



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

MEMORIA DE TÍTULO

**“CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL CARTÍLAGO DE LA ARTICULACIÓN
METACARPOFALÁNGICA EQUINA MACROSCÓPICAMENTE SANA Y SU
RELACIÓN CON EL RECuento CELULAR DEL LÍQUIDO SINOVIAL Y EL
CONTENIDO DE MMP-2 Y 9”**

Memoria para optar al título profesional de Médico
Veterinario. Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

Alumno:

Maximiano José Lemaître Palma

Avda. El Bosque 729, Dpto. 23A, Providencia.

(562) 2419284

Profesor Guía:

Dr. Héctor Adarmes Ahumada

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

SANTIAGO – CHILE
2010

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
RESUMEN.....	ii
SUMMARY.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
MATERIAL Y MÉTODO.....	22
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

RESUMEN

La osteoartritis (OA) o enfermedad degenerativa articular (EDA) es la principal causa de invalidez en el equino. Es una afección multifactorial en la que participan diversos mediadores químicos, entre ellos las metaloproteinasas (MMPs), que actúan degradando los componentes de la matriz extracelular (MEC) del cartílago articular, generando una cadena de reacciones que llevan a la destrucción progresiva del mismo.

Se ha demostrado que recuentos elevados de células nucleadas en el líquido sinovial están relacionados con un incremento en la actividad de las MMPs, especialmente la MMP-9, lo que incide en el establecimiento y posterior progreso de la OA.

Como una forma de validar un modelo de normalidad articular en base a la observación macroscópica, en este estudio se obtuvo muestras de la articulación metacarpo falángica equina, realizando una clasificación entre articulaciones normales y patológicas según la apariencia macroscópica del cartílago articular, separando luego las articulaciones normales según su recuento celular en un grupo normal con recuento celular elevado (> 600 células nucleadas/ μl) y en otro normal con bajo recuento celular (< 300 células nucleadas/ μl). Además, se incorporó un grupo articular con daño crónico de la articulación como control positivo. A todas las muestras se les determinó la concentración de proteínas totales y la actividad gelatinolítica para las MMPs 2 y 9 mediante zimografía. Además, se realizaron cortes histológicos del cartílago articular con el fin de evaluar la pérdida de matriz extracelular, mediante la medición del grosor de la zona superficial del cartílago. También en estos cortes se realizó recuento de condrocitos y se evaluó la cantidad de grupos isógenos. La muerte celular se evaluó mediante el recuento de lagunas vacías en un área determinada de cartílago articular.

En el grupo patológico se detectó una marcada disminución en el grosor de la zona superficial del cartílago articular y se encontró el mayor recuento de lagunas vacías.

En ambos grupos normales a la inspección macroscópica no se detectó diferencias en el grosor de la zona superficial del cartílago ni en el recuento de condrocitos y de grupos isógenos. Sin embargo, se encontró diferencia significativa en la cantidad de lagunas vacías, siendo ésta mucho mayor en el grupo con un recuento celular elevado. También se encontró una relación entre la mayor actividad gelatinolítica de MMP-9 y un mayor recuento de células nucleadas en el líquido sinovial.

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) or degenerative joint disease (DJD) is the leading cause of disability in the horse. It is a multifactorial disease involving several chemical mediators, including the metalloproteinases (MMPs) which degrade the components of the extracellular matrix (ECM) of the articular cartilage, initiating a chain reaction leading to its progressive destruction.

It has been demonstrated that high nucleated cell counts in synovial fluid are associated with an increased activity of MMPs, especially MMP-9, which affects the establishment and subsequent progression of OA.

In order to validate a macroscopic observation based model of articular normality, samples were obtained from the equine metacarpo phalangeal joint, classifying them between normal and pathological joints depending on the macroscopic appearance of the cartilage, then separating the joints according to cell count in a normal group with high cell count (> 600 nucleated cells/microlitre) and other normal with low cell count (<300 nucleated cells/microlitre). In addition, a group with chronic articular joint damage, was created as positive control. All the samples were analyzed for total protein concentration and gelatinolytic activity for MMPs 2 and 9 through zymography. In addition, histological sections were made of the articular cartilage, in order to assess the loss of extracellular matrix by measuring the thickness of the cartilage surface area. In these histological samples, chondrocytes were counted and the amount of isogenic groups was assessed. Cell death was evaluated by counting the empty gaps in a particular area of the articular cartilage.

The pathological group revealed a marked decrease in the thickness of the articular cartilage surface area and the highest count of empty gaps was found.

In both normal groups the macroscopic inspection did not show differences in the thickness of the surface area of cartilage or in the chondrocytes and isogenic groups

counting. However, significant difference was found in the amount of empty gaps, being this much higher in the group with a high cell count. We also found a correlation between increased gelatinolytic activity of MMP-9 and increased nucleated cell count in synovial fluid.

INTRODUCCIÓN

A través de la historia, el equino ha sido una de las especies animales más importantes para el hombre, debido a la variedad de servicios que es capaz de entregar, ya sea como herramienta de trabajo, medio de transporte, recreación, deporte, terapia, etc. Sin embargo, todas estas funciones dependen fundamentalmente de la salud e integridad de su sistema locomotor.

Dentro de las afecciones del sistema locomotor, aquellas que afectan a las articulaciones sinoviales constituyen la causa principal de claudicación y de disminución en su rendimiento. Una patología articular, independiente de su etiología, siempre cursará con un cuadro inflamatorio inicial, que puede progresar a un cuadro crónico con alteración de los componentes anatómicos articulares, produciendo daños irreversibles que llevan a una pérdida de la función biomecánica del cartílago articular, comprometiendo en forma permanente el correcto funcionamiento de la articulación (McIlwraith, 1996; Ostalowska *et al.*, 2006)

Una articulación sinovial está compuesta por el hueso subcondral, cartílago articular, líquido sinovial, membrana sinovial y ligamento capsular. Todos estos componentes funcionan de manera armónica e íntimamente relacionados, por lo que la alteración de uno de ellos producirá un trastorno general en el funcionamiento articular y un cambio en el ambiente intra-articular. Una alteración inflamatoria, de cualquier tipo, producirá un cambio en la permeabilidad de la membrana sinovial y un aumento en la difusión de células y metabolitos a través de la misma, generando, además, una alteración en el metabolismo de los sinoviocitos. Todo esto producirá un aumento en la liberación de enzimas degradativas y citoquinas. Estas últimas, especialmente la IL-1, actúan sobre condrocitos y sinoviocitos, los que liberan productos asociados a procesos catabólicos, como metaloproteinasas (MMPs) y agrecanasas, además de prostaglandina-E₂ (PG-E₂) y radicales libres, que amplifican el proceso inflamatorio. Estas moléculas se relacionan con la degradación del cartílago articular y del ácido hialurónico del líquido sinovial, y con la

inhibición de la síntesis de componentes de la matriz extracelular (MEC) del cartílago, lo que conduce finalmente a su degeneración progresiva (McIlwraith, 1996; Tsuji *et al.*, 2006)

En el estudio de las articulaciones sinoviales en el equino, existen casos en los que articulaciones sinoviales aparentemente sanas, sin cuadros inflamatorios aparentes y de aspecto normal a la observación radiográfica e incluso a la inspección macroscópica directa mediante artroscopía, presentan recuentos celulares elevados en su líquido sinovial. El recuento de células nucleadas (RCN) en el líquido sinovial ha sido utilizado muchas veces como un método diagnóstico de la salud articular, considerándose al RCN elevado como un indicador de algún tipo de patología articular (van Pelt, 1962, 1974; Shmerling *et al.*, 1990; McIlwraith, 1996; Todhunter, 1996; Clegg *et al.*, 1997a). Incluso Shmerling *et al.* (1990) consideran el RCN y la diferenciación de las células nucleadas en el líquido sinovial como el método diagnóstico de elección para diagnosticar patologías inflamatorias, considerando innecesarios los análisis químicos. Clegg *et al.* (1997a), demostraron que en articulaciones donde el contenido celular del líquido sinovial está aumentado, existe un aumento en las MMPs y, por lo tanto, un aumento en la degradación del cartílago. Esto podría significar que articulaciones sinoviales aparentemente sanas, pero con RCN elevados en su líquido sinovial, podrían estar cursando etapas iniciales de degeneración articular, sólo observables mediante el estudio histológico del cartílago hialino.

