sephadex G-50 con un rango de discriminación de 1.500 a 30.000 Da. A la columna de 30 x 0,7 cm previamente equilibrada, se le agregó 1,5 ml del extracto de cartílago de cada grupo etario, que se eluyó con solución acetato 0,05 M, pH 6 (acetato de sodio 0,05 M; urea 8 M; cloruro de sodio, 0,15 M azida de sodio 0,02%), obteniéndose en un colector de fracciones automático, 16 fracciones de 500 μl con contenido de proteoglicanos en el volumen de exclusión.

El conjunto de fracciones (16) con reacción positiva a la safranina-O se sometió a cromatografía de intercambio iónico con DEAE Sephacel, en una columna de 4,5 x 1,3 cm en que los proteoglicanos por su carácter polianiónico permanecen unidos a la resina. La elución de la columna se realizó utilizando la misma solución de acetato de la cromatografía de exclusión, con un gradiente lineal de NaCl de 0,15 a 1 M y una velocidad de flujo de 10 ml/hora, obteniéndose 50 fracciones de 500 μl positivas a la reacción con safranina-O. Con esta separación se obtuvieron lecturas semejantes de proteínas, proteoglicanos y conductividad (mMho) en los 3 grupos de edad. El máximo contenido de proteoglicanos se detectó con una fuerza iónica similar (14-15 mMho) en todos los casos. Las fracciones positivas a safranina-O se dializaron contra agua destilada durante 24 horas a 4°C , en una membrana de diálisis de 3.500 Da como punto de corte. La muestra se liofilizó a -50°C por 18 horas y se conservó a -20°C hasta su análisis posterior.

Separación de poblaciones de proteoglicanos según masa molecular. Finalmente, el liofilizado que corresponde a los proteoglicanos parcialmente purificados de cada grupo etario se resuspendió en 500 μl de solución de acetato de sodio 1M, pH 6 que contenía guanidina 4 M y azida de sodio 0,02%, el cual se sometió a una segunda cromatografía de exclusión que permitió la separación de poblaciones de proteoglicanos según su tamaño molecular, en Sepharosa CL-2B con un rango de discriminación de 70.000 a 40×10^6 Da, con dimensiones de

la columna de 93 x 0,7 cm a una velocidad de flujo de 5 ml/hora, obteniéndose fracciones de 500 µl.

Cálculo de variables relacionadas con la masa molecular de los proteoglicanos. Los datos obtenidos con este fraccionamiento constituyeron el perfil de proteoglicanos y de su análisis se originaron los siguientes datos: el volumen total de la columna ($V_t = \pi r^2 h$); el volumen vacío (V_o) que es el necesario para eluir aquellas moléculas de alta masa molecular ($> 200 \times 10^6$ Da), cuyo tamaño sea mayor que el del poro de la resina, utilizándose para ello proteoglicanos en condiciones agregantes sin guanidina (Nakano y Scott 1989); el volumen de elución (V_e) que representa al volumen de la fracción en que se encuentra la población de proteoglicanos más representativa de la muestra; el coeficiente de partición (K_{av}) que permite comparar proteoglicanos de diferentes muestras en cuanto a su masa molecular y distribución (Ohno y col 1986), el cual se calculó en base a la siguiente relación:

$$k_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

La masa molecular (M_w) se estimó a partir del K_{av} en base a la siguiente fórmula:

$$\log M_w = - (1,65 \pm 0,27) K_{av} + (6,58 \pm 0,08)$$

que permitió determinar el tamaño molecular del proteoglicano eluido en la fracción de máxima lectura a 536 nm (Ohno y col 1986) y expresado en kilodaltons (kDa).

