



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINÁSICA A Y B
(MMP-2 Y MMP-9) EN EL LÍQUIDO SINOVIAL
PROVENIENTE DE LA ARTICULACIÓN
METACARPOFALÁNGICA EQUINA NORMAL Y
ALTERADA”**

ALVARO MAXIMILIANO URBINA URBINA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas

PROFESOR GUIA: MARCO GALLEGUILLOS

SANTIAGO, CHILE
2005



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINÁSICA A Y B
(MMP-2 Y MMP-9) EN EL LÍQUIDO SINOVIAL
PROVENIENTE DE LA ARTICULACIÓN
METACARPOFALÁNGICA EQUINA NORMAL Y
ALTERADA”**

ALVARO MAXIMILIANO URBINA URBINA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: MARCO GALLEGUILLOS
PROFESOR CONSEJERO	: HECTOR ADARMES
PROFESOR CONSEJERO	: JOSE PIZARRO

SANTIAGO, CHILE
2005

Índice de Contenidos

Resumen	
Introducción	1
Revisión bibliográfica	
1. Anatomía y Fisiología de la Articulación.....	4
2. Fisiopatología de la Osteoartritis.....	10
3. Metaloproteinasas.....	17
4. Regulación de actividad de las Metaloproteinasas...	19
5. Metaloproteinasas 2 y 9 (Gelatinasas A y B).....	23
Objetivos	
Objetivo General.....	28
Objetivos Específicos.....	28
Material y Método	
A. Material Biológico.....	29
B. Preparación y procesamiento del líquido sinovial	31
C. Determinación de Proteína.....	31
D. Determinación de la actividad gelatinolítica.....	31
D.1 Determinación de la Masa Molecular de las bandas con actividad gelatinolítica.....	32
D.2 Cuantificación de la actividad gelatinolítica mediante densitometría.....	32
E. Análisis de datos.....	33
Resultados	34
Discusión	42
Conclusiones	47
Bibliografía	48

Resumen

En el presente trabajo se mide la actividad gelatinásica (MMP-2 y MMP-9) por medio de zimografía en el líquido sinovial de articulaciones metacarpo-falángicas normales y alteradas. Para ello se analizan 84 articulaciones, 37 de las cuales presentan el cartílago articular y membrana sinovial normal, 17 tienen su cartílago articular normal y su membrana sinovial alterada, 21 presentan sólo su cartílago articular alterado y 9 articulaciones presentan ambas estructuras alteradas.

Los objetivos de esta memoria son cuantificar y comparar la actividad de la MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía en el líquido sinovial de articulaciones normales y alteradas.

En el 100% de las articulaciones analizadas (84) independiente de su condición, se encontró la presencia de una banda gelatinolítica de 70 kDa que corresponde a la pro MMP-2, que es constitutiva de las articulaciones diartrodiales normales en los equinos.

En el 84% de las articulaciones con cartílago articular y membrana sinovial normal (NN) (31), se encontró una segunda banda gelatinolítica de 100 kDa que corresponde a la pro MMP-9.

En el 25% del total de articulaciones analizadas (21) se encontró una banda tenue con baja actividad gelatinolítica de 240 kDa que correspondería a la forma dimérica de la pro MMP-9 unida a su TIMP-1.

Con respecto al número total de bandas en las muestras NN se encontró que un 8% presentó solo 1 banda, el 27% presentó 2 bandas, el 41% presentó 3 bandas, el 16% presentó 4 bandas, el 5% presentó 5 bandas y finalmente el 3% presentó 1 banda.

En ninguna de las zimografías realizadas se pudo detectar la forma activa de las gelatinasas.

Las unidades relativas, obtenidas por densitometría, para ambas gelatinasas (pro MMP-2 y pro MMP-9) no mostraron diferencias significativas en los 4 grupos analizados.

Abstract

In the present study zymography was used to measure gelatinase activity (MMP-2 and MMP-9) in synovial fluid of healthy and diseased metacarpal-phalangeal joints of horses. A total of 84 samples was studied, 37 of which had healthy cartilage and synovial membrane, 17 had normal cartilage and altered synovial membrane, 21 had altered cartilage and healthy synovial membrane, and the remaining 9 had both structures altered.

The main target of this assay was to quantify and compare the activity of MMP-2 and MMP-9 in synovial fluid of healthy and altered joints using zymography.

All samples regardless of their status (84) presented a gelatinolytic band of 70 Kda, corresponding to the pro-MMP-2, a normal constituent of all healthy diarthrotic joints of horses.

84% (31) of joints with healthy cartilage and synovial membrane, presented a second gelatinolytic band of 100 KDA, corresponding to the presence of pro-MMP-9.

25% of all samples analyzed (21) had a slim band of low gelatinolytic activity of 240 Kda corresponding to dimers resulting from the union of pro-MMP-9 and TIMP-1.

In regards to the total number of bands in healthy samples, 8% had 1 band, 27% had 2 bands, 41% had 3 bands, 16% had 4 bands, 5% had 5 bands, and 3% had 1 band.

None of the zymographies done could detect the active forms of the gelatinase enzymes.

The relative units for both gelatinase enzymes (pro-MMP-2 and pro-MMP-9), obtained by densitometry, showed no differences in the four groups tested.

Introducción

Los equinos desarrollan variadas funciones relacionadas con la vida cotidiana de muchos seres humanos, que involucran desplazamiento y carga, ambos asociados al trabajo del sistema músculo esquelético.

Existen diversas enfermedades del sistema osteoarticular que tienen un fuerte impacto sobre el rendimiento de los equinos, que implican pérdidas económicas debido a que la cojera resultante de una lesión articular y de una enfermedad articular, conducen a un menor rendimiento y a un retiro temprano de la actividad que desempeñan estos ejemplares.

Además, debido a los regímenes de entrenamiento y a las limitaciones económicas en el caso del equino de deporte, el período de reposo de estos ejemplares es restringido o simplemente eliminado, lo que impide muchas veces una adecuada recuperación. Esto puede constituir un riesgo, debido a la síntesis prolongada de factores relacionados con la inflamación, entre ellos de enzimas degradativas que afectan a los componentes de la matriz del cartílago articular.

El daño articular y la enfermedad articular son las causas más comunes de cojera en los equinos y en conjunto representan el mayor porcentaje de casos clínicos en la consulta veterinaria. La articulación metacarpo-falángica y del carpo son afectadas con mayor frecuencia.

La claudicación puede ser localizada por el dolor articular, pero la severidad o duración de esta enfermedad articular, a menudo, no puede ser reconocida a partir del

examen físico. El análisis del líquido sinovial puede ser usado como un método para evaluar la condición de la articulación.

Para maximizar el potencial de cualquier intervención terapéutica en la enfermedad articular, es esencial su diagnóstico en el estado inicial. En la actualidad, las técnicas diagnósticas disponibles tales como la radiografía o procedimientos más invasivos como la artroscopia, sólo son eficaces una vez que la enfermedad está bien establecida. Por esto resulta atractiva la posibilidad de usar marcadores moleculares, por ejemplo las metaloproteinasas, dado su papel central en el desarrollo de la osteoartritis, para detectar los cambios en el cartílago articular, antes que los procesos irreversibles asociados a la enfermedad puedan ocurrir, es decir, la artrosis. Además, estos marcadores moleculares podrían ser útiles para el seguimiento y evaluación del estado del cartílago articular durante el transcurso de las terapias.

Se ha elegido el líquido sinovial porque las metaloproteinasas son enzimas secretadas a este medio líquido, el que además es de fácil obtención y cuyas modificaciones en su composición normal como consecuencia de una inflamación, reflejan los cambios físicos y químicos del medio ambiente articular.

De este modo, conocida la condición de la articulación se podrían instaurar tratamientos que disminuyan la degradación del cartílago articular, y cuya evolución también podría ser evaluada a través de la determinación de las metaloproteinasas, con el objetivo de prolongar la vida útil y mejorar el rendimiento atlético de los ejemplares que padecen de la enfermedad articular.

Uno de los desafíos para la medicina veterinaria es contar con un diagnóstico temprano de la enfermedad degenerativa articular, por lo que en este trabajo se plantea, con esta finalidad, la determinación en el líquido sinovial de proteasas conocidas como

metaloproteinasas. En esta memoria de título, se compara la actividad de la metaloproteinasa 2 y 9 en el líquido sinovial extraído de articulaciones normales y alteradas, mediante zimografía.

Revisión Bibliográfica

1. Anatomía y Fisiología de la Articulación:

El término articulación se refiere a los elementos estructurales que unen dos o más huesos a nivel de sus superficies de contacto. La articulación metacarpo-falángica está compuesta por el extremo distal del hueso metacarpiano principal, la extremidad proximal de la primera falange y los dos huesos sesamoideos proximales (Sisson y Grossman, 1994).

La articulación diartrodial en el equino (Figura 1), ha sido descrita como una estructura dependiente de las propiedades físico-químicas del cartílago articular hialino, de la membrana sinovial, del líquido sinovial, como también de un adecuado soporte del hueso subcondral y de la estabilización por fascias, ligamentos colaterales e intra articulares y músculos (Spiers *et al.*, 1994). Sus funciones principales son permitir el movimiento de las extremidades en asociación con los músculos y tendones, permitir la distribución y transferencia de cargas y soportar el sistema músculo esquelético (Todhunter, 1996).

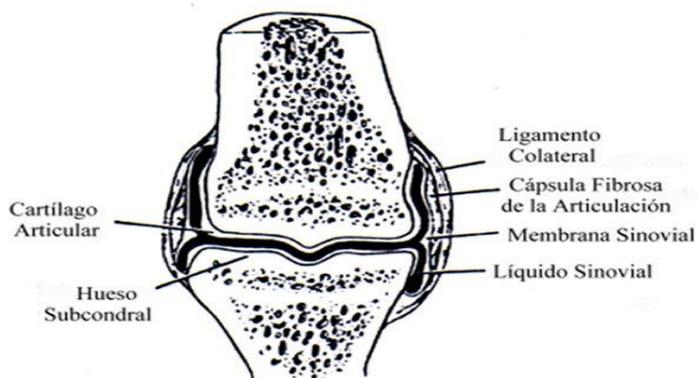


Figura 1. Esquema de una articulación diartrodial normal.

La piel y el tejido subcutáneo componen la pared externa de la cápsula articular que rodea y protege a la articulación. La cápsula articular está ricamente innervada con receptores propioceptivos y del dolor (Byars *et al.*, 1982).

La pared interna de la cápsula articular está conformada por la membrana sinovial la cual presenta dos zonas, la íntima y subíntima. La íntima es una pared incompleta, de uno a cuatro sinoviocitos de grosor, inmediatamente adyacente al líquido sinovial. La íntima descansa sobre una pared de tejido conectivo denominada subíntima o lámina propia, que puede ser de tejido fibroso, areolar o adiposo (Todhunter, 1996). La membrana sinovial está compuesta de sinoviocitos A y B. Las células tipo A son macrófagos de la membrana sinovial, por lo tanto, con función fagocítica. Las células tipo B o fibroblastos especializados sintetizan el ácido hialurónico que forma parte del fluido sinovial. La función de la membrana sinovial es la de proporcionar una barrera selectiva a los componentes del plasma, determinando de esta manera su composición (Palmer y Bertone, 1994).