Este estudio se ha centrado en la articulación metacarpo falángica debido a que es una de las articulaciones en que las patologías articulares invalidantes son más frecuentes (McIlwraith, 1996; Malikides, 2007). También fue determinante para la elección de esta articulación, la facilidad para su obtención íntegra en el matadero. Además, la articulación metacarpo falángica ha sido objeto de la línea de investigación en marcadores moleculares de la degradación del cartílago en el líquido sinovial por el grupo de Bioquímica del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile, lo que ha generado datos y publicaciones en esta línea de trabajo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Generalidades sobre las articulaciones.

Una articulación corresponde al conjunto de elementos estructurales que conectan dos o más huesos entre sí a través de sus superficies articulares y que, según sus características y su grado de movilidad, se clasifican en tres grupos de articulaciones: fibrosas o anfiartrosis, cartilagosas o sinartrosis y sinoviales o diartrosis (Getty, 1982; Cormack, 1988).

Las anfiartrosis son articulaciones fijas o inmóviles, donde las superficies articulares están unidas por tejido fibroso. En las sinartrosis, los huesos se unen por un tejido fibrocartilaginoso o cartílago hialino, o por una combinación de ambos. En este tipo de articulación, el movimiento es limitado por el tamaño de las superficies de unión y por la cantidad y flexibilidad del medio que las une (Getty, 1982).

Las articulaciones sinoviales se caracterizan por su gran movilidad y por poseer una cápsula articular que recubre la articulación, y en cuya cara interna se encuentra la membrana sinovial, la cual delimita la cavidad articular (Getty, 1982; Cormack, 1988). La función principal de este tipo de articulación es proporcionar soporte y continuidad al sistema músculo-esquelético a la vez que aporta movilidad, la que debe ser: (1) libre de dolor y dentro de un rango de movimiento determinado, (2) controlado por músculos y tendones asociados, y (3) repetible y en el que la fricción sea prácticamente inexistente. A pesar de que la energía asociada al movimiento se disipa en parte a través de músculos y huesos, gran parte de ella se transmite a través de las superficies articulares, de modo que un papel esencial para una articulación sinovial es su capacidad de transmitir esta energía de una manera eficiente y libre de dolor (Todhunter, 1996).

En el equino normal en reposo, el 60% de su peso corporal descansa sobre las extremidades anteriores, y el peso de un jinete incrementa este valor a un 70%, condición que se acentúa en condiciones de trabajo o deportivas. Este mayor estrés físico al que están

sometidas las articulaciones sinoviales que conforman los miembros anteriores, explica el que en ellas se presente cerca de un 75% de las claudicaciones por daño articular (Malikides, 2007). Dentro de las articulaciones sinoviales de la extremidad anterior del equino, las articulaciones del carpo y metacarpo falángica (Fig. 1) son las que cursan con mayor frecuencia procesos inflamatorios y degenerativos, debido a que soportan grandes fuerzas de compresión y poseen gran movilidad (McIlwraith, 1996).

2. Articulación metacarpo falángica equina

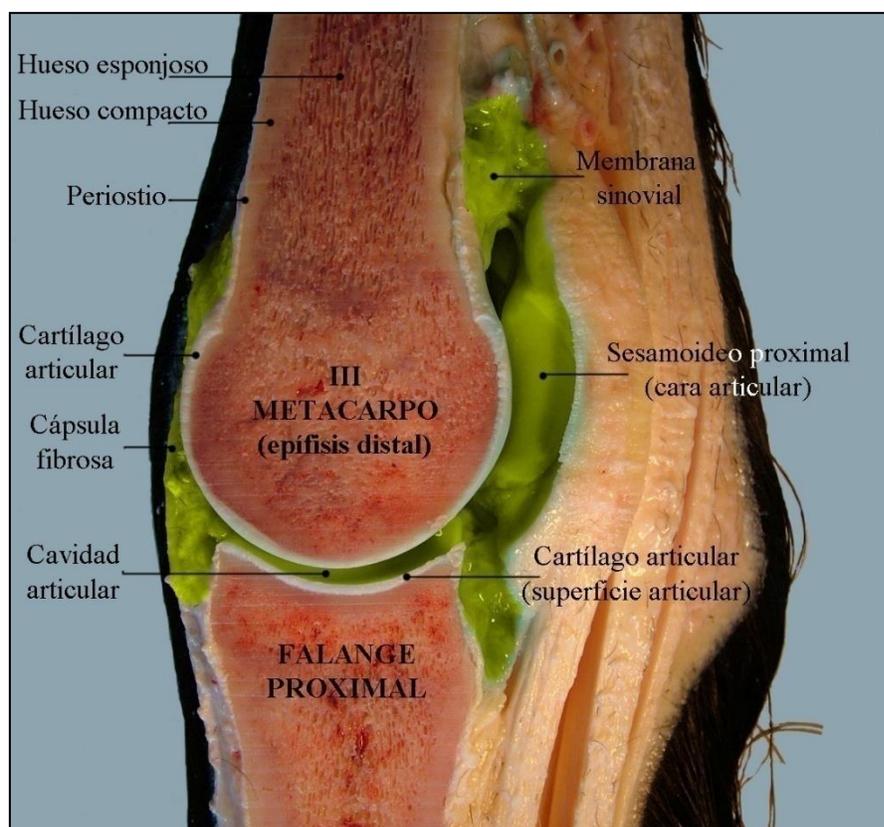


Fig. 1 Articulación metacarpo falángica izquierda. Corte sagital, vista latero medial.
(Fotografía: Maximiano Lemaître, Andrea Müller)

La articulación metacarpo falángica, como cualquier articulación sinovial simple, está formada por los huesos que se enfrentan, y se reconocen las siguientes estructuras:

a. Cartílago articular

Está constituido por cartílago hialino que, desde el punto de vista anatómico, recubre las superficies articulares de los huesos que se enfrentan. Este cartílago es un tejido formado por células denominadas condrocitos, que representan el 2% del tejido cartilaginoso, que se encuentran dispersas en una matriz de una sustancia intercelular amorfa que contiene fibras de colágeno y proteoglicanos. Los componentes principales del cartílago son: agua (75%), colágeno, principalmente tipo II (15%) y proteoglicanos (10%) (Cormack, 1988; Blood y Radostits, 1992).

El cartílago es un tejido que carece de vasos sanguíneos, drenaje linfático e inervación, es muy liso y tiene un color blanco azulado y traslúcido cuando se examina en fresco (Junqueira *et al.*, 1989). Su función es disminuir los efectos de las contusiones violentas y reducir en forma importante la fricción; de este modo, el cartílago es más grueso en aquellas zonas que soportan mayor presión y fricción (Getty, 1982). Al ser un tejido avascular, los condrocitos deben obtener sus nutrientes por difusión, principalmente desde el líquido sinovial (Banks, 1993).

Los condrocitos están ubicados en cavidades de la matriz llamadas lagunas, y se disponen en tres zonas incompletamente separadas (Fig. 2): 1) una zona superficial, en la cual estas células son aplanadas, de pequeño volumen y se hallan dispuestas con sus ejes longitudinales en forma paralela a la superficie articular; 2) una zona intermedia, en la cual las células son algo mayores y su forma es casi esférica; 3) una zona profunda, compuesta por células voluminosas que suelen estar dispuestas en columnas en ángulo recto con la superficie (Cormack, 1988).

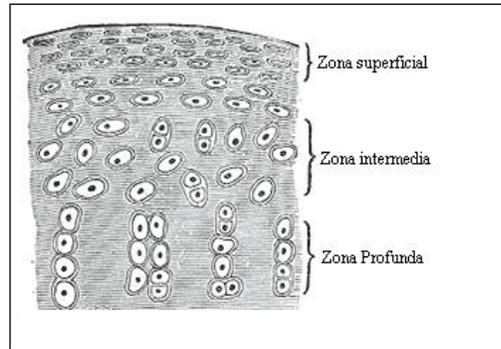


Fig. 2 Esquema de las distintas zonas del cartílago hialino articular.