El radio hidrodinámico (R_s) de los proteoglicanos se calculó a partir del K_{av} (Ohno y col 1986) y se expresó en Angström (Å), a partir de la siguiente fórmula:

$$\log R_s = - (0,69 \pm 0,04) K_{av} + (2,57 \pm 0,01)$$

Con estos cálculos se obtuvo una estimación del tamaño (M_w) y de las características fisicoquímicas (R_s) de los proteoglicanos de cada muestra, realizándose una comparación cualitativa entre los distintos grupos etarios.

RESULTADOS

Con el objetivo de minimizar el error experimental, se debe señalar que las muestras de cartílago de cada grupo etario se homogeneizaron en la misma relación de mg de cartílago y ml de solución de homogeneización. Con respecto a las separaciones cromatográficas, se utilizó una misma columna para cada una de ellas, con los lavados correspondientes entre cada una de las filtraciones.

La determinación del contenido de proteínas, por su absorbancia a 280 nm en los eluidos de las diferentes separaciones cromatográficas, sólo tuvo como finalidad la evaluación del grado de purificación de la fracción de

proteoglicanos. Así, en los eluidos obtenidos por separación cromatográfica en Sepharosa CL-2B no se encontró presencia de proteínas a través de esta metodología, lo que reflejaría una separación adecuada de las proteínas no relacionadas con la proteína central de los proteoglicanos en las cromatografías previas.

A través de la separación cromatográfica de exclusión con Sepharosa CL-2B, se demuestra que los proteoglicanos de cada grupo etario están constituidos por una población heterogénea en términos de masa molecular y que entregaron valores máximos diferentes de absorbancia a 536 nm, para las fracciones 24-25, 29 y 32 correspondientes a los grupos A, B y C respectivamente (figura 1), lo que indicaría la tendencia a la disminución del tamaño de las poblaciones de proteoglicanos, a medida que aumenta la edad de los animales.

A pesar de que el grupo A presenta un predominio de proteoglicanos de mayor masa molecular, también muestra la presencia de poblaciones de menor masa (fracciones 29 y 31), aunque en menor proporción que lo observado en los grupos de mayor edad. Esto indicaría que estas poblaciones de proteoglicanos de menor tamaño ya se encuentran presentes en los grupos de menor edad y que aumentan su proporción a medida que la edad aumenta.

Con el objetivo de calcular la masa molecular (M_w) y el radio hidrodinámico (R_s) se determinó el valor del coeficiente de partición (K_{av}) para cada grupo de edad (cuadro 1). Se estableció que tanto la masa molecular como el radio hidrodinámico disminuyeron a medida que aumentó la edad de los animales.

DISCUSION

La no detección de proteínas por su absorbancia a 280 nm en los eluidos obtenidos por la separación cromatográfica con Sepharosa CL-2B no indica necesariamente su ausencia, ya que el agregán, que es el proteoglicano cuantitativamente más importante del cartílago articular, posee una proteína central relativamente grande de 220 kDa, pero que representa el 10%

Cuadro 1. Valores de coeficiente de partición, masa molecular (kDa) y radio hidrodinámico (Å) de la población proteoglicanos del cartílago articular con máxima absorbancia, proveniente de equinos de distinta edad.

Values of partition coefficient, molecular mass (kDa) and hydrodynamic radio (Å) of articular cartilage proteoglycans population with greater absorbance, obtained from equines of different ages.

| Muestra | A (1½ - 2 años) | B (4 - 5 años) | C (> 10 años) |
|---------------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| K_{av} | 0,11 | 0,20 | 0,26 |
| M_w ($\times 10^6$ kD) | 2,49 | 1,78 | 1,42 |
| R_s (Å) | 312 | 270 | 246 |