El líquido sinovial (LS) es un ultra filtrado de plasma, por lo cual ambos presentan una composición similar en cuanto a iones y moléculas, con la excepción del ácido hialurónico, que se encuentra en altas concentraciones en el líquido sinovial. La viscosidad del líquido sinovial es proporcionada por el ácido hialurónico, cuya concentración normal en el equino es de alrededor de 0,5 mg/ml (Todhunter, 1996). Las proteínas de masa molecular elevada, están generalmente excluidas del espacio intra sinovial. La concentración de proteínas en este líquido es aproximadamente el 25 a 35% de la concentración de proteínas del plasma del mismo animal. La concentración de proteína en articulaciones normales de equinos es de 1.81 ± 0.26 g/dl (Trotter y McIlwraith, 1996).

Las funciones del LS son lubricar, proteger, suministrar los nutrientes al cartílago articular y proporcionar el medio que permite eliminar los desechos metabólicos del condrocito, célula perteneciente al cartílago articular. Las alteraciones en el grosor de la membrana sinovial (adelgazamiento o engrosamiento) o de su permeabilidad relativa, originan cambios en el volumen y la composición del LS (Trotter y McIlwraith, 1996).

La apariencia visual del LS puede ser extremadamente útil para el diagnóstico de diversas patologías. El LS normal es amarillo pálido, y sin flóculos. Un líquido sinovial hemorrágico representa una situación traumática aguda, mientras que una coloración amarillo oscuro es producto de hemorragias previas y es asociada a menudo con artritis traumáticas crónicas. La presencia de opacidad y flóculos en la muestra de LS es indicativo de sinovitis. La viscosidad del LS está directamente relacionada con el contenido de ácido hialurónico cuya disminución implica inflamación, pero no necesariamente infección (Trotter y McIlwraith, 1996).

El cartílago articular es el tejido responsable de soportar las cargas compresivas de las articulaciones durante el movimiento, gracias a sus propiedades de visco-elasticidad frente a las cargas dinámicas. Sin embargo, una vez dañado tiene una capacidad limitada o mínima de regeneración y a menudo evoluciona hacia cambios patológicos degenerativos (Mardones y Figueroa, 2001).

El cartílago articular es una forma especializada de tejido conjuntivo, constituido por los elementos celulares denominados condrocitos, que se disponen en una matriz extracelular dura de tipo gel (Mardones y Figueroa, 2001). Esta estructura que recubre la epífisis del hueso subcondral en el animal adulto carece de vasos sanguíneos, linfáticos y de nervios. Sin embargo, los vasos sanguíneos pueden penetrar las estructuras cartilaginosas

en aproximadamente 3 mm en las epífisis de los huesos en desarrollo (Eurell y Van Sickle, 1998).

El cartílago articular se divide en cuatro estratos diferentes; cada uno de éstos contiene un número variable de condrocitos, rodeados de una estructura organizada denominada matriz extracelular (MEC) que está compuesta de agua, colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y proteínas de la matriz distintas del colágeno (Palmer, y Bertone, 1994). Sobre la base del peso seco, el cartílago articular contiene alrededor de un 50% de colágeno, 35% de proteoglicanos, 10% de glicoproteínas, 3% de minerales, 1% de lípidos y entre un 1 a 12% de condrocitos (Todhunter, 1996).

La estructura y abundancia de estos componentes cambian con la edad, debido a una combinación de los eventos de síntesis y degradación (Reginato y Olsen, 2002).

Cuantitativamente el principal componente orgánico de la MEC es el colágeno tipo II, ya que constituye el 85-90% del total de colágeno. Las otras fibras de colágeno presentes en una menor proporción en este cartílago son el tipo III, VI, IX, X, XI, XII y XIV. En su conjunto, la principal función de estas fibras es proporcionar resistencia al cartílago articular frente a la tensión. El recambio normal de la fibra de colágeno está mediado por colagenasas secretadas por los condrocitos. La velocidad de recambio es considerada extremadamente baja con valores aproximados de 300 y 1800 días en el perro y el humano, respectivamente (Palmer y Bertone, 1994).

Otro componente de la MEC del cartílago articular son los proteoglicanos (PG), los cuales están formados por moléculas aniónicas e hidrofílicas de azúcares (glicosaminoglicanos) unidas covalentemente a una proteína central (Roush *et al.*, 2002). Los numerosos grupos carboxilo y sulfato de los glicosaminoglicanos le proporcionan la carga negativa a estos proteoglicanos, de manera que el agua se organiza en múltiples capas

alrededor de este foco de carga eléctrica (Roush *et al.*, 2002). El más conocido de los proteoglicanos, es el agregán, una molécula de alta masa molecular ($1-2 \times 10^6$ kDa) y que se une en forma no covalente al ácido hialurónico constituyendo un agregado macromolecular. La unión no covalente de la proteína central del proteoglicano con el ácido hialurónico está estabilizada por la asociación con la proteína de unión (40-60 kDa). La microscopía electrónica muestra que la proteína central del agregán contiene tres regiones globulares (G1, G2, G3), separados por dos segmentos lineales (E1, E2). El segmento E2 contiene los sitios de unión para los glicosaminoglicanos. La mayor parte de este segmento está ocupado con largas cadenas de condroitín sulfato y con unas pocas cadenas de queratán sulfato las cuales son cortas en extensión. Los proteoglicanos sufren la degradación proteolítica en los dominios E1 y G3 por una enzima denominada estromelisina que es secretada por los condrocitos, generando así fragmentos ricos en condroitín sulfato. Los cambios agudos significan una disminución de la masa molecular y de la cantidad de proteoglicanos, lo cual deriva en la destrucción del cartílago articular (Palmer y Bertone, 1994).

Los glicosaminoglicanos (GAGs) de importancia en el cartílago articular son: el condroitín sulfato (20 kDa), queratán sulfato (5 kDa) y ácido hialurónico (10^3 kDa), este último es un GAG diferente al resto debido a que carece de grupos sulfato y es capaz de unir hasta 100 moléculas de agregán (Palmer y Bertone, 1994). Se han descrito cuatro pequeños monómeros de proteoglicanos: biglican, decorin, fibromodulina y PG-100. Ellos difieren en el tamaño de la proteína núcleo y en la cantidad de cadenas de GAGs que presentan (Palmer y Bertone, 1994).

La pared más superficial del cartílago articular adulto, contiene un gran número de condrocitos y fibras de colágeno tipo II para proporcionar una mayor resistencia frente a las cargas compresivas. Los proteoglicanos presentes en la MEC, actúan como una barrera no selectiva para la difusión de oxígeno y agua, en cambio funcionan de manera selectiva frente a nutrientes y hormonas. El número de condrocitos, de fibras de colágeno y de condroitín sulfato disminuye en los estratos más profundos del cartílago articular, mientras que la concentración de queratán sulfato aumenta, lo cual provoca un incremento de la permeabilidad de nutrientes a zonas más profundas del cartílago (Schenk *et al.*, 1986).

Los condrocitos son el único tipo de células encontradas en el cartílago maduro que son responsables en la mantención de la MEC, por lo tanto, factores que limitan la adecuada formación y reparación del cartílago pueden incluir la falta de condrocitos en el tejido. Se ha descrito que existe una disminución en el número de condrocitos articulares durante el envejecimiento (Notoya *et al.*, 2000).

Los condrocitos mantienen, recambian y perciben los cambios estructurales de la matriz resultante de procesos catabólicos. Estas células además sintetizan, organizan y regulan la composición de la MEC. El condrocito obtiene sus nutrientes (glucosa y aminoácidos) por difusión desde el líquido sinovial, el cual también es un medio para eliminar los desechos metabólicos. Estímulos químicos y hormonales provenientes del sinoviocito llegan al condrocito por medio del líquido sinovial, regulando la homeostasis del cartílago articular (Todhunter, 1996).

El tejido subarticular incluye el cartílago articular calcificado y el hueso subcondral. Las dos principales funciones del hueso subcondral son la absorción del impacto generado durante el movimiento y la mantención de la forma de la superficie articular. El hueso

subcondral proporciona el mayor porcentaje de amortiguación de la articulación (Kawcak *et al.*, 2001).

2. Fisiopatología de la Osteoartritis

La organización de los eventos moleculares involucrados en la síntesis y recambio de la matriz extracelular del cartílago articular, requiere de una meticulosa regulación de los múltiples mecanismos moleculares por parte de los condrocitos. La presentación de fenómenos patológicos en la articulación, se debe a una falla en la mantención de la homeostasis de la matriz extracelular (Platt, 1996).

La osteoartritis (OA) involucra a la totalidad de la articulación, tanto cartílago, membrana sinovial como hueso subcondral. Las células de cada uno de estos tejidos tienen la capacidad de iniciar y responder al daño articular de manera independiente, que provoca finalmente la degeneración del cartílago (Sandell y Aigner, 2001).

La OA es una patología no infecciosa, relativamente no inflamatoria que ha sido reconocida en una gran variedad de especies animales, incluidas el hombre y los equinos. Se han identificado diferentes factores contribuyentes, tales como: traumas violentos de ligamentos y de otras estructuras blandas de la articulación o lesiones más severas como fracturas intra-articulares, subluxaciones o luxaciones. Defectos en la conformación, como deformidades angulares congénitas, desbalances de las extremidades por una inadecuada corrección pueden conducir a una elongación anormal de la articulación originando potencialmente una osteoartritis (May, 1996).

La OA es una enfermedad cíclica, con períodos alternantes de actividad y remisión. La OA primaria es el resultado de una estructura defectuosa y de una alteración en la

biosíntesis del cartílago articular, mientras que la OA secundaria puede ser causada por trauma articular, condiciones inflamatorias, anormalidades congénitas, del desarrollo, metabólicas, endocrinas o iatrogénicas. El daño articular se observa con mayor frecuencia en animales viejos, debido a que se requiere tiempo para la destrucción progresiva del cartílago articular (Roush *et al.*, 2002).

En la actualidad la etiología de la osteoartritis no se conoce con exactitud. Sin embargo, existe una fuerte evidencia que los cambios observados en la OA están correlacionados con una combinación de factores mecánicos y bioquímicos (Pelletier *et al.*, 2001). Se caracteriza por un deterioro bioquímico del cartílago articular, acompañado por cambios en el hueso y tejidos blandos de la articulación lo cual produce variados grados de cojera. El diagnóstico se basa principalmente en los signos clínicos complementado con alteraciones radiográficas. Los estados tempranos de la enfermedad son difíciles de investigar ya que estas alteraciones radiográficas aparecen una vez que la enfermedad ha progresado bastante (Jouglin *et al.*, 2000).

Los signos clínicos más comunes son dolor, limitación del movimiento, crépito, efusión articular e inflamación (Roush *et al.*, 2002). Dependiendo de la naturaleza de la patología articular, los signos clínicos y radiológicos presentes en cada caso de la osteoartritis, son probablemente diferentes según la causa exacta del problema. Asociada a la OA encontramos con mucha frecuencia fenómenos de sinovitis, que puede constituir el proceso primario que estimula la destrucción enzimática del cartílago y que también puede ser inducida por la liberación traumática de partículas desde el cartílago articular (May, 1996).

Se han descrito dos mecanismos que generan la destrucción del cartílago. Un mecanismo intrínseco, mediante el cual los condrocitos inducen o participan en la

degradación de la matriz del cartílago articular y un segundo mecanismo que involucra otros tejidos y células, entre los cuales se encuentran la membrana sinovial y las células inflamatorias. Por ambas vías la digestión enzimática de la matriz genera la destrucción del cartílago articular (Yoshihara *et al*, 2000).