Los condrocitos, a pesar de constituir un componente minoritario dentro del cartílago hialino normal, sintetizan y secretan la matriz extracelular (MEC), y deben ser capaces de mantener el recambio molecular normal de la misma, la que constituye la mayor parte del cartílago. Se ha descrito que el cartílago dañado regenera con mucha dificultad y a menudo de manera incompleta (Cormack, 1988; Junqueira *et al.*, 1989).

La MEC del cartílago normal está formada por proteoglicanos solubles en agua, entrelazados con fibras de colágeno. El colágeno predominante dentro del cartílago es el tipo II, que está constituido por tres cadenas alfa-2 similares, que conforman finas fibrillas de 10 a 20 nanómetros de diámetro (Ray *et al.*, 1996). Estas últimas se alinean en forma paralela a la cara articular en la zona superficial, pero en las zonas más profundas del cartílago se disponen perpendiculares al hueso subcondral, lo que permite al cartílago soportar tensiones superficiales y compresión en las zonas profundas (Stockwell, 1991; Blood y Radostits, 1992).

Los proteoglicanos son complejos conformados por una proteína central a la que se unen covalentemente uno o más glicosaminoglicanos (GAGs), como el condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato, queratán sulfato, heparán sulfato y dermatán sulfato I y II. En el cartílago, cerca del 75% de estos proteoglicanos se encuentran formando grandes agregados que los protegen de la degradación, al enlazarse por medio de una glicoproteína a una cadena lineal de ácido hialurónico (Blood y Radostits, 1992). El agregacán es el proteoglicano más abundante en el cartílago articular y el de mayor tamaño (3×10^6 Da),

constituyendo aproximadamente un 90% de la masa total de proteoglicanos (Hall *et al.*, 2003). Cada molécula de ácido hialurónico es capaz de unir hasta 100 moléculas de agregán, formando agregados macromoleculares que permiten la retención e inmovilización del agregán (Fig. 3). Los numerosos grupos carboxilo ($-\text{COO}^-$) y sulfato ($-\text{SO}_4^-$) presentes en el agregán conforman una gran red de cargas negativas, por lo que atraen y retienen agua y cationes, como Na^+ . La atracción de agua hace que la matriz de proteoglicanos se distienda, pero debido a que está atrapada por la red de colágeno, su volumen se incrementa sólo en un 20% del máximo disponible. La compresión del cartílago hace que el agua sea expulsada de las regiones con carga eléctrica de los proteoglicanos, haciendo que las cargas negativas de los grupos carboxilo y sulfato se aproximen, siendo las fuerzas de repulsión de las mismas las que permiten resistir la compresión. Al desaparecer la compresión, el agua retorna a las regiones con carga eléctrica de los proteoglicanos y se restablece el estado de hidratación normal de la matriz. Es este balance de fuerzas entre las moléculas de agregán parcialmente distendidas y la tensión en las fibras de colágeno, el que le proporciona a la MEC su capacidad de amortiguar y distribuir las fuerzas compresivas a las que es sometido normalmente el cartílago (Jackson *et al.*, 1991; Todhunter, 1996; Mardones y Figueroa, 2001; Hall *et al.*, 2003).

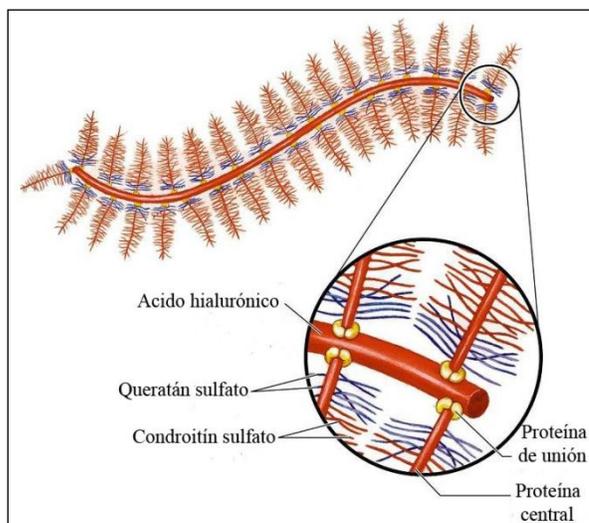


Fig. 3 Esquema del agregán

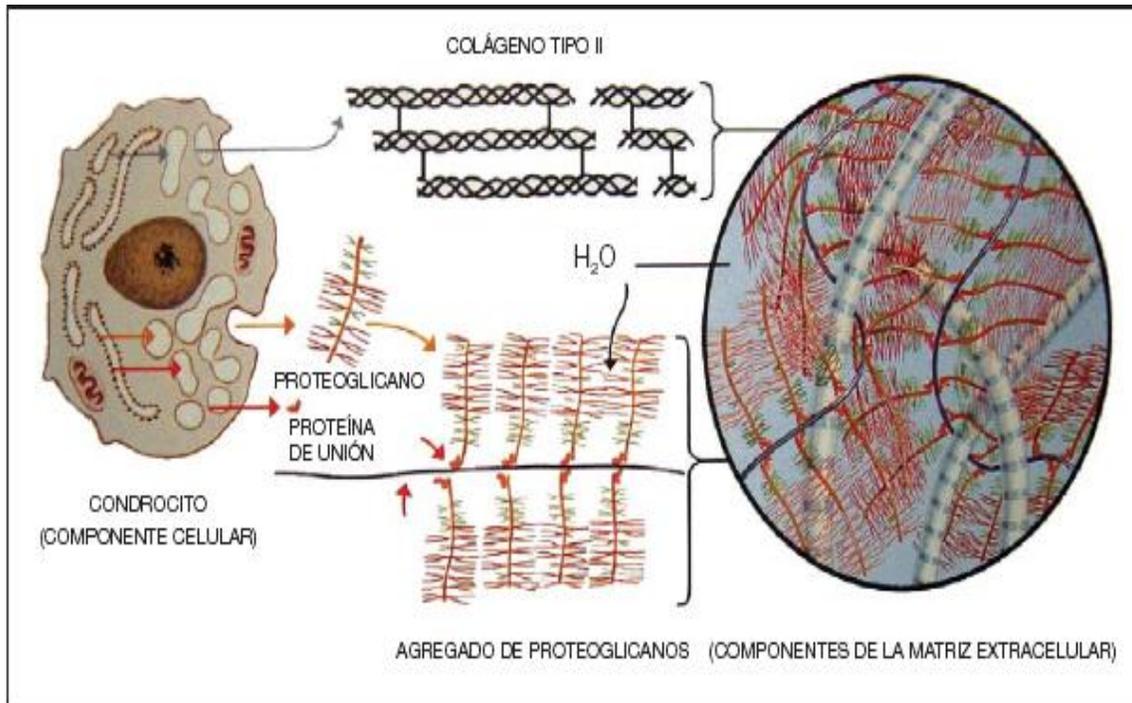


Fig. 4 Esquema de la matriz extracelular

b. Cápsula articular y membrana sinovial:

La cápsula articular es un tejido anexo que estabiliza externamente la articulación, y está formada por una capa fibrosa densa externa, o cápsula fibrosa, y por una capa interna, o membrana sinovial, que se encuentra en contacto con el líquido sinovial (Cormack, 1988; Palmer y Bertone, 1996). Ciertas porciones de la cápsula pueden experimentar un engrosamiento y formar así ligamentos que no son separables, excepto si se realiza de manera artificial, del resto de la cápsula (Getty, 1982).

La cápsula articular se inserta a una distancia variable de los márgenes del cartílago articular, continuándose con la capa fibrosa del periostio de los huesos que conforman la articulación (Cormack, 1988; Firth, 1996; Pool, 1996). La capa fibrosa externa está formada por tejido conectivo denso y tiene un muy bajo componente celular. Su matriz extracelular está compuesta por colágeno, principalmente de tipo I, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y agua (Todhunter, 1996). A diferencia de otros tejidos conectivos,

como ligamentos y tendones, donde las fibras colágenas se organizan en forma paralela para maximizar su resistencia a las fuerzas tensiles, estas fibras en la porción fibrosa de la cápsula articular se disponen al azar, lo cual le permite resistir fuerzas en muchas direcciones, lo que estabiliza la articulación y protege de traumas a la delicada membrana sinovial que la recubre internamente (Cormack, 1988; Palmer y Bertone, 1996). Las fibras colágenas se organizan en haces, que a su vez forman fascículos, entre los cuales se encuentra tejido conectivo laxo con una matriz amorfa que permite el movimiento independiente entre ellos. Esta relación estructural reduce la fricción en la cápsula articular y aumenta su elasticidad, lo que permite un amplio rango de movimiento articular (Pool, 1996).