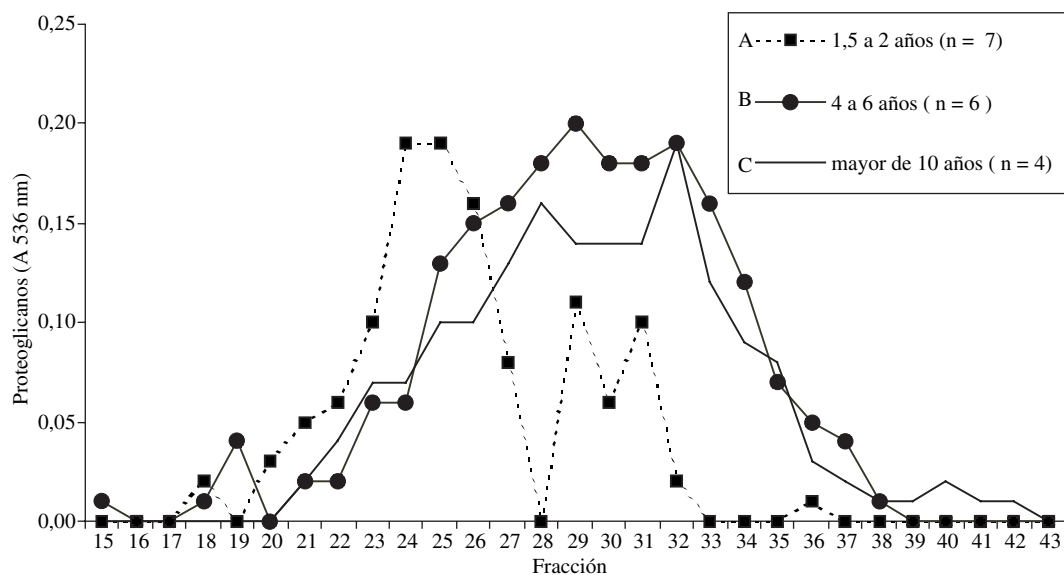


Figura 1. Perfil de elución de la separación cromatográfica en Sepharosa CL2B, de los extractos de cartilago de la articulación metacarpofalángica de equinos de distinta edad.

Age related elution profile of Sepharose CL-2B gel chromatography, from cartilage extracts of equine metacarpophalangeal joint.

aproximadamente de la masa molecular total del agregán, constituido fundamentalmente por los GAGs. La ausencia de absorbancia a 280 nm para proteínas sólo indicaría un escaso contenido de aminoácidos aromáticos ya que en la proteína central del agregán se ha descrito la repetición de residuos de serina, glicina y treonina, indispensables para la unión a los GAGs (Kiani y col 2002).

Los resultados obtenidos en la figura 1 muestran la presencia de poblaciones heterogéneas de proteoglicanos con una masa molecular continua para cada grupo etario, lo que coincide con lo descrito por Hardingham y Bayliss (1990). Esta población heterogénea correspondería fundamentalmente al proteoglicano agregán, que es el que se encuentra en mayor proporción en el cartilago articular y le proporciona al tejido su capacidad de amortiguación, debido a su alto contenido en condroitín sulfato y queratán sulfato (Kiani y col 2002), que son reconocidos por la metodología colorimétrica con Safranina-O.

Al analizar los máximos de absorbancia de cada grupo etario, se encontró una disminución de la masa molecular de los proteoglicanos con el aumento de la edad, aspecto que también ha sido descrito en distintas especies animales que incluyen al cartilago articular humano (Hardingham y Bayliss 1990) y el cartilago hialino de distintas zonas de la oveja (Dziewiatkowski y col 1989). Además, se encontraron poblaciones de proteoglicanos de mayor tamaño aunque en baja proporción en los grupos de menor edad (fracción 18 del grupo A y fracción 19 del grupo B), que se encuentran ausentes en el grupo C de mayor edad.