El proceso patológico no sólo afecta al cartílago articular, sino que además se altera la membrana sinovial, el hueso subcondral, ligamentos y músculos periarticulares. Los cambios inflamatorios sufridos por el sinoviocito durante la OA incluyen: hipertrofia e hiperplasia sinovial con un incremento en el número de células de la íntima y una infiltración en la subíntima por células inflamatorias. La inflamación sinovial es claramente reflejada en varios de los signos y síntomas de la OA, incluyendo la tumefacción y efusión articular, endurecimiento y algunas veces enrojecimiento de la articulación (Pelletier *et al.*, 2001).

La degradación de proteoglicanos, conduce a una pérdida progresiva de la capacidad de amortiguar del cartílago articular haciéndolo más susceptible al daño mecánico. Eventualmente el hueso subcondral puede ser expuesto, producto de una pérdida completa del cartílago en algunas zonas de la superficie articular (May, 1996).

La fibrilación, la disminución de la MEC y cambios en su composición reflejan la conducta aberrante de los condrocitos. Aunque los factores biomecánicos están fuertemente implicados, en la actualidad no se conocen con exactitud los estímulos que regulan el fenotipo hiperactivo de los condrocitos osteoarthríticos, incluyendo su capacidad para expresar las enzimas degradativas del cartílago (Tetlow *et al.*, 2001).

En etapas iniciales de la OA, los condrocitos exhiben una respuesta proliferativa transitoria, incrementando la síntesis de moléculas de la MEC, en un intento por reparar el cartílago. Además, se incrementa la síntesis de citoquinas proinflamatorias y de enzimas

degradativas de la matriz. Estas citoquinas también pueden ser generadas por los sinoviocitos tipo A y B, en respuesta a los productos degradativos del cartílago dañado. La pérdida local de proteoglicanos y la degradación del colágeno tipo II ocurre inicialmente en la superficie del cartílago articular, provocando un aumento del contenido de agua y una pérdida de la fuerza de tensión de la matriz a medida que progresa la lesión (Goldring, 2000).

A nivel histopatológico, la OA está caracterizada por la fibrilación de la superficie articular, pérdida de proteoglicanos (PG), adelgazamiento o pérdida del cartílago articular hacia el hueso subcondral, pérdida o proliferación de condrocitos. La proliferación de condrocitos no es suficiente para reparar el daño del cartílago articular. Todos estos cambios histopatológicos determinan los signos radiográficos de la osteoartritis, aparición de osteofitos peri articulares, degeneración de la cápsula articular y esclerosis del hueso subcondral (Roush *et al.*, 2002).

Un gran número de mediadores químicos son reconocidos por participar en la degeneración del cartílago articular, por ejemplo las prostaglandinas, leucotrienos, radicales libres, proteasas y óxido nítrico (Price *et al.*, 1992).

Las citoquinas son otra clase de mediadores que tienen un papel central en la regulación de la comunicación intercelular y son críticas en la determinación de las características fenotípicas del cartílago normal y patológico. Las citoquinas son definidas como péptidos solubles que afectan la actividad celular en forma positiva o negativa (Price *et al.*, 1992).

Existen factores genéticos y bioquímicos, además del estrés mecánico, que contribuyen a la lesión del cartílago durante la osteoartritis por una ruptura en la asociación matriz-condrocito y por una alteración de la respuesta metabólica en el condrocito. Esto

genera un incremento en la síntesis de citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas (MMPs), que conduce finalmente a la activación de procesos de apoptosis y destrucción de los componentes de la MEC (colágeno tipo II y PGs) (Goldring, 2000).

Dentro de las citoquinas proinflamatorias se ha observado que la interleuquina 1 β (IL-1 β) tiene un papel preponderante. Esta citoquina es sintetizada inicialmente como un precursor, y liberada al medio extracelular en una forma inactiva. Una proteasa denominada enzima convertidora de IL-1 β (ECI) o captasa 1, localizada en la membrana plasmática, es la responsable de generar la forma activa o madura de esta citoquina. Se ha demostrado que el nivel de esta enzima se encuentra aumentado, tanto en el condrocito como en sinoviocito durante la osteoartritis. Por otra parte se ha observado que durante la OA se produce un aumento significativo del receptor a IL-1 β en condrocito y sinoviocito, dando a estas células una alta sensibilidad frente a la estimulación por IL-1 β (Pelletier *et al.*, 2001).

La IL-1 β es capaz de inducir la síntesis de metaloproteinasas, eicosanoides, factor activador del plasminógeno, proteínas de la fase aguda de la inflamación y la inhibición de la síntesis de macromoléculas de la matriz extracelular como colágeno y proteoglicanos, además es un potente estimulador de la resorción ósea (Palmer y Bertone, 1994).

Otra importante citoquina proinflamatoria es el factor de necrosis tumoral (TNF) que en sus formas α y β , tienen un rango de efectos biológicos similares a la IL-1 β . El TNF estimula la resorción ósea y de cartílago, induce la síntesis de prostaglandinas y de metaloproteinasas en el cartílago. Sin embargo, su acción es menos potente que la IL-1 β (Price *et al.*, 1992). Además, esta citoquina estimula la acumulación de neutrófilos y monocitos en la articulación por incremento de la adhesión a las células endoteliales de una manera similar a la realizada por la IL-1 β (Palmer y Bertone, 1994).

La activación del TNF- α ocurre por proteólisis en la superficie celular, por la acción de una enzima convertidora de TNF- α (TACE). Se ha descrito que existe un aumento de esta enzima en la osteoartritis (Pelletier *et al.*, 2001). Una vez secretado el TNF- α forma trímeros, que se unen a dos receptores específicos denominados TNFR-55 y TNFR-75, siendo el primero el receptor predominante en condrocitos y sinoviocitos durante la osteoartritis (Pelletier *et al.*, 2001).

No se puede descartar la participación de otras citoquinas proinflamatorias como la IL-8, IL-6, IL-11 y IL-17, puesto que están sobre expresadas en tejidos osteoatríticos, y podrían contribuir en la patogénesis de la enfermedad (Pelletier *et al.*, 2001).

Se ha observado que la membrana sinovial y el cartílago articular producen espontáneamente algunas citoquinas antiinflamatorias como la IL-4, IL-10 y IL-13, cuya concentración se encuentra incrementada en el líquido sinovial en la osteoartritis. El efecto antiinflamatorio se expresa en la reducción de la producción de la IL-1 β , TNF- α y metaloproteinasas, e incrementan la producción de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), además de inhibir la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Pelletier *et al.*, 2001).

Tanto el cartílago osteoatrítico como la membrana sinovial expresan la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclo oxigenasa 2 (COX-2) que catalizan la síntesis de óxido nítrico (NO) y de prostaglandina E₂ (PGE₂) respectivamente. Se ha establecido que el NO, PGE₂ y las metaloproteinasas tienen un papel en la cascada de degradación del cartílago, como también en la homeostasis del cartílago articular (von Rechenberg *et al.*, 2000).

La producción endógena de óxido nítrico puede suprimir la síntesis de la matriz, existiendo además evidencia que puede inducir la apoptosis de los condrocitos. Muchas

enzimas, incluidas la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la ciclo oxigenasa 2 (COX-2) y la fosfolipasa A₂, modulan las funciones de los condrocitos durante la osteoartritis. Los condrocitos son capaces de expresar estas enzimas cuando son estimuladas sólo por la IL-1 β o en combinación con el TNF- α (Goldring, 2000).

La PGE₂ participa en la fase temprana de la inflamación, en la generación de dolor, y en el incremento de la permeabilidad vascular. Estudios realizados en cultivo celular de condrocito humano osteoartrítico, indicaron que la PGE₂ favorece la apoptosis inducida por el óxido nítrico, no siendo este eicosanoide por sí mismo el causante directo de la muerte celular (Notoya *et al.*, 2000).

En los últimos años se ha establecido la participación de la forma inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS) en la fisiopatología de la OA. Los niveles de esta isoenzima están aumentados tanto en la membrana sinovial como en el condrocito en articulaciones osteoartríticas. Esto genera un aumento en la producción de NO el cual es el responsable de la inducción de las vías catabólicas que conducen a la degradación del cartílago articular. Se ha demostrado en modelos animales de OA que la inhibición selectiva de la iNOS reduce la progresión de la OA (Pelletier *et al.*, 2001).

El cartílago articular osteoartrítico produce una gran cantidad de NO asociado a un alto nivel de nitrito – nitrato presente en líquido sinovial y suero de pacientes con OA. El óxido nítrico puede inhibir la síntesis de macromoléculas de la matriz extracelular (como el agregán), además tiene la propiedad de activar las metaloproteinasas, afectar negativamente el metabolismo del colágeno, mejorar la producción de prostaglandina E₂ y por último el óxido nítrico se ha asociado con la apoptosis de condrocitos durante la osteoartritis (Jang y Murrell, 1998; Pelletier *et al.*, 2001).

3. Metaloproteinasas

La capacidad para degradar proteínas extracelulares es esencial para cualquier célula que interactúa con su ambiente y para organismos multicelulares que se desarrollan y funcionan con normalidad. Se ha identificado una familia de proteinasas denominadas metaloproteinasas (MMPs) por su dependencia de un ion metálico zinc para su actividad catalítica (Sternlicht y Werb, 2001).

Las MMPs se encuentran tanto en especies invertebradas como vertebradas. En los vertebrados, ellas son expresadas principalmente por células de tejido conectivo y por células originadas desde la médula ósea. Las MMPs son enzimas extracelulares (excepto para las metaloproteinasas unidas a membrana TM-MMP), las cuales son secretadas como pro-enzimas (Morgunova *et al.*, 1999).

Las MMPs están involucradas tanto en la remodelación normal del tejido conectivo como también, en los estados patológicos asociados con la inflamación aguda o crónica y en los procesos de metástasis tumoral (Trocmé *et al.*, 1998). Estas enzimas degradan proteínas estructurales de la matriz extracelular, moléculas de la superficie celular y otras proteínas pericelulares (Sternlicht y Werb, 2001).

Se han identificado 25 miembros de la familia de las metaloproteinasas, los cuales tienen diversa especificidad de sustratos pericelulares (Sternlicht y Werb, 2001). Se han clasificado en subgrupos de acuerdo al sustrato específico que ellas degradan; el primer grupo está compuesto por las colagenasas (MMP-1,-8,-13) que tienen preferencia por las fibras de colágeno tipo I, II, III, VII, VIII, y X; el segundo grupo lo integran las gelatinasas (MMP-2,-9) que degradan el colágeno tipo IV y V y la proteína central del agregón; el tercer grupo son las estromelinas (MMP-3,-10,-11) que degradan una variedad de

sustratos de la matriz tales como: proteoglicanos, laminina y fibronectina, además ellas activan a las formas latentes de las MMP-1,-3,-8,-9 y 13. El cuarto grupo corresponde a las metaloproteinasas unidas a membrana (MT- MMP -14,-15,-16, y 17) (Sternlicht y Werb, 2001). La MT- MMP-14 y 15 activan a las formas latentes de las MMP-2 y 13 (Uchida *et al.*, 2000). Por último en el quinto grupo se encuentran las MMP-7,-12,-18,-19,-20,-21,-22-23,-24,-25,-26,-27,-28 (Sternlicht y Werb, 2001).