La membrana sinovial, que recubre internamente la capa fibrosa de la cápsula articular, es un tejido conectivo laxo, ricamente irrigado e inervado, que reviste todo el interior de la articulación, con excepción de los cartílagos articulares. Las células que la conforman reciben el nombre de sinoviocitos, y tienden a concentrarse a lo largo del borde interno de la membrana, tan cerca unos de otros que en algunos casos le da el aspecto de una membrana celular continua (Cormack, 1988; Palmer y Bertone, 1996). Sin embargo, existen brechas entre estos sinoviocitos, lo que, junto con la ausencia de membrana basal, permite el flujo del exudado capilar hacia la cavidad articular (Palmer y Bertone, 1996). Estos sinoviocitos se dividen en sinoviocitos tipo A, tipo B y un tipo intermedio. Los de tipo A son los más abundantes, poseen propiedades fagocíticas y morfológicamente se asemejan a macrófagos, ya que poseen un prominente complejo Golgi y numerosos lisosomas. Los de tipo B, similares a los fibroblastos, tienen la capacidad de producir matriz amorfa y sintetizar ácido hialurónico a nivel de la membrana plasmática gracias a la actividad de la enzima hialuronato sintasa. Por último, existe un tipo de sinoviocito que tiene características intermedias entre estos dos tipos (Pool, 1996; Todhunter, 1996).

La membrana sinovial puede encontrarse en contacto directo con la cápsula fibrosa o puede estar separado de ella por una capa de tejido conectivo areolar o adiposo. A su vez, la superficie interna de la membrana sinovial puede ser lisa y brillante o bien presentar gran número de excrescencias o vellosidades. Según estas diferencias, Key (1932) distinguió tres

tipos morfológicos de membrana sinovial: 1) fibrosa, 2) areolar, y 3) adiposa (Cormack, 1988). Estudios realizados por Pool (1996) en articulaciones metacarpo falángica equina, corrobora la existencia de marcadas diferencias regionales en el revestimiento sinovial interno, lo que se refleja en diferentes zonas tanto estructurales como funcionales.

El subtipo fibroso se observa revistiendo ligamentos y tendones, y en otras zonas donde la cápsula articular es sometida a mayor estrés mecánico. Histológicamente se caracteriza porque sus células superficiales están muy separadas unas de otras, aunque son algo mayores y más numerosas que los fibroblastos que se hallan más lejos de la superficie. En los cortes muchas veces resulta difícil distinguirlas de los fibroblastos ordinarios. Está formado principalmente por sustancia intercelular, con relativamente pocas células (Cormack, 1988). En la articulación metacarpo falángica equina, este tipo de membrana sinovial se encuentra recubriendo el interior de la cápsula articular de la cara dorsal de la articulación, y carece de células en la zona donde la cápsula articular se inserta, adyacente a los cóndilos y a la cresta sagital de la epífisis distal del hueso III metacarpiano. La cantidad de sinoviocitos va gradualmente aumentando al alejarse del punto de inserción de la cápsula articular en el periostio y a medida que se acerca a los recesos articulares dorsales. Por lo tanto, gran parte de la capsula articular dorsal está cubierta por una membrana sinovial fibrosa, excepto en los recesos articulares. La red de capilares se ubica lejos de la superficie, por lo que muy poco o nada del líquido sinovial es producido por este tipo de membrana sinovial (Pool, 1996).

El subtipo areolar se encuentra en zonas donde la membrana sinovial necesita moverse libremente respecto de la capa fibrosa de la cápsula articular. Esta es una membrana sinovial bastante activa y se encuentra gran cantidad de sinoviocitos de los tres tipos, los que están muy cerca unos de otros, formando a veces tres o cuatro hileras, incluidas en una capa de fibras colágenas que se inserta en el tejido areolar subyacente (Cormack, 1988). Este tejido areolar es un tejido conectivo laxo, muy irrigado por una red de vasos sanguíneos de pequeño calibre, y contiene numerosas células similares a sinoviocitos. En estas zonas, la membrana sinovial se pliega formando vellosidades, lo que

incrementa su superficie y su capacidad de producir líquido sinovial (Banks, 1993; Pool, 1996)

La membrana sinovial de tipo adiposo reviste los acúmulos de grasa intraarticular y sus sinoviocitos se organizan en una capa superficial única que descansa sobre el tejido adiposo (Cormack, 1988). Gran parte de los recesos sinoviales de la cara palmar de la articulación metacarpo falángica equina se encuentran cubiertos por este tipo de membrana sinovial. Este tipo de membrana presenta numerosas ondulaciones y pliegues, presentando además numerosas fenestraciones y recesos que penetran dentro del tejido adiposo más profundo. Esta estructura de los recesos sinoviales palmares aporta una gran superficie para la producción de líquido sinovial y permite la distensión de la cavidad articular en caso de aumentar el líquido (Pool, 1996).

c. Líquido Sinovial:

El líquido sinovial se caracteriza por ser amarillo claro, transparente y viscoso, y sus principales funciones son lubricar, amortiguar y nutrir al cartílago articular, que carece de vasos sanguíneos o linfáticos (van Pelt, 1962, 1974; Parry, 1989).

El líquido sinovial es un ultrafiltrado proveniente de la diálisis que se realiza a nivel del extenso plexo capilar que irriga la superficie interna de la membrana sinovial, que se facilita por la ausencia de lámina basal, y al cual se adiciona ácido hialurónico producido por los sinoviocitos tipo B (Parry, 1989; Todhunter, 1996). El ácido hialurónico, un GAG no sulfatado, le confiere al líquido sinovial su viscosidad característica (Parry, 1989). El líquido sinovial, además, contiene una glicoproteína llamada lubricina, que juega un papel importante en la lubricación del cartílago. También es normal encontrar cierta cantidad de monocitos, linfocitos, macrófagos y una pequeña cantidad de neutrófilos, siempre que se encuentren en cantidades relativamente bajas (Cormack, 1988; Trotter y McIlwraith, 1996). Al respecto, van Pelt (1974) considera que el recuento celular total en el líquido sinovial equino normal no debe ser mayor a 167 ± 21 leucocitos/ μ l, aunque en un estudio anterior (1962) realizó conteos diferenciados para las distintas articulaciones, considerando normal para la articulación metacarpo falángica equina $266 \pm 112,20$ leucocitos/ μ l. Todhunter

(1996), no diferencia entre las distintas articulaciones del equino y considera normal para todas ellas un RCN menor a 500 por μl de líquido sinovial.

Los eritrocitos no son considerados constituyentes normales del líquido sinovial. Su presencia en pequeñas cantidades se atribuye generalmente a contaminación de la muestra en el momento de la artrocentesis. El contenido de eritrocitos del líquido sinovial puede variar enormemente debido al derrame sanguinolento que se puede producir desde la membrana sinovial durante la toma de la muestra, aumentando la posibilidad de que exista sangrado en membranas sinoviales hiperémicas. Debido a esta marcada variación, el conteo de eritrocitos no aporta información relevante (van Pelt, 1974; Trotter y McIlwraith, 1996).

La concentración de proteínas en el líquido sinovial normal es aproximadamente 25 - 35% de la concentración de la proteína plasmática del mismo animal (Trotter y McIlwraith, 1996). Los valores normales para caballos fueron determinados por van Pelt (1974) en $18,1 \pm 2,6$ mg/ml, a través del método de Biuret. Sin embargo, determinaciones realizadas por Adarmes *et al.* (2008) arrojó valores de $9,05 \pm 5,1$ mg/ml; lo que se acerca a los valores obtenidos por Villasante (2006), de $10,92 \pm 5,34$ mg/ml y por Adarmes *et al.* (2006), de $11,7 \pm 2,4$ mg/ml. Todas estas determinaciones fueron realizadas por el método espectrofotométrico de Lowry *et al.* (1951).