La disminución del tamaño de los proteoglicanos así como la heterogeneidad de la masa molecular detectada a través de la edad, se podría asociar con incrementos de la actividad proteolítica y/o con la alteración del proceso de biosíntesis. Posiblemente la población heterogénea detectada corresponde a un mismo tipo de proteoglicano que es el agregán, debido a que constituye el 90% del contenido de proteoglicanos del cartilago (Hedlund y col 1999). En nuestro análisis no influirían los proteoglicanos pequeños de naturaleza no agregante descritos en el cartilago como son el biglicano, decorina y fibromodulina, debido a que constituyen una pequeña fracción de los proteoglicanos del cartilago, sobre la base de la materia seca (Todhunter 1996) y a su bajo contenido en GAGs que impide que la metodología colorimétrica empleada sea capaz de detectarlos en estas condiciones.

La actividad proteolítica en el cartilago se ha relacionado con la actividad de metaloproteinasas (MMPs), las que, junto con la expresión constitutiva y actividad de una familia de proteasas (ADAMTS o agreganasas), se traducirían en la disminución del tamaño de los proteoglicanos (Moulharat y col 2004, Wachsmuth y col 2004). La actividad catabólica de estas enzimas sobre la proteína central del agregán produciría fragmentos G1 descritos por técnicas inmunohisto-químicas, Western blott y radioinmunoanálisis, tanto en el cartilago osteoartítico humano como en los obtenidos desde articulaciones clínicamente normales, lo que sugiere la participación de estas enzimas en el recambio molecular de la MEC del cartilago articular humano. Además, se encontró que en las articulaciones normales el contenido

de estos fragmentos G1 aumentaba en los individuos de mayor edad, lo que se asociaría con un incremento de la actividad catabólica a través de la edad (Lark y col 1997, Wells y col 2003). La actividad enzimática podría explicar la presencia en el grupo de menor edad (A) de dos fracciones (29 y 31) enriquecidas en proteoglicanos y que son coincidentes con los máximos de absorbancia para los grupos de mayor edad (fracción 29 para el grupo B y fracción 32 para el grupo C). Este incremento coincidente de proteoglicanos de masa molecular semejante en los tres grupos de edad analizados podría indicar la existencia de una misma actividad enzimática responsable del recambio molecular normal y que podría incrementar su actividad a través de la edad.

Existen antecedentes que demuestran que la actividad metabólica del condrocito es regulada por citoquinas, algunas de ellas de tipo anabólico como son el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1) (Verschere y col 1996) y por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Hickery y col 2003). Entre las citoquinas catabólicas se ha descrito a la interleuquina-1 (IL-1), que participaría en la patogenia de la osteoartritis, demostrándose que en explantes de cartílago humano normal (Hickery y col 2003) y de equino normal y osteoartítico (Morris y Treadwell 1994) reduce la síntesis de proteoglicanos, mientras que el TGF- β demostró un efecto anabólico restringido a etapas de inmadurez del tejido esquelético humano (Hickery y col 2003), lo que señalaría la participación de otros estímulos anabólicos. El estímulo con IL-1 en explantes de cartílago equino normal provocó la disminución de la síntesis de componentes de la matriz extracelular y un incremento de la síntesis y actividad de enzimas degradativas del tipo de la estromelisin, estableciéndose, además, que la actividad metabólica global del cartílago disminuyó con el aumento de la edad de los individuos (Morris y Treadwell 1994). En relación a nuestros resultados y a base de los antecedentes proporcionados, no queda claro si el recambio molecular normal a través de la edad es regulado por las mismas citoquinas proinflamatorias que se describen para el proceso degenerativo del cartílago, o bien, si aparecen otros mecanismos que regulan el incremento de la actividad enzimática y que expliquen la degradación de la matriz extracelular del cartílago articular con la edad.