Todas las metaloproteinasas tienen una secuencia N-terminal o pre-dominio que es removido después de su síntesis en el retículo endoplásmico. Este pre-dominio es seguido por un propéptido o prodominio que mantiene a la enzima en un estado de latencia (Pro enzima o zimógeno) y luego por un dominio catalítico que contiene las regiones ricas en zinc. Además, tienen un dominio rico en hemopexina/ vitronectina que están conectados al dominio catalítico. Cuando está presente el dominio hemopexínico se favorece la unión al TIMP y a ciertos sustratos. En la Figura 2 se muestra la estructura de las gelatinasas. (Sternlicht y Werb, 2001).

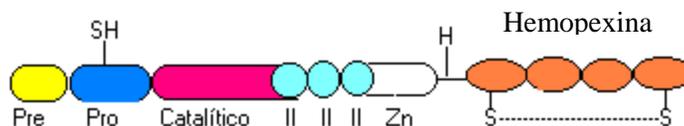


Figura 2. Estructura de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9)

Un residuo cisteína, estrictamente conservado en el dominio propéptido de todas las MMPs, es esencial para mantener a las metaloproteinasas en un estado de zimógeno. Se ha sugerido que el grupo sulfhidrido del aminoácido cisteína está modulando al ión Zn^{2+}

catalítico y que la interrupción de esta interacción causa su activación, proceso denominado *mecanismo interruptor de la cisteína* (Morgunova *et al.*, 1999).

En el estado de latencia, la enzima tiene intacta la interacción cisteína-zinc, pero numerosos agentes tales como: otras metaloproteinasas, agentes alquilantes, órgano mercuriales y compuestos disulfóxidos pueden disociar la cisteína del átomo de zinc, generando la forma activa de las MMPs (Richardson y Dodge, 1998).

Una excesiva o inapropiada producción de MMPs puede contribuir en la patogénesis de varios procesos degradativos de tejidos, que incluyen a la OA y a otras enfermedades altamente prevalentes tales como: esclerosis múltiple, pérdida de dientes, progresión y metástasis de tumores, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Shapiro, 1998). También se incluyen enfermedades cardiovasculares, como la arteriosclerosis y en la formación de aneurismas (Longo *et al.*, 2002). A nivel articular el incremento de la actividad de las MMPs se asocia a un aumento en la permeabilidad de los capilares sinoviales, que se traduce en un incremento en la concentración de proteínas totales en el líquido sinovial, entre las cuales se encuentran albúmina, proteínas inflamatorias como la globulina, el fibrinógeno y varias enzimas (Cornelissen *et al.*, 1998).

4. Regulación de la Actividad de las Metaloproteinasas (MMPs):

En el funcionamiento de las MMPs se requiere un alto grado de regulación a distintos niveles dado que participan en distintos procesos fisiológicos que requieren un delicado balance de su actividad degradativa. Así las MMPs son reguladas en los siguientes niveles:

- a) Regulación transcripcional / post transcripcional, la función individual de las MMPs está determinada por sus patrones diferenciales de expresión, reguladas por

numerosos factores estimulatorios e inhibitorios tales como, proteínas de la matriz extracelular, estrés celular y cambios en la forma celular. Estos factores son mediados a través de la expresión de citoquinas y factores de crecimiento, incluidas las interleuquinas, interferón y TNF- α , TGF- β (Sternlicht y Werb, 2001). Así, la IL-1 provoca una significativa producción o expresión de la MMP-3 y -13 por células del cartílago articular. A su vez, la MMP-9 tiene una mayor sensibilidad a la inducción por citoquinas que la MMP-2 (Clegg y Carter, 1999). Se ha demostrado que la MMP-9 es inducida por la IL-1 en una gran variedad de tipos celulares incluidos los condrocitos y sinoviocitos tipo A, mientras que los sinoviocitos tipo B son resistentes a la inducción de MMP-9 por la IL-1 β (Clegg y Carter, 1999).

- b) Regulación a través del proceso de activación del zimógeno. En su forma de proenzima las metaloproteinasas pueden ser activadas, *in vitro*, por agentes químicos como el APMA (acetato de p-aminofenilmercurio), HgCl₂, SDS, además pueden ser activadas por la plasmina y también por otras MMP ya activas (Visse y Nagase, 2003). Estos agentes provocan un cambio conformacional en la pro MMP que desbloquea su sitio activo lo que gatilla su autoproteolisis transformando la enzima a la forma activa (Yoshihara *et al.*, 2000)
- c) Otro nivel de regulación se produce por la acción de los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) sobre la forma activa de metaloproteinasas.

Las MMPs son indispensables para la degradación de la matriz extracelular, pero su regulación por los TIMPs y otros inhibidores es extremadamente importante. Cualquier perturbación de esta regulación puede resultar en el desarrollo de procesos fibróticos

(cuando la concentración del inhibidor es mayor que la concentración de la enzima) o en la excesiva degradación (cuando la concentración del inhibidor es menor que la concentración de la enzima) (Cimpean y Coloianu, 1997).

Los TIMP representan una familia de al menos cuatro proteínas secretadas de 20-29 kDa, que inhiben de manera reversible las formas activas de las MMPs, formando complejos bimoleculares no covalentes en una relación de 1:1. Los TIMP no son los únicos inhibidores endógenos de las MMPs; la α -2 macroglobulina es el mayor inhibidor endógeno de las MMPs, debido a que esta proteína es abundante en el plasma. Los complejos α -2 macroglobulina/MMP son eliminados mediante endocitosis, por lo tanto, esta proteína juega un papel importante en la degradación proteolítica de las MMPs, mientras que los TIMP actúan de manera reversible (Sternlicht y Werb, 2001). La α -2 macroglobulina permanece excluida de la matriz extracelular del cartílago articular intacto debido a su tamaño de 750 kDa y por lo tanto, es incierto su papel en la inhibición de las MMPs a este nivel. Las moléculas mayores de 160 kDa son incapaces de entrar al líquido sinovial de articulaciones normales, pero es posible que en articulaciones inflamadas, tal como, en la artritis séptica, la α -2 macroglobulina sea capaz de entrar, proveniente de la circulación. Sin embargo, no se detectó actividad inhibitoria por acción de α -2 macroglobulina en esas articulaciones (Clegg *et al.*, 1998).

Los TIMP son producidos por una gran variedad de tipos celulares y de tejidos, tal como, condrocitos, sinoviocitos tipo B, fibroblastos de la piel, polimorfos nucleares, macrófagos alveolares, osteoclastos y por varios tipos de células tumorales (Clegg *et al.*, 1998).

La expresión de los TIMP está regulado por varios agentes, por ejemplo el TIMP-1 es inducido en varios tipos celulares por factores pro-inflamatorios, entre los cuales se encuentran la IL-1 y el TNF- α (Clegg *et al.*, 1998).

Durante la enfermedad articular del equino, los condrocitos y sinoviocitos son capaces de producir los TIMP-1 y TIMP-2, mientras que los monocitos sanguíneos sólo son capaces de producir el TIMP-1. Los TIMP, además de inhibir las formas activas de las MMPs también inhiben o retardan la activación de los zimógenos. El TIMP-1 interactúa con la MMP-9, mientras que, el TIMP-2 lo hace con la MMP-2. El complejo MMP-9/TIMP-1 tiene un papel en la inhibición de la MMP-3 y este complejo es capaz de ceder el TIMP a esta MMPs. El peso molecular de los dos inhibidores identificados en el equino es de 29 y 22 kDa para el TIMP-1 y TIMP-2 respectivamente, cuando son medidos bajo condiciones no reductoras (Clegg *et al.*, 1998).

La mayoría de las MMPs (>95%) en el tejido articular están presentes en una forma latente o inhibida. Sin embargo, durante la osteoartritis, las MMPs están presentes en altas concentraciones en relación a los TIMP y las formas latentes son activadas por otras MMPs o citoquinas. Por lo tanto, cada MMP tiene un papel en el desarrollo de la osteoartritis que puede variar de acuerdo a la especie y al estado de la enfermedad articular (Trumble *et al.*, 2001).

La activación extracelular de la mayoría de las MMPs puede ser iniciada por otras MMPs ya activadas o por muchas proteinasas del tipo serin-proteinasa que pueden dividir los péptidos unidos al prodominio de éstas. Sin embargo, la MMP-2 es refractaria a este tipo de activación, ya que requiere de un paso múltiple que involucra a la MT-MMP y al TIMP-2. Primero la MT-MMP de la superficie celular es inhibida por el extremo N-

terminal del TIMP-2, mientras que el extremo C-terminal de este TIMP actúa como un receptor para el dominio hemopexina de la pro-MMP-2. Luego una MT-MMP adyacente divide proteolíticamente y activa a la pro-MMP-2 unida a su receptor. Finalmente, una porción residual del pro-péptido de la MMP-2 es removida por otra molécula de MMP-2 activada, generándose la forma activa de la MMP-2 (Sternlicht y Werb, 2001).

El rol del TIMP-2 es fundamental para la activación de la MMP-2, no obstante, mientras que el C-terminal participa en la activación de la MMP-2, su N-terminal actúa como inhibidor. Niveles bajos a moderados de TIMP-2 promuevan la activación de MMP-2, mientras que altos niveles inhiben su activación por saturación de las MT-MMP libres que son necesarias para la remoción del prodominio de la MMP-2 (Sternlicht y Werb, 2001).

5. Metaloproteinasas 2 y 9 (Gelatinasas A y B)

Las Gelatinasas se distinguen del resto de las MMPs, por la inserción de tres cabezas ricas en cisteína al dominio catalítico, las cuales permiten que las gelatinasas se unan y degraden el colágeno y elastina (Sternlicht y Werb, 2001).

Las MMPs 2 y 9 son el producto de distintos genes y están reguladas de manera diferente. Su expresión puede ser modulada por mediadores solubles tales como: factores de crecimiento, citoquinas, oncogenes y promotores tumorales. La MMP-2 es la MMP más ampliamente distribuida, siendo producida por varios tipos de células particularmente fibroblastos y células endoteliales. Esta enzima fue aislada de células tumorales malignas y se encuentra altamente expresada en el estroma celular que rodea las zonas de metástasis (Morgunova *et al.*, 1999). La MMP-9 también puede ser secretada por células

mesenquimales después de la inducción con citoquinas u otros agentes, pero es producida principalmente por monocitos, macrófagos, linfocitos T y células tumorales (Trocmé *et al.*, 1998).

Las gelatinasas son producidas por distintos tipos celulares en el equino y estas enzimas han sido encontradas en niveles elevados en el líquido sinovial de caballos con osteoartritis. En el equino la MMP-2 es secretada por sinoviocitos tipo B y condrocitos, mientras que, la MMP-9 es secretada por los condrocitos, sinoviocitos tipo A, monocitos sanguíneos y polimorfos nucleares neutrófilos (Clegg *et al.*, 1997).

Las gelatinasas representan un subgrupo de las MMPs y consisten en 2 productos distintos con actividad enzimática similar; en el ser humano existe una gelatinasa de 70kDa (pro MMP-2) expresada por la mayoría de células del tejido conectivo y una gelatinasa de 92kDa (pro MMP-9) expresada por células inflamatorias y por células tumorales (Clegg *et al.*, 1997).