El análisis del líquido sinovial ha sido muy útil para evaluar la salud articular de una manera relativamente poco invasiva. Shmerling *et al* (1990), consideran que el recuento de leucocitos presentes en el líquido sinovial junto con la determinación del porcentaje de células polimorfonucleares, son suficientes para discriminar entre una patología articular inflamatoria y una no inflamatoria, siendo innecesarios los análisis bioquímicos ya que aportarían información redundante. Por el contrario, Trotter y McIlwraith (1996) consideran que un análisis útil como diagnóstico de la salud articular debe considerar un examen de la apariencia y viscosidad del líquido sinovial, junto a la determinación de proteínas totales y recuento de células nucleadas (RCN). Todos estos datos son muy útiles para evaluar el grado de sinovitis existente en la articulación, o para diagnosticar

rápidamente una artritis infecciosa, pero no se pueden utilizar ni extrapolar sus resultados para evaluar daños en el cartílago articular.

3. Fisiopatología de la osteoartritis equina.

La enfermedad articular más frecuente en el caballo es la osteoartritis (OA), también llamada enfermedad degenerativa articular (EDA) (McIlwraith, 1996). Este trastorno corresponde a un grupo de alteraciones de curso crónico, caracterizado por el deterioro progresivo del cartílago, acompañado por cambios de los tejidos blandos de la articulación y del hueso subcondral, siendo características comunes en esta enfermedad, la esclerosis ósea subcondral y la formación de osteofitos marginales (Peach *et al.*, 2005).

Los signos clínicos característicos en una OA son cojera, efusión sinovial y dolor. A pesar de que la degeneración del cartílago articular es una característica indispensable de la OA, los signos clínicos descritos tienen poca relación con las lesiones del cartílago, y se asocian más bien al dolor producido por la sinovitis, capsulitis o incluso dolor del hueso subcondral, en casos de erosión profunda del cartílago (Howard y McIlwraith, 1996).

La OA ha sido tradicionalmente clasificada como primaria o secundaria. Se dice que una OA es primaria cuando no existe una causa identificada y se considera como un trastorno propio de la articulación, que ocurre principalmente en individuos de edad avanzada. En cambio, la OA secundaria corresponde a una enfermedad donde el factor etiológico puede ser demostrado, asociándose en el caballo generalmente con trauma, sobreuso e inestabilidad articular, desarrollándose frecuentemente en etapas tempranas de la vida (Peach *et al.*, 2005). El término EDA se utilizó en un principio como sinónimo de OA primaria, sin embargo, a medida que avanza el conocimiento sobre la enfermedad y se conoce una mayor cantidad de factores etiológicos, la distinción entre OA primaria y secundaria se hace más difusa, por lo que el término EDA se utiliza actualmente como sinónimo de todas las formas de OA. Ehrlich (1987) sugiere que todas las OA son secundarias, aunque la causa no pueda ser identificada (McIlwraith, 1996).

A pesar de que pueden ser muchas las posibles causas de OA, la más común en caballos es el trauma sobre cualquiera de los tejidos articulares y el cuadro inflamatorio que este genera. Lo más frecuente es que esta lesión traumática se deba a sobreuso, a un trauma de baja intensidad sostenido en el tiempo, o bien a una inadecuada conformación anatómica, lo que expone al cartílago a fuerzas biomecánicas inapropiadas (Goodrich y Nixon, 2006). Independiente del punto de inicio de la reacción inflamatoria, ya sea en el cartílago, membrana sinovial, cápsula articular o hueso subcondral, el tejido afectado genera una cascada de mediadores inflamatorios, que al actuar sobre los tejidos articulares vecinos hará que estos también comiencen a liberar mediadores inflamatorios, generando una reacción en cadena (Goodrich y Nixon, 2006).

El mecanismo por medio del cual un daño agudo evoluciona hacia una degeneración progresiva del cartílago articular, instaurándose como una alteración crónica, ha sido objeto de numerosos estudios. Se ha demostrado que en cuadros inflamatorios como la sinovitis, el daño sobre los sinoviocitos produce la liberación de enzimas degradativas y citoquinas, las que pueden alterar el ambiente intra articular y afectar al cartílago (Howard y McIlwraith, 1996). También se ha sugerido que una alta presión intra articular, como ocurre cuando existe inflamación en una articulación dañada, puede ser suficiente para disminuir el flujo de sangre a través de los capilares sinoviales, lo que disminuye la tensión de oxígeno (McIlwraith, 1996). Además de la liberación directa de enzimas lisosomales (especialmente MMPs neutras), el trauma y la inflamación de la membrana sinovial gatillan la liberación de PGE₂, radicales libres y citoquinas, especialmente IL-1, la que causa indirectamente la liberación de MMPs desde el condrocito y la membrana sinovial. Estas moléculas se relacionan con la degradación del cartílago articular y del ácido hialurónico del líquido sinovial, y con la inhibición de la síntesis de componentes de la MEC del cartílago y de la membrana sinovial. Este desbalance en el recambio de la matriz, provocado por la pérdida de regulación de la síntesis y de la actividad de las MMPs, provoca la pérdida gradual de componentes de la MEC del cartílago, lo que conduce finalmente al desarrollo de la OA (Howard y McIlwraith, 1996; Nelson y Couto, 2003).

El aumento de células nucleadas en el líquido sinovial, producto de la inflamación, es un factor importante en el desarrollo de la OA, ya que producen IL-1 (Bono, 1998), la que ejerce una actividad citotóxica sobre los condrocitos, produce la liberación de MMPs y aumenta fuertemente la producción de radicales libres, especialmente óxido nítrico (NO). Clegg *et al.* (1997a) describen la presencia de dos MMPs en el líquido sinovial equino, la MMP-2 y la MMP-9, encontrándose una correlación directa entre la actividad de la MMP-9 la cantidad de células nucleadas presentes en el líquido sinovial. Se ha descrito que ambas enzimas podrían degradar colágeno tipo XI, un componente del cartílago hialino. Además, existe evidencia de que la MMP-9 también es producida por macrófagos y células sinoviales, y se ha confirmado la expresión de estas MMPs en condrocitos (Yoshihara *et al.*, 2000).

4. Respuesta del cartílago al trauma.

La característica esencial en la OA es la degeneración del cartílago, la que se evidencia macroscópicamente por la presencia de fibrilación, focos de erosión y líneas de roce (McIlwraith, 1996). El desarrollo de una OA se ve facilitado debido a la insuficiente capacidad reparativa del cartílago articular ante un daño, ya que carece de un “pool” celular indiferenciado dentro del tejido cartilaginoso y los condrocitos poseen una baja actividad mitótica (Mardones y Figueroa, 2001).

Se ha propuesto que la degradación enzimática del cartílago articular precede a los cambios morfológicos del mismo, teniendo un rol central en la OA. Esta degradación bioquímica es producto de una pérdida en el equilibrio de los procesos homeostáticos normales de degradación y síntesis de la MEC, que mantienen la integridad funcional de la articulación (McIlwraith, 1996).

Los primeros cambios que se pueden apreciar microscópicamente al comenzar a degenerarse el cartílago articular es la pérdida de proteoglicanos y la disrupción de su organización, la que se debe tanto a una disminución en su síntesis como a un aumento en su degradación. Esto lleva a una disminución en la consistencia y espesor del cartílago,

aumentando su permeabilidad (Mardones y Figueroa, 2001). Junto con esto, también se ve alterada la estructura de las fibras de colágeno, lo que aumenta el contenido de agua del cartílago y la liberación de proteoglicanos. No existe consenso acerca de cuál de estos eventos ocurre primero, pero en conjunto producen una pérdida en la resistencia del cartílago a las fuerzas de tensión y compresión (McIlwraith, 1996).

Al análisis histológico, se puede observar desgaste de la superficie articular, adelgazamiento o pérdida de cartílago articular, fibrilación superficial, que puede progresar para formar fisuras verticales hasta el hueso subcondral, y pérdida de condrocitos, la que se manifiesta en un aumento de las lagunas vacías en la matriz (Roush *et al.*, 2002). Los signos patológicos crónicos que se presentan en la OA están en directa relación con el daño que sufre el cartílago, encontrándose degradación del cartílago articular, resorción del hueso subcondral y fragmentación del cartílago, lo que produce erosión de su superficie y por consiguiente pérdida de cartílago articular (McIlwraith, 1996).