Otro factor que podría afectar la síntesis de proteoglicanos en términos cuantitativos, es la disminución del número de condrocitos por procesos de apoptosis y/o alteración de su funcionalidad a través de la edad (Adams y Horton 1998). Este factor por sí solo no explicaría la heterogeneidad en la masa molecular, salvo si se plantea un desbalance entre el proceso de síntesis disminuida y una actividad proteolítica normal. En cultivo de cartílago procedente de equinos de edades entre 9 meses y 20 años, se demostró que la velocidad de incorporación de ^{35}S disminuye con la edad, lo que se traduciría en disminución de la síntesis de proteoglicanos (Iqbal y

col 2000), aunque en otro estudio que también utilizó la incorporación de ^{35}S en explantes de cartílago articular equino proveniente de la articulación metacarpofalángica equina, se estableció que el contenido de glicosaminoglicanos permanece constante a través de la edad (Platt y col 1998). También se ha descrito que una variación de mayor importancia se relacionaría con las cadenas de GAGs, tanto en número y longitud como en el patrón de sulfatación de las cadenas de condroitín sulfato (Hardingham y Fosang, 1992, Platt y col 1998). A través de la edad, el monómero de proteoglicano del cartílago humano se caracteriza por una disminución del tamaño y número de cadenas de condroitín sulfato y un aumento en el número de cadenas de queratán sulfato (Hardingham y Bayliss 1990), observándose, además, que la disminución de la síntesis de agregón se relaciona con una menor incorporación de sulfato en las cadenas de GAGs (Bolton y col 1999). A medida que aumenta la edad, la disminución del tamaño de los proteoglicanos, así como la modificación de su calidad, constituirían los factores que predispondrían a daño del cartílago articular y al desarrollo de la enfermedad degenerativa articular.

Otro factor que podría incidir en nuestro resultado se relacionaría con el ejercicio de los animales. En nuestro trabajo no hay antecedentes del trabajo efectuado por los animales utilizados; sin embargo, la ausencia de lesiones articulares macroscópicas indicaría que su trabajo físico fue insuficiente como para provocar lesiones que son habituales a nivel de matadero, es especial, en los animales de mayor edad. Además se ha descrito *in vitro* que la compresión cíclica de cartílago no modifica significativamente el tamaño ni la agregabilidad de los proteoglicanos del cartílago recién sintetizados (Sah y col 1991). En condrocitos de equino se encontró que su compresión dinámica no altera la síntesis de proteoglicanos, a pesar de que inhibe la síntesis de óxido nítrico, un radical libre gaseoso que se ha relacionado con la patogenia de la osteoartritis y con la apoptosis de condrocitos, indispensables para la síntesis de las moléculas de la matriz extracelular del cartílago (Wiseman y col 2003).

Los antecedentes obtenidos desde la elución cromatográfica permitieron calcular los valores de masa molecular y radio hidrodinámico, los que mostraron disminución a través de la edad (cuadro 1). La disminución de ambas variables a través de la edad se relacionaría directamente con la disminución de la longitud de las cadenas de GAGs de los proteoglicanos, debido al cambio de la relación condroitín/queratán sulfato (Hardingham y Bayliss 1990). Ambas variables interrelacionadas, masa molecular y radio hidrodinámico, explicarían la disminución de la capacidad de retención de agua con la consiguiente alteración de la función de amortiguación y la mayor fragilidad del cartílago con el aumento de la edad, lo que está relacionado con la mayor frecuencia de patologías articulares en los individuos

de mayor edad. Los eluidos positivos a safranina-O en los tres grupos analizados proporcionaron valores de masa molecular semejantes con el tamaño descrito para el agregán que es de aproximadamente 3×10^6 Da (Alberts y col 1989), lo que demostraría que en los eluidos se obtienen fundamentalmente distintas poblaciones del mismo proteoglicano que es el agregán.

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan quizás de mejor forma la condición natural en que se encuentran los proteoglicanos en la matriz del cartílago articular equino, puesto que los trabajos con explantes que evalúan la incorporación de ^{35}S eliminan la participación de otros factores que intervienen en la homeostasis del cartílago articular.

Finalmente se puede concluir que la separación cromatográfica permitió la purificación parcial de poblaciones dispersas de proteoglicanos de distinto tamaño y de masa molecular continúa para cada uno de los grupos de edad.