En el equino, Clegg *et al.* (1997) describió que la pro MMP-2 es una enzima de 64 kDa cuya forma activa es de 59 kDa, mientras que el monómero de la pro MMP-9 es de 94 kDa y su forma activa es de 85 kDa. La MMP-9 puede formar dímeros de 225kDa. Esta dimerización ocurre cuando la MMP-9 está presente en exceso en relación a los TIMP. Esto podría implicar que las muestras donde el dímero está presente, la enzima está presente en exceso de su inhibidor y así es más probable que sea biológicamente activa.

La forma latente de la gelatinasas MMP-2 y MMP-9 están en elevada concentración en relación con la forma activa, en fluido sinovial de equinos con y sin enfermedad articular. Trumble *et al.*, (2001), encontraron que la forma latente de la MMP-2 está presente en todas las muestras de líquido sinovial. La presencia de la pro MMP-2 en articulaciones normales, sugiere su papel constitutivo y homeostático para la remoción del

colágeno anormal de la matriz extracelular. La pro MMP-2 sólo es activada en la enfermedad articular y no en articulaciones normales (Trumble *et al.*, 2001).

La MMP-9 es producida y liberada dentro del fluido sinovial por condrocitos y sinoviocitos en la enfermedad articular, pero no en articulaciones clínicamente normales. La MMP-9 es producida principalmente por neutrófilos, que es la fuente principal de esta enzima en el líquido sinovial. Debido a la naturaleza cíclica de las fases tempranas de la OA, las concentraciones de la pro MMP-9 puede ser baja durante los períodos de reposo y se incrementa durante los períodos de inflamación (Trumble *et al.*, 2001).

La estromelina (MMP-3) ha sido implicada como la enzima clave en la patogénesis de la osteoartritis, ya que ella participa en la degradación del agregán y del colágeno y en la activación de la MMP-1,-3,-8,-9 y -13. En el trabajo de Trumble *et al.* (2001), el mRNA de la MMP-3 fue expresado en un 86 % de las muestras de membrana sinovial y en un 80 % de las muestras de cartílago articular patológico, confirmando su importancia en la patogénesis de la enfermedad articular. La producción de esta enzima por varios tipos celulares es estimulada por la IL-1 (α y β) (Trumble *et al.*, 2001).

La MMP-2 y -9 tienen alta afinidad por el colágeno denaturado, pudiendo actuar como una colagenasa, hidrolizando la triple hélice del colágeno. La digestión del colágeno puede ser importante en la patogénesis de la enfermedad articular. El colágeno tipo XI está localizado específicamente en el cartílago, entre las fibras de colágeno tipo II de la matriz o en la superficie de los condrocitos y es digerido por la MMP-2 y -9. El colágeno tipo XI interactúa fuertemente con los proteoglicanos y podría jugar un papel en la estabilización de la matriz actuando como un exocitosqueleto. Además, el colágeno tipo XI no es degradado por otras colagenasas (Clegg *et al.*, 1997).

La MMP-9 también degrada la proteína central del agregón y las proteínas de unión mientras que la MMP-2 divide al agregón de manera similar a la MMP-3. Las gelatinasas también pueden tener un papel importante en la enfermedad articular, debido a que potencian sinérgicamente la acción de colagenasas para degradar el colágeno (Clegg *et al.*, 1997).

En la tabla N°1 se muestran algunos de los sustratos sobre los cuales actúan las gelatinasas (Sternlicht y Werb, 2001).

<i>Sustrato</i>	<i>MMP-2</i>	<i>MMP-9</i>
Agregón	+	+
Colágeno tipo I	+	-
Colágeno tipo III	+	-
Colágeno tipo IV	+	+
Colágeno tipo XI	+	+
Decorín	+	+
Elastina	+	+
Fibronectina	+	-
Gelatina	+	+
Laminina	+	+
Proteína de unión	+	+
Mielina	+	+
Caseína	-	+
Fibrinógeno	+	+
Plasminógeno	+	+

La MMP-2 activa es detectada en sinoviocitos inflamados y puede estar involucrada en el desarrollo de erosiones óseas tempranas. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias que inhiban la activación de esta enzima puede retardar o prevenir erosiones tempranas en pacientes con una entidad inflamatoria. Los niveles de MMP-2 y 9 tienden a elevarse más en artropatías inflamatorias que en patologías traumáticas, osteoartritis y durante procesos de reparación.

En general, los niveles de MMPs medidos en el suero, tienen una amplia variabilidad y no parecen ser de valor diagnóstico. Adicionalmente, la degranulación de plaquetas y neutrófilos pueden contribuir a elevar los niveles en suero de las MMP-2 y -9 lo que explicaría los altos niveles basales en suero (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000).

Por todos los antecedentes expresados anteriormente es que en esta memoria de título se plantea comparar la actividad gelatinásica en el líquido sinovial de la articulación metacarpo-falángica equina macroscópicamente normal y alterada, dado que existiría una relación entre la actividad de las MMPs y la alteración de la articulación, y así determinar si esta técnica a mediano plazo puede ser de utilidad diagnóstica de los estados iniciales de la osteoartritis.

Objetivo General

Comparar la actividad gelatinásica en el líquido sinovial de la articulación metacarpo-falángica equina macroscópicamente normal y alterada.

Objetivos Específicos

1. Identificar por determinación de masa molecular las enzimas con actividad gelatinolítica presentes en las zimografías de líquido sinovial de articulaciones metacarpo-falángica normales y alteradas.
2. Comparar la actividad gelatinásica (MMP-2 y MMP-9) por medio de la zimografía en el líquido sinovial de articulaciones metacarpo-falángicas normales y alteradas.
3. Cuantificar por densitometría la actividad gelatinásica (MMP-2 y MMP-9) detectada en los zimogramas de los líquidos sinoviales provenientes de articulaciones metacarpo-falángicas animales normales y alteradas.

Material y Método

A. Material Biológico:

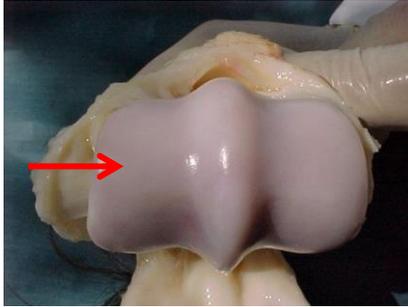
El estudio fue realizado en la articulación metacarpo falángica de equinos mestizos, entre 1 a 15 años de edad, beneficiados en el matadero frigorífico de La Pintana. El fluido sinovial fue obtenido mediante artrocentesis estéril inmediatamente después del beneficio de los caballos (Byars *et al.*, 1982). La estimación de la edad se realizó por cronometría dentaria (Sisson y Grossman, 1994).

Se analizaron 84 articulaciones que se clasificaron en normales y alteradas según las características macroscópicas del cartílago articular y de la membrana sinovial. Se consideró normal (NN) aquella articulación que presentó un cartílago articular de color blanco nacarado, con su superficie lisa y brillante, sin zonas de erosión, ni líneas de roce o desgaste, mientras que la membrana sinovial presentó un color blanco, no congestiva, sin engrosamiento ni focos hemorrágicos (Figura 3 A y 3 C).

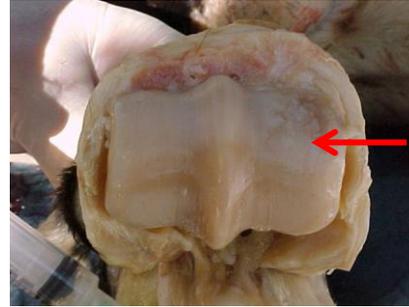
Las articulaciones alteradas se dividieron según la presencia de lesiones, sólo en el cartílago articular (AN) o sólo en la membrana sinovial (NA) o en ambas (AA). Un cartílago articular se consideró alterado si presentó signos osteoartíticos evidentes caracterizados por lesiones degenerativas claras, tales como cambios de coloración (amarillo o café grisáceo), zonas de erosión y líneas de roce (Figura 3 B).

La distribución y descripción de las articulaciones fue la siguiente: grupo NN (C.A normal y M.S normal) (n= 37), grupo NA (C.A normal y M.S alterada) (n= 17), grupo AN

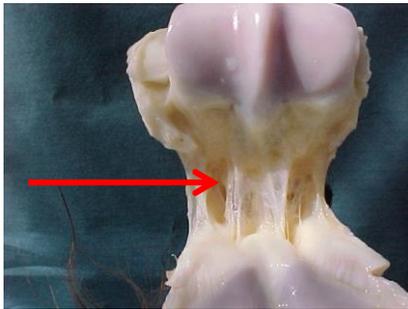
(C.A alterado y M.S normal) (n= 21) y finalmente el grupo AA (C.A alterado y M.S alterada) (n=9).



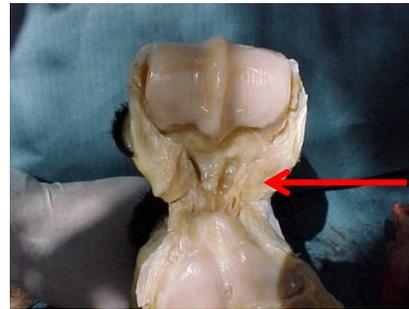
A: Cartílago articular normal



B: Cartílago articular alterado



C: Membrana sinovial normal



D: Membrana sinovial alterada

Figura 3: **A,** Fotografía de un cartílago articular normal, la flecha roja muestra un cartílago blanco nacarado, sin áreas de opacidad. **B,** Cartílago articular alterado, la flecha roja muestra un cambio de coloración y focos de osteonecrosis. **C,** Membrana sinovial normal, la flecha roja muestra una membrana sinovial blanca, sin congestión y sin presencia de focos hemorrágicos. **D,** Membrana sinovial alterada con cambio de coloración y engrosamiento.

B. Preparación y procesamiento del líquido sinovial:

Una vez tomadas las muestras de líquido sinovial (4 ml aproximadamente por articulación), en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, éste fue analizado de acuerdo a sus propiedades físicas como color, transparencia, viscosidad, con la finalidad de eliminar aquellas muestras sanguinolentas. Posteriormente, el líquido sinovial fue centrifugado a 1000xg por 20 minutos para eliminar las células (leucocitos, eritrocitos y células descamativas). El sobrenadante fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su análisis posterior.

C. Determinación de Proteínas:

Se determinó la concentración de proteínas, por el método espectrofotométrico de Lowry usando como estándar albúmina sérica bovina (Lowry *et al.*, 1951) y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

Determinación de la Actividad Gelatinolítica:

Para determinar la actividad gelatinásica se utilizó el método descrito por Valenzuela *et al.*, 1999, que consiste en someter las muestras a una electroforesis en gel de poliacrilamida copolimerizada con gelatina ó caseína al 1% (Zimograma).

Cada muestra de líquido sinovial se diluyó en una proporción de 1 : 4 en una solución que contenía Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,01%. Posteriormente se sometieron a una electroforesis (gel separador al 8%) a un voltaje constante de 125 volts. Una vez concluida la electroforesis, los geles fueron sometidos a una incubación con Tritón al 1% por 30 minutos con el propósito de extraer el

SDS y así poder re-naturalizar la actividad de la enzima. Luego los geles fueron incubados a 37°C por 18 horas en una solución que contenía Tris HCl 100 mM pH 8 y CaCl₂ 5 mM. Los geles fueron teñidos durante 3 horas con azul de Coomassie. La actividad gelatinolítica en estos geles se evidenció por la generación de bandas que no fueron teñidas.