5. Respuesta de la cápsula articular y la membrana sinovial al trauma.

Cuando la articulación se daña, tanto la cápsula fibrosa como la membrana sinovial se alteran. Si el daño es agudo, la membrana sinovial se congestiona, apareciendo cambios en su coloración debido tanto a la hiperemia propia de la inflamación como al acúmulo de pigmentos producto de la ruptura de glóbulos rojos (Pool, 1996). En casos de sinovitis o en cuadros iniciales de OA, se observa una gran infiltración de linfocitos y macrófagos en el tejido conectivo de la membrana sinovial, un aumento del grosor de la capa de sinoviocitos que recubre internamente a la membrana y un aumento en la cantidad de vasos sanguíneos. A medida que el daño se hace crónico, se produce una hiperplasia de la membrana sinovial, especialmente en los recesos sinoviales; sin embargo, a la observación microscópica, la capa de sinoviocitos que recubre la membrana sinovial se observa más delgada que en cuadros inflamatorios o de OA iniciales (Benito *et al.*, 2005). Los sinoviocitos se ven hipertróficos y la cantidad de linfocitos y macrófagos presentes en el tejido conectivo de la membrana sinovial es menor que en OA tempranas. Algo similar sucede con el número de vasos sanguíneos, que es mucho mayor en etapas iniciales de OA que en cuadros crónicos.

En la OA crónica, acúmulos de sinoviocitos metaplásicos pueden formar nódulos de tejido cartilaginoso llamados condromas sinoviales (Pool, 1996, Benito *et al.*, 2005).

La capa fibrosa de la cápsula articular, al sufrir un trauma o estrés mecánico de mayor intensidad al de sus niveles fisiológicos, se edematiza y congestiona. El fluido edematoso se acumula en espacios de tejido blando que separa los fascículos de fibras de colágeno que forman la cápsula articular y el ligamento capsular. Si el edema persiste, se produce infiltración de fibroblastos que forman fibras de colágeno. Este nuevo tejido fibroso reemplaza a la matriz amorfa, ocupando los lugares donde existía tejido blando y se anquilosa con los fascículos de haces de colágeno, produciendo un adelgazamiento de la cápsula articular y una pérdida del rango normal de movimiento de la articulación (Palmer y Bertone, 1996; Pool, 1996)

En la membrana sinovial, producto de la fibrosis y de los cambios estructurales descritos en articulaciones con OA crónica, disminuye la difusión de plasma sanguíneo a través de ella, lo que afecta el metabolismo de los sinoviocitos (Trotter y McIlwraith, 1996). Por esto, la cantidad de líquido sinovial producida es menor y de peor calidad, con un menor contenido de ácido hialurónico producto del daño existente en los sinoviocitos, lo que disminuye la capacidad lubricante del líquido sinovial, ya que su viscosidad está relacionada directamente con el contenido de ácido hialurónico (Trotter y McIlwraith, 1996). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Adames *et al.* (2006, 2008), quienes detectaron, en forma indirecta, un menor contenido de ácido hialurónico en líquidos sinoviales de articulaciones con daño crónico.

6. Metaloproteinasas

Las MMPs han demostrado tener un rol crucial en la degradación del colágeno tipo II y del agregán, lo que las convierte en un elemento muy importante en el estudio de la OA. Estas enzimas corresponden a un grupo de endopeptidasas que deben su nombre a que requieren de un Zn^{+2} en su sitio activo para realizar su actividad catalítica (Clegg *et al.*, 1997b; Pool, 1996).

En el cartílago articular sano, las MMPs son esenciales para el recambio normal de la MEC. En la articulación sinovial, la principal fuente de MMPs son los condrocitos y la membrana sinovial, siendo secretadas como proenzimas que son activadas extracelularmente por serin-proteasas o por otras MMPs ya activadas (Trumble *et al.*, 2001). Una vez activadas, estas enzimas son capaces de destruir todos los componentes de la MEC; sin embargo, más del 95% de las MMPs presentes en los tejidos de una articulación sana se encuentran en su forma latente o inhibida (Trumble *et al.*, 2001; Brama *et al.*, 2004). Su actividad puede ser regulada a tres niveles: en su síntesis y secreción, en su activación y también por medio de inhibidores tisulares para MMPs (TIMP-1 y TIMP-2), los que actúan neutralizando la forma activa (Poole, 1996; Clegg *et al.*, 1997b; Trumble *et al.*, 2001).

La relación entre MMPs y TIMPs es variable según el estado del individuo. En cartílagos humanos saludables se ha encontrado un pequeño exceso de TIMPs sobre las MMPs, lo que mantiene un recambio de MEC equilibrado. Sin embargo, esta relación se invierte en cuadros osteoartróticos, encontrándose una mayor concentración de MMPs sobre los TIMPs, rompiéndose el equilibrio y así la velocidad de degradación de la MEC supera la capacidad de síntesis de sus componentes por los condrocitos (Trumble *et al.*, 2001; Brama *et al.*, 2004; Clutterbuck *et al.*, 2008).

Según el sustrato sobre el que actúan, las MMPs identificadas a la fecha, pueden agruparse de la siguiente manera (Clutterbuck *et al.*, 2008):

- **Colagenasas:** MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18
- **Gelatinasas:** MMP-2, MMP-9
- **Estromelisininas:** MMP-3, MMP-10, MMP-11
- **Matrixinas:** MMP-7, MMP-26
- **MMPs de membrana (MT-MMPs):** MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25, (también conocidas como MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP y MT6-MMP respectivamente)

- **Otras:** MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 Y MMP-28.

A pesar de que cada MMP tiene una especificidad de sustrato que la distingue, éstas no actúan exclusivamente sobre un solo sustrato, por lo que existe actividad cruzada entre estas enzimas (Clutterbuck *et al.*, 2008).

Las MMPs más importantes asociadas a los procesos de remodelación de la MEC son la colagenasa 1 (MMP-1), la colagenasa 3 (MMP-13), que son capaces de degradar el colágeno tipo II, la estromelisina 1 (MMP-3) que degrada el agregán, y las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) (Poole, 1996; Trumble *et al.*, 2001).

La MMP-2, también llamada gelatinasa A o colagenasa tipo IV, es una proteinasa de 72-kDa, que degrada principalmente colágeno tipo II denaturado y colágeno tipo IV, aunque también tiene actividad significativa sobre fibronectina, elastina, y los colágenos tipo V, VII, X y XI (McIlwraith, 1996; Clegg *et al.*, 1997a). La MMP-2 es producida por condrocitos y fibroblastos de la membrana sinovial, y su presencia en articulaciones equinas sinoviales normales es constitutiva y cumple un rol homeostático, al remover colágeno anormal desde la MEC (Trumble *et al.*, 2001).

La MMP-9, también llamada gelatinasa B o colagenasa tipo V, es una proteinasa de 92 kDa, secretada principalmente por neutrófilos y macrófagos activados, que actúa principalmente sobre colágenos tipo IV y V (McIlwraith, 1996; Clegg *et al.*, 1997a). La MMP-9 es producida principalmente por neutrofilos, macrófagos y linfocitos, y se ha descrito que los niveles de MMP-9 son proporcionales al RCN en el líquido sinovial de articulaciones con artritis séptica (Clegg *et al.*, 1997a; Trumble *et al.*, 2001; Kidd *et al.*, 2007).

Tanto la MMP-2 como la MMP-9 se encuentran en el líquido sinovial equino principalmente en su forma latente, sea una articulación normal o patológica, pero se ha descrito que la concentración de pro-MMP-2 es significativamente mayor en articulaciones

patológicas. A diferencia de otras MMPs, la pro-MMP-2 no es capaz de ser activada mediante enzimas proteolíticas, siendo activada por mecanismos que aun no están claros (Clegg *et al.*, 1997a; Trumble *et al.*, 2001). El aumento de pro-MMP-2 en articulaciones patológicas puede indicar que la MMP-2 cumple una función activadora de otras enzimas como la MMP-9 o la MMP-13 (Trumble *et al.*, 2001). En cuanto a la MMP-9, en articulaciones patológicas con RCN muy altos, tanto la pro-MMP-9 como su forma activa se encuentran elevadas, siendo su presencia muy baja o inexistente en articulaciones normales (Kidd *et al.*, 2007; Trumble *et al.*, 2001).