A través de los valores máximos de absorbancia a 536 nm se encontró un incremento en la población de proteoglicanos de menor tamaño con el aumento de la edad.

A medida que aumenta la edad se encontró disminución del tamaño molecular y del radio hidrodinámico, que se asociarían con la disminución de la capacidad funcional del cartílago.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de la edad sobre el tamaño de los proteoglicanos, se utilizaron cartílagos de equinos mestizos de matadero de 1,5 a 2 años ($n = 7$), de 4 a 5 años ($n = 6$) y mayores de 10 años ($n = 4$), obtenidos desde la articulación metacarpofalángica clasificada como normal desde el punto de vista macroscópico. De cada par de articulaciones se obtuvieron 100 mg de cartílago, que se agruparon en una sola muestra representativa por edad y se sometieron a fraccionamientos cromatográficos sucesivos de exclusión e intercambio iónico, obteniéndose perfiles de elución cuyo contenido de proteoglicanos se detectó utilizando la reacción colorimétrica con safranina-O. El perfil de elución obtenido desde una columna CL-2B permitió detectar poblaciones de proteoglicanos de distinto tamaño, pero continuas en términos de su masa molecular para cada grupo de edad, evidenciándose una disminución del tamaño de los proteoglicanos a medida que aumentaba la edad, lo que también se estableció al calcular la masa molecular y el radio hidrodinámico de los proteoglicanos al utilizar los valores máximos de absorbancia de cada grupo etario. Estos resultados demostrarían la relación inversa entre la edad de los equinos y el tamaño de los proteoglicanos, lo que afectaría la capacidad normal de amortiguación del cartílago.

REFERENCIAS

- Adams CS, WE Horton. 1998. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec* 250, 418-425.
- Adarmes H, A Riveros, M Galleguillos, E González. 2003. Contenido de glicosaminoglicanos del líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica de caballos castrados y yeguas de diferentes edades. *Arch Med Vet* 35, 51-59.
- Alberts B, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts, JD Watson. 1989. The extracellular matrix. In *Molecular Biology of the Cell*. 2ª ed. Garland Publ. Inc. N.Y. & London, Pp 802-813.
- Bachrach NM, WB Valhmu, E Stazzone, A Ratcliffe, Lai WM, VC Mow. 1995. Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment. *J Biomech* 28, 1561-1569.
- Bayliss MT, S Howat, C Davidson, J Dudhia. 2000. The organization of aggrecan in human articular cartilage. *J Biol Chem* 275, 6321-6327.
- Bolton MC, J Dudhia, MT Bayliss. 1999. Age-related changes in the synthesis of link protein and aggrecan in human articular cartilage: implications for aggregate stability. *Biochem J* 337, 77-82.
- Caplan A. 1984. Cartilage. *Sci Am* 251, 84-94.
- Carrino D, JL Arias, A Caplan. 1991. A spectrophotometric modification of a sensitive densitometric safranin-O assay for glycosaminoglycans. *Biochem Intern* 24, 485-495.
- Carrino D, M Sorrel, A Caplan. 2000. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys* 373, 91-101.
- Dziewiatkowski D, J La Valley, A Beaudon. 1989. Age related changes in the composition of proteoglycans in sheep cartilages. *Conn Tiss Res* 19, 103-120.
- Eyre D. 2002. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4, 30-35.
- Friedlander GE, VM Goldberg. 1991. Bone and cartilage hallograph: Biology and clinical applications. Ed. American Academy of Orthopaedic and Surgeons. Illinois, Pp 123-143.
- Hardingham T, M Bayliss. 1990. Proteoglycans of articular cartilage: Changes in aging and joint disease. *Sem Arth Rheum* 20, 12-33.
- Hardingham T, A Fosang. 1992. Proteoglycans: Many forms and functions. *FASEB J* 6, 861-870.
- Hedlund H, E Hedbom, D Heinegard, S Mengarelli-Widholm, FP Reinhold, O Svensson. 1999. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J Biol Chem* 274, 5777-5781.
- Hickery MS, MT Bayliss, J Dudhia, JC Lewthwaite, JC Edwards, AA Pitsillides. 2003. Age-related changes in the response of human articular cartilage to IL-1 α and transforming growth factor- β (TGF- β). *J Biol Chem* 278, 53063-53071.
- Iqbal J, J Dudhia, LE Bird, MT Bayliss. 2000. Age-related effects of TGF-beta on proteoglycan synthesis in equine articular cartilage. *Biochem. Biophys Res Commun.* 274, 467-471.
- Jackson R, J Busch, A Cardin. 1991. Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Phys Rev* 71, 481-495.
- Kiani K, L Chen, YJ Wu, AJ Yee, BB Yang. 2002. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 12, 19-32.
- Lark MW, EK Bayne, J Flanagan, CF Harper, LA Hoerrner, NI Hutchinson, II Singer, SA Donatelli, JR Weidner, HR Williams, RA Mumford, LS Lohmander. 1997. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both Matrix Metalloproteinase and Aggrecanase activity in normal, osteoarthritic and rheumatoid joints. *J Clin Invest* 100, 93-106.
- McIlwraith CW. 1996. General pathobiology of the joint and response to injury. En McIlwraith CW, Trotter GW. *Joint disease in the horse*. W.B. Saunders. Philadelphia, USA, Pp 40-70.
- Morris EA, BV Treadwell. 1994. Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res* 55, 138-146.
- Moulharat N, C Lesur, M Thomas, G Rolland-Valognes, P Pastoureau, F De Ceunink, M Sabatini. 2004. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by chondrocytes *in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 296-305.