Para poder evidenciar la forma activa de las MMPs, una muestra de LS proveniente de una articulación NN fue incubada a 37°C por 2 hrs con 50 uL acetato de p-aminofenilmercurio (APMA) al 1 mM. Esta misma muestra, en paralelo, fue incubada sin APMA. Finalmente los geles fueron secados en papel celofán.

Posteriormente se comparó el perfil de bandas de los zimogramas de las muestras normales y alteradas, con el fin de establecer diferencias entre las bandas con actividad gelatinolítica.

Con el fin de caracterizar y comparar las bandas con actividad gelatinolítica encontradas en las muestras normales y alteradas, se determinó la masa molecular y se cuantificó la actividad gelatinolítica de las bandas.

D.1 Determinación de la Masa Molecular de las bandas con actividad gelatinolítica:

Se realizó la determinación de la masa molecular de las bandas con actividad gelatinolíticas por medio del cálculo de la movilidad relativa en los geles de poliacrilamida comparados con la migración de los estándares moleculares preteñidos comerciales (Bio-Rad 10748-010).

D.2 Cuantificación de la actividad gelatinolítica mediante densitometría:

Los geles fueron escaneados y posteriormente densitometrados con un programa computacional (UNI-SCAN-IT gel, versión 4.1) que cuantifica los pixeles correspondientes

a cada banda gelatinolítica obtenida. En cada gel se cargó una muestra que se utilizó como patrón interno con el objeto de hacer comparables las zimografías realizadas en distintos días, lo cual podría generar una menor reproducibilidad. Este patrón fue alicuotado y mantenido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ siendo utilizado sólo una vez por zimografía. Los pixeles correspondiente a cada muestra fueron divididos por los pixeles del patrón obteniéndose un valor arbitrario: unidades relativas (UR) (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000).

D. Análisis de datos:

Las comparaciones entre las articulaciones normales y alteradas fueron analizadas mediante análisis de varianza. Para determinar la presencia o ausencia de la banda gelatinolítica generada por la MMP-9 se realizó la prueba de X^2 .

Resultados

Se analizaron 84 articulaciones metacarpo-falángicas de las cuales 37 articulaciones (44 %) se clasificaron macroscópicamente normales (NN); 17 articulaciones (20 %) presentaron el cartílago normal y la membrana sinovial alterada (NA); 21 articulaciones (25 %) presentaron cartílago alterado y membrana sinovial normal (AN); y 9 articulaciones (11%) presentaron ambas estructuras alteradas (AA) (Tabla N°2).

Tabla N° 2: Distribución de frecuencia de acuerdo a las características macroscópicas del cartílago articular y la membrana sinovial.

C.A/M.S	Nº de Art.	%
NN	37	44%
NA	17	20%
AN	21	25%
AA	9	11%
Total	84	100%

Con el objetivo de estandarizar la metodología zimográfica, se realizaron ensayos para determinar el volumen óptimo de líquido sinovial a cargar y pruebas que confirmen que la actividad proteolítica encontrada corresponde a la generada por las MMPs.

En la estandarización de la técnica zimográfica, se buscó comprobar la existencia de proporcionalidad entre la cantidad de líquido sinovial (LS) usada en el gel y la actividad gelatinolítica en la intensidad de la banda determinada por densitometría. Con este objetivo se realizó una zimografía con volúmenes crecientes de LS desde 2,5 hasta 10 μ L (figura 4) y se consideró como pauta de comparación la banda gelatinolítica principal que correspondió a la pro-MMP-2 que se encontró en todas las muestras de LS.

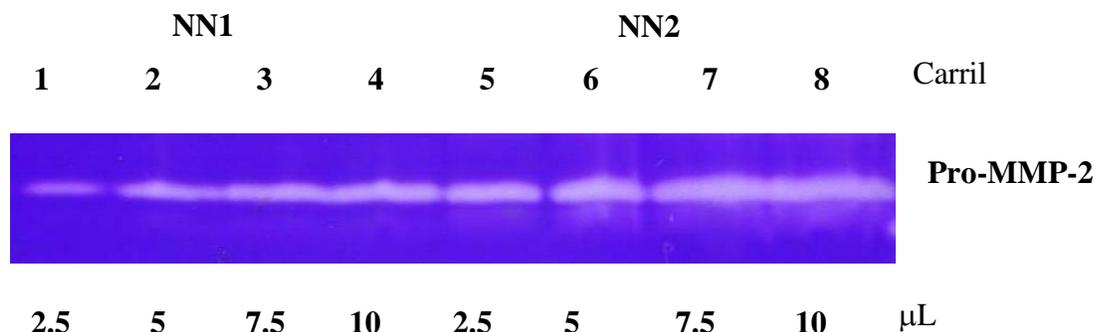


Figura 4: Zimograma en cuyos carriles 1-4 y 5-8 se utilizaron volúmenes crecientes (2.5-10 µL) de LS obtenidos de dos articulaciones normales (NN1 y NN2). Se observa que la intensidad de la banda es dependiente de la cantidad de LS cargado.

El gel de la figura 4 fue escaneado y densitometrado, obteniéndose los píxeles totales para cada volumen, las que fueron promediados y representados en un gráfico (figura 5). En este gráfico se puede observar que existe una proporcionalidad entre la cantidad de líquido sinovial utilizado y la intensidad de las bandas gelatinolíticas.

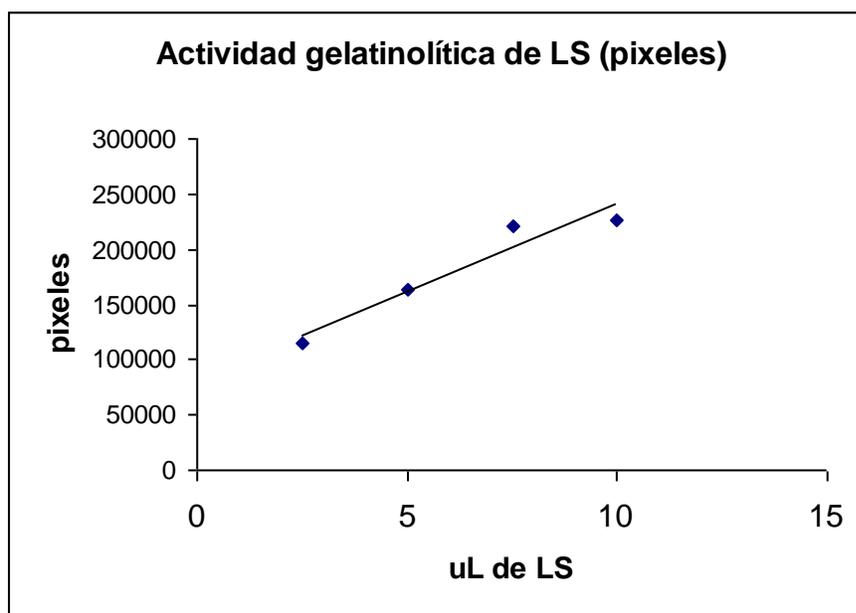


Figura 5: Relación volumen de LS con píxeles totales. Cada punto representa la media de dos experimentos.

Basado en los resultados de la figura 5 se decidió usar 7.5 μ L de LS para comparar la actividad gelatinolítica de los 4 grupos analizados.

En todas las muestras analizadas (84) por zimografía, independiente de su clasificación se observó la presencia de una banda con actividad gelatinolítica correspondiente a una masa molecular de 70 kDa.

De las 37 muestras normales (NN) en 31 (84%) de ellas además se observó una segunda banda con actividad proteolítica de menor intensidad correspondiente a una masa molecular de 100 kDa. En la Figura 6, se muestra un zimograma representativo del grupo NN donde se observan ambas bandas, la de mayor intensidad (70 kDa) correspondería a la pro-MMP-2 y la de menor intensidad (100 kDa) a la pro-MMP-9. En un tercio de los líquidos sinoviales normales aparece además una banda tenue, con baja actividad gelatinolítica de masa molecular estimada de 240 kDa. Esta banda correspondería a la forma dimérica de la pro-MMP-9, unida a una proteína inhibidora de MMPs conocida como TIMP-1.

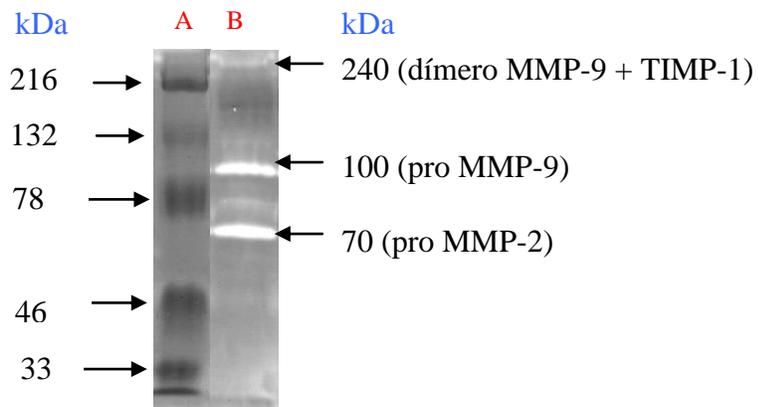


Figura 6: Zimograma representativo de las bandas gelatinolíticas del LS de una articulación normal (NN) (Carril B). El carril A representa los patrones de masa molecular conocida.

Con la finalidad de confirmar la identidad de las bandas gelatinolíticas correspondientes a las metaloproteinasas pro MMP-2 y pro MMP-9, se realizó un experimento utilizando la caseína como sustrato diferenciador (ya que la MMP-2 no puede degradar la caseína) y para ello, se realizó una zimografía con gelatina y otra con caseína, usando el mismo LS normal y cargando el mismo volumen. En la figura 7 se observa que la pro MMP-2 no puede degradar la caseína (carril B) a diferencia de la pro MMP-9.

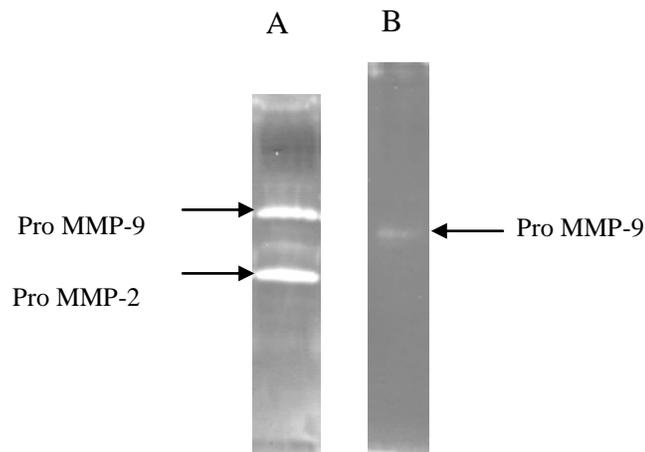


Figura 7: Zimografías de una misma muestra de LS de una articulación normal (NN) realizadas con gelatina (carril A) y con caseína (carril B).

Para poder diferenciar la pro enzima (zimógeno) de la forma activa de ambas gelatinasas, una muestra de líquido sinovial normal fue incubada, previo a la zimografía, en presencia de APMA (acetato de p-aminofenilmercurio). Este agente químico provoca un cambio conformacional en la pro MMP que desbloquea su sitio activo lo que gatilla su autoproteolisis transformando la enzima a la forma activa (Yoshihara *et al.*, 2000). Esto se refleja en la zimografía como una disminución en su masa molecular (Figura 8).