OBJETIVO GENERAL

- Relacionar el RCN y la actividad gelatinásica de las MMP-2 y MMP-9 del líquido sinovial, con posibles alteraciones histológicas del cartílago de la articulación metacarpofalángica equina, sin daños visibles a la observación macroscópica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad gelatinásica de las MMP-2 y MMP-9 del líquido sinovial de articulaciones macroscópicamente sanas con diferente RCN.
- Describir histológicamente el cartílago articular de los cóndilos del III metacarpiano de articulación metacarpofalángica equina, macroscópicamente sana y con distinto RCN.
- Relacionar los cambios histológicos del cartílago con las variables analizadas en el líquido sinovial.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Material biológico

Se utilizaron 15 articulaciones metacarpofalángica, provenientes de 15 caballos criollos distintos, obtenidas inmediatamente después del beneficio en el matadero “La Pintana”. En este estudio no se consideró las variables sexo ni edad, ya que las condiciones actuales en el matadero impiden su determinación.

Se obtuvo líquido sinovial por medio de artrocéntesis aséptica. Para ello se extrajo la piel de la zona, se limpió y desinfectó con alcohol isopropílico al 90% y se realizó una punción sobre los recesos sinoviales con una jeringa estéril de 5 ml. Esta muestra se mantuvo en hielo. Luego, con bisturí, se realizó una artrotomía, dejando expuesto el cartílago articular y la membrana sinovial para evaluar macroscópicamente el estado de la articulación, a fin de clasificarla como normal o alterada en forma crónica. Fueron clasificadas como normales (N) aquellas que presentaron un cartílago color blanco nacarado o color beige, con su superficie lisa y brillante, su membrana sinovial no congestiva y el líquido sinovial incoloro o amarillo, transparente y sin flóculos o trazas de sangre (Figuras 5 y 6). Como control positivo, se utilizaron articulaciones con alteración crónica, que incluyen cambios en el cartílago, como focos de erosión y líneas de roce, que evidencian una alteración prolongada en el tiempo (Figuras 7 y 8).

Fueron descartadas todas aquellas articulaciones con signos de alteración aguda o alteraciones crónicas con signos de reagudización, como congestión en la membrana sinovial, derrame sanguinolento o aumento de volumen de la articulación.



Fig. 5 Cartílago articular blanco nacarado



Fig. 6 Cartílago articular beige



Fig. 7 Cartílago articular con focos de erosión



Fig. 8 Cartílago articular con líneas de roce

Figuras 5 y 6 Cartílago articular y membrana sinovial macroscópicamente normales; **figuras 7 y 8** Cartílago articular y membrana sinovial con alteraciones crónicas. (Fotografías: Maximiano Lemaître, Andrea Müller)

Una vez realizada la clasificación, con una hoja de bisturí estéril se obtuvo láminas superficiales de cartílago de ambos cóndilos de la epífisis distal del gran metacarpiano, sin incluir cartílago calcificado. Las muestras fueron almacenadas inmediatamente en frascos individuales y rotulados, con formalina al 10%.

2. Recuento de células nucleadas y procesamiento del líquido sinovial

En el laboratorio se extrajo una alícuota de 200 μl de líquido sinovial para realizar un RCN totales en cámara de Neubauer. El resto del líquido sinovial, volumen variable entre 2 y 5 ml, fue centrifugado a 4.000 x g por 15 min a 4°C, en una centrífuga refrigerada SORVALL Superspeed modelo RC2-B. El criterio de tiempo y velocidad de centrifugación se determinó en base a la ausencia de células en el sobrenadante a la inspección microscópica. El sobrenadante se dispuso en alícuotas en tubos eppendorf de 1,7 ml, previamente rotulados, y se mantuvo congelado a -76°C , hasta su procesamiento posterior. Fueron eliminadas las muestras en las que se encontró gran cantidad de eritrocitos en su líquido sinovial o un pellet rojo luego de la centrifugación, a fin de descartar posibles procesos inflamatorios y evitar interferencia en los resultados producto de algún derrame sanguinolento debido a la punción o por daños estructurales en la membrana sinovial que afecten su capacidad de filtrar.

3. Determinación de proteínas totales

En los líquidos sinoviales obtenidos se determinó la concentración de proteínas por el método espectrofotométrico de Lowry *et al.* (1951), utilizando un estándar de albúmina sérica bovina fracción IV y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Fueron descartadas aquellas muestras que presentaron un contenido proteico mayor a 17 g/L, a fin de descartar procesos inflamatorios no visibles a simple vista.

4. Agrupación de muestras para su estudio

En base a los datos obtenidos mediante la inspección macroscópica y el RCN en el líquido sinovial, se establecieron tres grupos de estudio, con un $n = 5$ para cada uno:

Grupo 1. Articulaciones normales a la inspección macroscópica, con un RCN inferior a 300/ μl en su líquido sinovial.

Grupo 2. Articulaciones normales a la inspección macroscópica, con un RCN superior a 600/ μ l en su líquido sinovial.

Grupo 3. Articulaciones con alteración crónica a la inspección macroscópica, como control positivo.

En el caso de los grupos 1 y 2 se descartó las muestras con RCN en el rango de 300 a 599/ μ l, para que ambos grupos fueran marcadamente diferentes en términos de su RCN.

Tanto la concentración de proteínas como el RCN constituyeron los filtros finales que permitieron la selección de las 15 articulaciones utilizadas en este estudio.

5. Determinación de la actividad gelatinásica de las MMP-2 y MMP-9

Se determinó la actividad gelatinásica de las MMP-2 y MMP-9 para cada una de estas articulaciones, para lo cual se utilizó el método descrito por Valenzuela *et al.* (1999), que consiste en someter las muestras a electroforesis en gel de poliacrilamida copolimerizada con gelatina al 1% (Zimograma).

Para ello, cada muestra de líquido sinovial se diluyó en una proporción de 1:4 en una solución que contiene Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,01%. Posteriormente se cargó una alícuota de 10 μ l de cada muestra en dos geles de poliacrilamida, los que se sometieron a una electroforesis (gel separador al 8%) a un voltaje constante de 100 volts durante una hora. 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 contiene Tris-HCl 100 mM pH 8 y CaCl₂ 5 mM. Ambos geles fueron teñidos durante 1 hora con azul de Coomassie. Finalmente los geles fueron secados en papel celofán.

La actividad gelatinásica se evidenció como bandas claras en el gel, que fueron escaneadas y posteriormente se les realizó un análisis densitométrico, con el programa computacional TotalLab™, versión TL120, de Nonlinear Dynamics, que cuantifica los pixeles correspondientes a cada banda gelatinolítica obtenida. También con este programa computacional se realizó la determinación de la masa molecular de las bandas, 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)

Todas las muestras fueron sometidas simultáneamente al mismo proceso, sin embargo, para hacer más comparables los resultados entre los dos geles, una muestra de líquido sinovial fue cargada en ambos geles como patrón interno. Los pixeles correspondientes a cada muestra fueron divididos por los pixeles de este patrón interno, obteniéndose un valor arbitrario: unidades densitométricas relativas (UDR), según el método descrito por Goldbach-Mansky *et al.* (2000).

6. Tinciones histológicas

Para la evaluación histológica de las muestras de cartílago, que se encontraban almacenadas en formalina al 10%, fueron deshidratadas progresivamente en alcohol a diferentes concentraciones e impregnadas en parafina con un procesador automático de tejidos. Una vez terminado este proceso, se incluyó los tejidos en cubos de parafina para poder seccionarlos con micrótopo a 7µm, y se preparó tres placas histológicas para cada muestra de cartílago, las que se tiñeron con hematoxilina-eosina, a fin de evaluar las características histológicas y el daño en el cartílago articular. Las tinciones se realizaron según el protocolo descrito por López *et al.* (1982).

7. Análisis histológico

El análisis histológico incluyó la medición del grosor de la zona superficial del cartílago articular (Figuras 9 y 10), como un indicador de degradación del tejido cartilaginoso y de pérdida de matriz extracelular en dicha zona. Además se evaluó la cantidad de condrocitos, grupos isógenos y lagunas vacías de un área determinada (Figura 11), que en el último caso correspondería a un indicador de muerte celular.