- Nakano T, P Scott. 1989. Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint: High molecular weight chondroitin sulfate proteoglycans. *Archs Oral Biol* 9, 277-283.
- Ohno H, J Blackwell, A Jamieson, O Carrino, A Caplan. 1986. Calibration of the relative molecular mass of proteoglycans subunit by column cromathography on Sepharose CL2B. *Biochem J* 735, 559-563.
- Platt D. 1996. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. En McIlwraight CW, Trotter GW. *Joint disease in the horse*. W.B. Saunders. Philadelphia, USA, Pp 29-40.
- Platt D, JLE Bird, MT Bayliss. 1998. Ageing of equine articular cartilage: structure and composition of aggrecan and decorin. *Equine vet J* 30, 43-52.
- Sah RL-Y, J-YH Doong, AJ Grodzinsky, AHK Plaas, JD Sandy. 1991. Effects of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 286, 20-29.
- Todhunter RJ. 1996. Anatomy and physiology of synovial joints. En McIlwraight CW, Trotter GW. *Joint disease in the horse*. W.B. Saunders. Philadelphia, USA, Pp 1-28.
- Verschure PJ, JV Marle, LA Joosten, MM Helsen, FP Lafeber, WB Berg. 1996. Localization of insulin-like growth factor-1 receptor in human normal and osteoarthritic cartilage in relation to proteoglycan synthesis and content. *Br J Rheumatol* 35, 1044-55.
- Wachsmuth L, B Bau, Z Fan, A Pecht, N Gerwin, T Aigner. 2004. ADAMTS-1, a gene product of articular chondrocytes in vivo and in vitro, is downregulated by interleukin-1- beta. *J Rheumatol* 31, 315-320.
- Wells T, C Davidson, M Mörgelin, JLE Bird, MT Bayliss, J Dudhia. 2003. Age-related changes in the composition, the molecular stoichiometry and the stability of proteoglycan aggregates extracted from human articular cartilage. *Biochem J* 370, 69-79.
- Wiseman M, F Henson, DA Lee, DL Bader. 2003. Dynamic compressive strain inhibits oxide synthesis by equine chondrocytes from different areas of the cartilage surface. *Equine vet J* 35, 451-456.