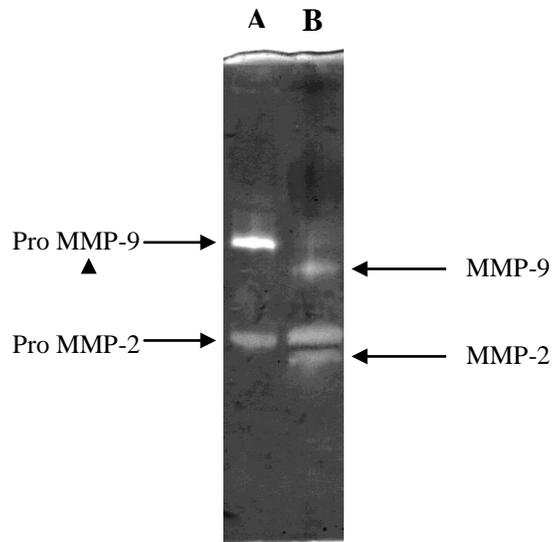


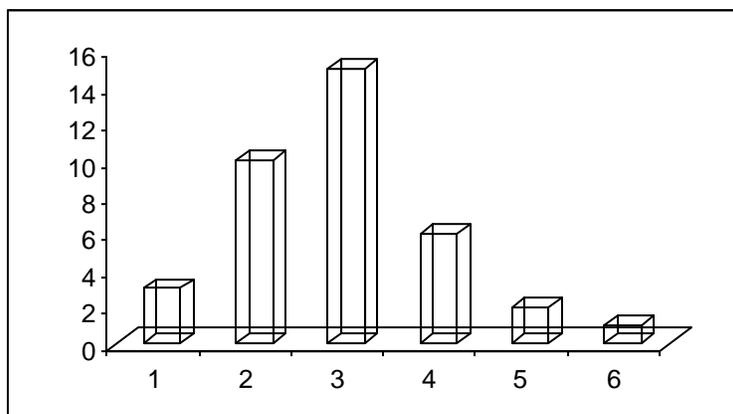
Figura 8: Zimograma de una muestra de líquido sinovial de una articulación NN sin tratamiento (A) y la misma muestra pretratada con APMA a 37 °C durante 3 horas (B).

En los zimogramas realizados se observó que aparecía un número variable de bandas proteolíticas, además de las correspondientes a la pro MMP-2 y pro MMP-9.

En la figura 9 se muestra el número de bandas gelatinolíticas observadas en el zimograma de LS provenientes de articulaciones con cartílago articular y membrana sinovial macroscópicamente normal (NN). En un 8% (3 muestras) se observa 1 banda, 27% (10 muestras) 2 bandas, 41% (15 muestras) 3 bandas, 16% (6 muestras) 4 bandas, 5% (2 muestras) 5 bandas y en un 3% (1 muestra) 6 bandas.

El número de bandas gelatinolíticas presente en los otros 3 grupos analizados (AN, NA, AA) no presentan diferencias en relación a las articulaciones NN.

Figura 9: Distribución de bandas gelatinolíticas en el LS proveniente de articulaciones macroscópicamente normales (NN).



La tabla 3 muestra la distribución de frecuencia para la presencia o ausencia de la banda de 240 kDa (dímero de pro-MMP-9 + TIMP-1) en cada uno de los grupos analizados encontrándose que el grupo NA presentó la forma dimerizada con mayor frecuencia (35%). En los LS provenientes del grupo AA no se detectó esta banda correspondiente al dímero.

Tabla N° 3: Distribución de frecuencia de la forma dimerizada de la pro MMP-9 en relación a las características macroscópicas de las articulaciones.

	% de muestras con Dímero
NN	30 %
AN	19 %
NA	35 %
AA	0 %

En la tabla N° 4 se describe la frecuencia de aparición de la pro-MMP-9, según las características macroscópicas de cartílago articular y de membrana sinovial, encontrándose que tiende a disminuir a medida que la articulación se altera.

Tabla N° 4: Distribución de frecuencia para la presencia de la pro MMP-9 en su forma de monómero.

	n	(+)	(-)	%
NN	37	31	6	83.8 ^a
AN	21	16	5	76.2 ^a
NA	17	11	6	64.7 ^a
AA	9	2	7	22.2 ^b

^a p<0.05 v/s AA

Luego de analizado el número de bandas y su distribución en las articulaciones normales y alteradas, se procedió a medir por densitometría la intensidad de las bandas gelatinolíticas correspondientes a la pro MMP-2 y pro MMP-9, que se expresaron como unidades relativas (UR), cuyo valor corresponde a la división de los píxeles de la muestra de líquido sinovial a analizar por los píxeles de un patrón utilizado en cada gel (Tablas 5 y Tabla 6).

Las unidades relativas (UR) obtenidas para la pro MMP- 2 no mostraron diferencias significativas en los 4 grupos analizados.

Tabla N° 5: Promedio de las Unidades Relativas (U.R) ± desviación estándar para la Pro MMP-2.

CLASIFICACION	U.R. de pro MMP-2	U.R./g Prot
NN (n=37)	1.5 ± 0.6	56.9 ± 38.1
AN (n=21)	1.3 ± 0.9	51.2 ± 32.7
NA (n=17)	1.5 ± 1.0	57.3 ± 85.1
AA (n=9)	0.9 ± 0.7	44.6 ± 26.1

En los casos que da positiva la presencia de la pro MMP-9 no se encontró diferencias significativas para la intensidad de dichas bandas.

Tabla N° 6: Promedio de las Unidades Relativas (U.R) \pm desviación estándar para la Pro MMP-9 de aquellos LS que la presentan

CLASIFICACION	U.R. de pro MMP-9	U.R./g Prot
NN (n=31)	0.28 \pm 0.5	6.2 \pm 9.4
AN (n=16)	0.31 \pm 0.55	7.6 \pm 12.4
NA (n=11)	0.38 \pm 0.68	6.0 \pm 9.1
AA (n=2)	0.67 \pm 0,1	22 \pm 2

Discusión

La recolección de articulaciones metacarpo falángicas en el Matadero la Pintana se realizó aleatoriamente, obteniéndose alrededor de 10 articulaciones por visita, las que se analizaron macroscópicamente desechándose aquellas con signos hemorrágicos, dado que la hemólisis afecta la cuantificación de proteínas de ese líquido sinovial.

La distribución de frecuencia de las características macroscópicas de cartílago articular y de membrana sinovial observadas en este trabajo (37 NN, 17 NA, 21 AN y 9 AA), podría atribuirse a que la mayoría de los equinos faenados son jóvenes, con carnes de mejor calidad, logrando los criadores un mejor precio por animal y un retorno económico más temprano. Por esto, la mayoría de las articulaciones analizadas a partir de estos ejemplares no presentó procesos osteoartíticos. Por otro lado, las lesiones articulares que generan osteoartritis son producidas por traumas agudos intensos o bien traumas de menor intensidad y continuos en el tiempo, los cuales podrían desarrollar secuelas que se aprecian especialmente en equinos de mayor edad, los que son faenados debido posiblemente a sus limitaciones físicas. Por esto es que en esta memoria de título sólo un 11% de las articulaciones analizadas presentaron la membrana sinovial y el cartílago articular alterado (AA).

Durante el período de estandarización de la técnica zimográfica se cargaron diferentes volúmenes de LS, los cuales variaron desde los 2,5 hasta los 10 uL. Se optó por los 7,5 uL, porque a este volumen se observó una banda de actividad gelatinolítica bien definida que permite su análisis densitométrico. Con volúmenes superiores se encontró sobreposición entre distintas muestras de LS que impidió una adecuada medición. Con

cantidades menores a las probadas de LS no hubo aparición de las bandas gelatinolíticas debido a la insuficiente cantidad de enzima para degradar el sustrato.

Las zimografías de muestras de líquido sinovial de articulaciones metacarpo falángicas normales (NN) demostraron la presencia de actividad gelatinolítica en todas las muestras analizadas, que se explicaría por el recambio molecular normal del cartílago articular y que posiblemente es más rápido en animales jóvenes. Este recambio se realiza por la actividad de las MMPs que participan de la homeostasis de la matriz extracelular del cartílago articular (Sternlicht y Werb, 2001).

En todos los zimogramas de las muestras NN (100%) se encontró actividad gelatinolítica correspondiente a una banda proteica de 70 kDa, que sería la forma latente de la MMP-2 (pro MMP-2), lo que coincide con los resultados de Jouglin *et al* (2000) y Trumble *et al* (2001), quienes observaron que en el 100% de las muestras de líquido sinovial de articulaciones normales de equinos, se encontró una banda de actividad gelatinolítica de 66 kDa que dichos autores identificaron como pro MMP-2.

En los zimogramas de 31 articulaciones NN (84%) se encontró además una segunda banda con actividad gelatinolítica con una masa molecular calculada de 100 kDa. De acuerdo a su movilidad relativa, se estableció que esta segunda banda correspondería a la pro MMP-9. Resultados similares fueron obtenidos por Clegg *et al* (1997), que determinó que la masa molecular era 94 kDa para la pro MMP-9 y de 64 kDa para la pro MMP-2.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se logró caracterizar y diferenciar la actividad gelatinolítica de las MMPs de otras proteasas, utilizando inhibidores específicos (Bravo, 2001). Para ello las muestras de líquido sinovial (LS) se incubaron en presencia de inhibidores de serin y de aspartil proteasas, eliminando con ello la posibilidad

de observar otras bandas diferentes a las generadas por MMPs. También la especificidad de la actividad metaloproteinásica fue determinada mediante el efecto de quelantes de calcio (EDTA), las que al bloquear la acción proteolítica de las MMPs impiden la aparición de bandas gelatinolíticas. Esto nos aseguró que la actividad observada durante la realización de este estudio, correspondió a la generada por las MMPs. Resultados similares fueron obtenidos en trabajos previos realizados en el laboratorio de Bioquímica (Bravo, 2001).

Los resultados obtenidos en los zimogramas con sustrato diferenciador, gelatina y caseína, permitió confirmar que la acción proteolítica fue generada por la MMP-2 y por la MMP-9.

La presencia de la pro MMP-2 en articulaciones normales, sugiere su papel constitutivo y homeostático para la remoción del colágeno anormal de la matriz extracelular recientemente sintetizada (Trumble *et al.*, 2001). La pro MMP-2 es expresada por varios tipos celulares y está involucrada en varios aspectos de la reparación normal de tejidos (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000). La pro MMP-2 es activada en la enfermedad articular y no en articulaciones normales (Trumble *et al.*, 2001).

La presencia de actividad pro MMP-9 en articulaciones macroscópicamente normales, ya sea como monómero o dímero, se podría asociar a la presencia de polimorfo nucleares neutrófilos en el líquido sinovial (Clegg *et al.*, 1997), como consecuencia de procesos inflamatorios leves no detectados al análisis macroscópico, y que pueden producirse como consecuencia del transporte y del beneficio de estos animales en el matadero. Clegg *et al.*, (1997) también detectaron actividad MMP-9 en articulaciones osteoartísticas de equinos, debido al componente inflamatorio de esta patología.

En el caso de las articulaciones con cartílago articular y membrana sinovial alterada (AA), se encontró presencia de pro MMP-9 en solo 2 muestras de un total de 9.

La presencia de la pro MMP-9 en la osteoartritis, puede ser atribuida al hecho que la sinovitis es la característica más prevalente. Además, debido a la naturaleza cíclica de las fases tempranas de la OA, las concentraciones de la pro MMP-9 puede ser baja durante los períodos de reposo y se incrementa durante los períodos de inflamación (Trumble *et al.*, 2001). Esto podría explicar la ausencia de monómero y dímero en los animales con cartílago y membrana alterada (AA), debido a que podrían haberse encontrado en un período de reposo de la patología.

Del total de muestras analizadas en un 25% (21 muestras) aparece una banda de baja intensidad cuya masa molecular calculada fue de 240 kDa, que se aproxima al obtenido por Clegg *et al.* (1997) y Jouglin *et al.* (2001) de 225 kDa. Esta banda corresponde a la forma dimerizada de la forma activa de la MMP-9 (85 kDa), que se produce cuando la MMP-9 está presente en exceso en relación al TIMP-1 cuya masa molecular es de 28 kDa. Por lo tanto, en la dimerización participan dos MMP-9 en su forma activa y dos TIMP-1. Esto podría implicar que las muestras donde el dímero está presente, la enzima está presente en exceso con respecto a su inhibidor y así es más probable que sea biológicamente activa (Clegg *et al.*, 1997).

Las unidades relativas (U.R) obtenidas para la pro MMP- 2 y para la pro MMP-9 no mostraron diferencias significativas en los 4 grupos analizados.

Se ha descrito que la técnica radiográfica carece de la sensibilidad para detectar procesos degenerativos iniciales y por lo tanto, se han buscado marcadores bioquímicos capaces de caracterizar dicho proceso (Brama et al., 1998).

Se propone analizar en trabajos posteriores la concentración de TIMPs, para establecer si existe un desbalance de la actividad degradativa asociada a la enfermedad degenerativa articular.

Como conclusión general se puede plantear que la actividad gelatinolítica por sí sola no es un indicador absoluto de daño articular. Es necesario realizar más estudios con métodos más sensibles como Western Blot, para identificar la forma activa de las MMPs comparándola con la presencia de los TIMPs y con esto determinar su balance.

Conclusiones

1. De acuerdo a los resultados obtenidos mediante zimografía se pudo demostrar la presencia de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 en LS equino sólo en la forma de zimógeno.
2. La actividad de la pro MMP-2 no es un buen indicador del daño o proceso degradativo del cartílago articular puesto que esta enzima podría ser constitutiva de las articulaciones diartrodiales normales en los equinos.
3. El bajo porcentaje de aparición de la pro MMP-9 en su forma de monómero en articulaciones con alteraciones tanto en el cartílago como en la membrana sinovial, podría caracterizar el daño articular crónico.

Bibliografía

1. **BRAMA, P.A.J.; TEKOPPELE, J.M.; VAN WEEREN, P. R.; BARNEVELD, A.** 1998. Matriz metalloproteinase activity in equine sinovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. *Am. Rheum. Dis.* 57:697-699.
2. **BRAVO, R.G.** 2001. Comparación de actividad hidrolítica de metaloproteinasas, en líquido sinovial de la articulación metacarpo-falángica equina normal y alterada. Memoria de título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. pp. 1-60.
3. **BYARS, T.D.; BROWN, C.; BEISEL, D.** 1982. Equine Arthrocentesis. *Equine Pract.* 4(2):28-40.
4. **CIMPEAN, A.; COLOIANU, M.** 1997. Matriz metalloproteinases with role in collagen biodegradation. *Rom. J. Biol. Sci.* 1-2: 1-14.
5. **CLEGG, P.D.; COUGHLAN, A.R.; RIGGS, C.M.; CARTER, S.D.** 1997. Matriz metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet. J.* 29 (5): 343-348.
6. **CLEGG, P.D.; COUGHLAN, A.R.; CARTER, S.D.** 1998. Equine TIMP-1 and TIMP-2: Identification, activity and cellular sources. *Equine Vet. J.* 30 (5): 416-423.
7. **CLEGG, P.D.; CARTER, S.D.** 1999. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases. *Equine Vet. J.* 31 (4): 324-330.

8. **CORNELISSEN, B.P.M.; RIJKENHUIZEN, A.B.M.; VAN DEN HOOGEN B.M.; RUTTEN, V.P.M.G.; BARNEVELD, A.** 1998. Experimental model of synovitis /capsulitis in the equine metacarpophalangeal joint. *Am. J. Vet. Res.* 59(8): 978-985.
9. **EURELL, J.A.; VAN SICKLE, D.C.** 1998. Connective and supportive tissues. In: Dellmann, H.D.; Eurell, J. *Textbook of Veterinary Histology*. Fifth edition. pp. 32-61.
10. **GOLDBACH-MANSKY, R.; LEE, J.; HOXWORTH J.M.; SMITH, D.; DURAY, P.; SCHUMACHER, H.R.; YARBORO, C.H.; KLIPPEL, J.; KLEINER, D.; EL-GABALAWY. H.S.** 2000. Primary research: Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis. *Arthritis Res.* 2:145-153.
11. **GOLDRING, M.** 2000. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 43 (9): 1916-1926.
12. **JANG, D.; MURRELL, G.A.C.** 1998. Nitric oxide in arthritis. *Free Radical Biol. & Med.* 24 (9): 1511-1519.
13. **JOUGLIN, M.; ROBERT, C.; VALETTE, J.; GAVARD, F.; QUINTIN-COLONNA, F.; DENOIX, J.** 2000. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. *Vet Res.* 31: 507-515.
14. **KAWCAK, C.E.; McILWRAITH, C.W.; NORRDIN, R.W.; PARK, R.D.; JAMES, S.P.** 2001. The role of subchondral bone in joint disease: a review. *Equine Vet. J.* 33 (2): 120-126.

15. **LONGO, G.M.; XIONG, W.; GREINER, T.C.; ZHAO, Y.; FIOTTI, N.; BAXTER, B.T.** 2002. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* 110: 625-632.
16. **LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
17. **MARDONES, R.; FIGUEROA, D.** 2001. Cartílago normal y patológico. *Rev. Chil. Ortop. Traum.* 42: 91-99.
18. **MAY, S.A.** 1996. Radiology Refresher article: Radiological aspects of degenerative joint disease. *Equine Vet. Educ.* 8 (2): 114-120.
19. **MORGUNOVA, E.; TUUTILA, A.; BERGMANN, U.; ISUPOV, M.; LINDQVIST, Y.; SCHNEIDER, G.; TRYGGVASON, K.** 1999. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.* 284: 1667-1670.
20. **NOTOYA, K.; JOVANOVIC, D.V.; REBOUL, P.; MARTEL-PELLETIER, J.; MINEAU, F.; PELLETIER, J.** 2000. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E₂ via the induction of cyclooxygenase-2. *J. Immunol.* 165: 3402-3410.
21. **PALMER, J.L.; BERTONE, A.L.** 1994. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet. J.* 26 (4): 263-277.
22. **PELLETIER, J.; MARTEL-PELLETIER, J.; ABRAMSON, S.B.** 2001. Osteoarthritis, an inflammatory disease. *Arthritis Rheum.* 44 (6): 1237-1247.

23. **PLATT, D.** 1996. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. **In:** McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. Joint disease in the horse. Eds: W.B. Saunders Company. pp 40-70.
24. **PRICE, J.S.; SYMONS, J.A.; RUSSELL, G.G.** 1992. Cytokines: inflammatory mediators of joint disease. Equine Vet. J. 24 (2) 78-80.
25. **REGINATO, A.M.; OLSEN, B.R.** 2002. [en línea]. **In:** The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. < [http://www. Arthritis-research.com/inpress/ar595](http://www.Arthritis-research.com/inpress/ar595)>. [30-08-2002].
26. **RICHARDSON, D.W.; DODGE, G.R.** 1998. Molecular characteristics of equine stromelysin and the tissue inhibitor of metalloproteinase 1. Am. J. Vet. Res. 59 (12): 1557-1562.
27. **ROUSH, J.K.; McLAUGHLIN, R.M.; RADLINSKY, M.** 2002. Understanding the pathophysiology of osteoarthritis. Vet. Med. February. 108-117.
28. **SANDELL, L.J.; AIGNER, T.** 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: Cell biology of osteoarthritis. Arthritis Res. 3 (2): 234-241.
29. **SCHENK, R.K.; EGGLI, P.S.; HUNZIKER, E.B.** 1986. Articular cartilage morphology. **In** : Articular cartilage biochemistry. Eds: K. Kuettner, R.Schlerebach and V.C. Hascall. pp. 3-22.
30. **SHAPIRO, S.D.** 1998. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix biological consequences. Curr. Opin. Cell. Biol. 10:602-608.
31. **SISSON, S.B.; GROSSMAN, J.D.** 1994. Anatomía de los animales domésticos. 5^a Ed. Barcelona, Salvat. p. 952.

32. **SPIERS, S.; MAY, S.A.; BENNETT, D.; EDWARDS, G.B.** 1994. Cellular sources of proteolytic enzymes in equine joints. *Equine Vet. J.* 26 (1): 43-47.
33. **STERNLICHT, M.D.; WERB, Z.** 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 463-516.
34. **TETLOW, L.C; ADLAM, D.J.; WOOLLEY, D.E.** 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 44 (3): 585-594.
35. **TODHUNTER, R.J.** 1996. Anatomy and physiology of synovial joint. **In:** McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. *Joint disease in the horse.* Eds: W.B. Saunders Company. pp 1-28.
36. **TROCMÉ, C.; GAUDIN, P.; BERTHIER, S.; BARRO, C.; ZAOUI, P.; MOREL, F.** 1998. Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J. Biol. Chem.* 273 (32): 20677-20684.
37. **TROTTER, G.W.; MCLLWRAITH, C.W.** 1996. Clinical features and diagnosis of equine joint disease. **In:** McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. *Joint disease in the horse.* Eds: W.B. Saunders Company. pp 120-144.
38. **TRUMBLE, T.N.; TROTTER, G.W.; OXFORD, J.R.T.; McLLWRAITH, C.W.; CAMMARATA, S.; GOODNIGHT, J.L.; BILLINGHURST, R.C.; FRISBIE, D.D.** 2001. Sinovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am. J. Vet. Res.* 62 (9): 1467-1477.

39. **UCHIDA, M.; SHIMA, M.; SHIMOAKA, L.; BUJIEDA, A.; OBARA, K.; SUZUKI, H.; NAGAL, Y.; IKEDA, T.; YAMATO, H.; KAWAGUCHI, H.** 2000. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J. Cell. Physiol.* 185: 207-214.
40. **VALENZUELA, M.A.; CARTIER, L.; COLLADOS, L.; KETTLUN, A.M.; ARAYA, F.; CONCHA, C.; FLORES, L.; WOLF, M.E; MOSNAIM, A.D.** 1999. Gelatinase activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of various patient populations. *Res. Commun Mol. Pathol. Pharmacol.* 104 (1):42-52.
41. **VISSE, R.; NAGASE, H.** 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, fuction and biochemistry. *Circ Res.* 92:827-839.
42. **VON RECHENBERG, B.; McILWRAITH, C.W.; AKENS, M.K.; FRISBIE, D.D.; LEUTENEGGER, C.; AUER, J.A.** 2000. Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE₂) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Equine Vet J.* 32 (2): 140-150.
43. **YOSHIHARA, Y.; NAKAMURA, H.; OBATA, K.; YAMADA, H.; HAYAKAWA, T.; FUJIKAWA, K.; OKADA, Y.** 2000. Matrix metalloproteinases and inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59: 455-461.