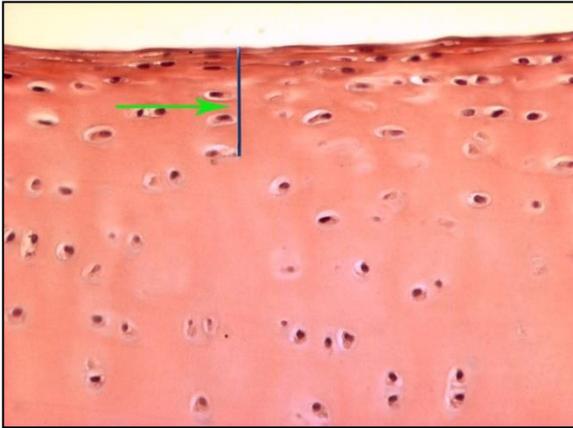


Fig. 9 Ejemplo del grosor de la zona superficial de un cartílago articular normal. Hematoxilina – Eosina. Aumento 20X.

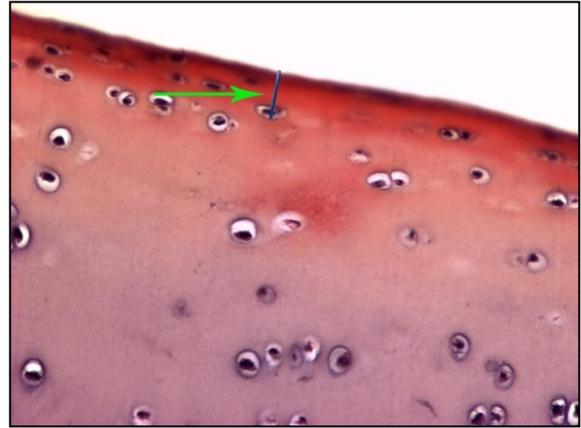


Fig. 10 Ejemplo del grosor de la zona superficial de un cartílago articular patológico. Hematoxilina – Eosina. Aumento 20X.

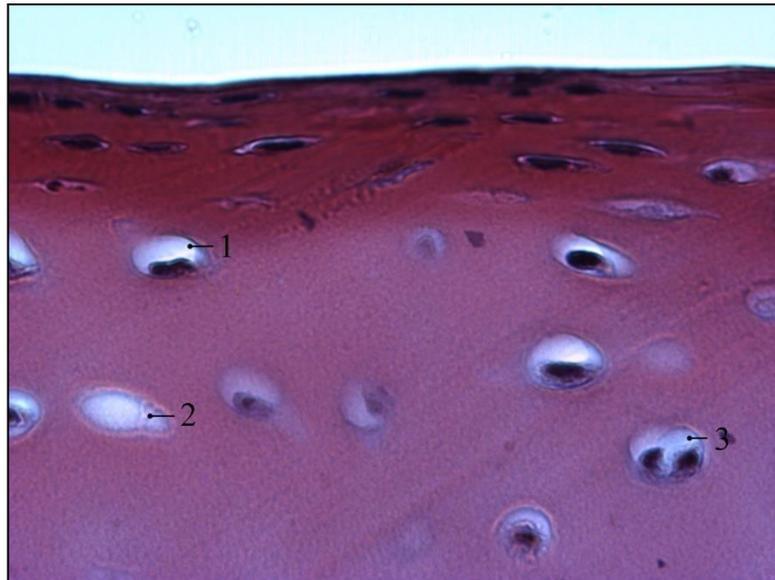


Fig. 11 Ejemplo de los elementos celulares evaluados en el análisis histológico, donde **1** muestra un condrocito, **2** una laguna vacía (condroplasto) y **3** un grupo isógeno. Hematoxilina – Eosina.

Para evaluar el grosor de la zona superficial del cartílago, se midió en cinco puntos diferentes para cada placa, con un aumento de 10X, desde la superficie del cartílago hasta la zona donde los condrocitos cambian de forma aplanada a circular. De las 15 mediciones para cada muestra, se sacó un promedio.

Para determinar la cantidad de condrocitos, grupos isógenos y lagunas vacías, se realizó el recuento de estos elementos en un campo visual completo, con un aumento de 10X, luego se midió el área involucrada en micras cuadradas y, finalmente, se calcularon los valores de cada muestra para un área estándar de 1 mm², por medio de regla de tres.

8. Análisis de datos

Se realizaron cuadros para mostrar los valores de RCN, proteínas totales y UDR, los que se presentaron junto con los valores promedio para cada variable en cada grupo \pm la desviación estándar de las muestras en relación con sus promedios. Lo mismo se hizo para los resultados obtenidos en el análisis histológico.

Con el fin de establecer si las diferencias observadas entre los grupos eran estadísticamente significativas, se realizó un análisis de varianza. Para las variables en las que se observó diferencias significativas por medio del análisis de varianza, se realizó además la prueba HSD de Tukey, para detectar qué grupos eran distintos. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa computacional Statistica 6.0.

Además, se calculó el coeficiente de correlación entre los valores del RCN y la pro-MMP-9, entre las proteínas totales y la cantidad de lagunas vacías y entre las proteínas totales y el grosor de la zona superficial del cartílago, con el programa Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS

En el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, se ha buscado definir la condición no inflamatoria de la articulación metacarpo falángica equina, tanto cuando su aspecto es normal a la inspección macroscópica como cuando existe una condición patológica. Para ello, en este trabajo, se evaluó la actividad de las MMPs 2 y 9 en el líquido sinovial, y las características histológicas del cartílago articular normal a la inspección macroscópica, considerando distintos recuentos celulares en el líquido sinovial como el elemento diferencial entre los grupos. Con el fin de evaluar ambos grupos normales en condiciones no inflamatorias, se consideró para todos los grupos una concentración de proteínas totales en el líquido sinovial de hasta 17 g/L. Además, se seleccionó un grupo con alteraciones macroscópicas en el cartílago articular como control positivo, el que también debía tener una concentración de proteínas de hasta 17 g/L en el líquido sinovial.

En los siguientes cuadros (1-3), se muestra los valores de RCN y de proteínas totales en el líquido sinovial para cada uno de los grupos analizados. Luego, en el cuadro N° 4, se muestra el resumen de los valores promedio de cada grupo.

Cuadro N° 1 Recuento de células nucleadas y concentración de proteínas totales en el grupo 1 (Normal, RCN < 300/ μ l).

MUESTRA	RCN/ μ l	Proteínas (g/L)
1	135	4,5
2	63	7,8
3	123	8,3
4	70	5
5	85	7,3
Promedio	95 \pm 32,1	6,58 \pm 1,7

Cuadro N° 2 Recuento de células nucleadas y concentración de proteínas totales en el grupo 2 (Normal, RCN > 600/ μ l).

MUESTRA	RCN/ μ l	Proteínas (g/L)
1	1.258	10
2	1.435	9,8
3	760	11
4	605	11,8
5	1.053	11,1
Promedio	1.022 \pm 342,6	10,74 \pm 0,8

Cuadro N° 3 Recuento de células nucleadas y concentración de proteínas totales en el grupo 3 (Con alteraciones macroscópicas)

MUESTRA	RCN/ μ l	Proteínas (g/L)
1	68	5,3
2	528	14,2
3	450	15,8
4	123	17
5	123	16,2
Promedio	258 \pm 213,4	13,7 \pm 4,8

Cuadro N° 4 Cuadro resumen con valores promedio para cada grupo.

Grupo	RCN/ μ l	Proteínas (g/L)
1	95 \pm 32,1	6,58 \pm 1,7 (a)
2	1.022 \pm 342,6	10,74 \pm 0,8 (a,b)
3	258 \pm 213,4	13,74 \pm 4,8 (b)

Letras distintas: Indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Se encontró diferencia significativa en la concentración de proteínas totales entre el grupo 1, normal con bajo RCN, con el grupo 3, control patológico.

Con el fin de establecer si el recuento celular del líquido sinovial tiene relación con la actividad de las MMP-2 y MMP-9, se midió actividad gelatinolítica en el líquido sinovial de cada muestra, mediante zimografía.

En primer lugar, mediante la electroforesis, se estableció la presencia de bandas gelatinolíticas de distinta masa molecular (70, 88 y 102 kDa), como se muestra en la figura 12. Así, la banda de 70 kDa se detectó en todas las muestras analizadas, mientras que la de 88 kDa estuvo presente en un 73% de las muestras y la de 102 kDa en un 93%.

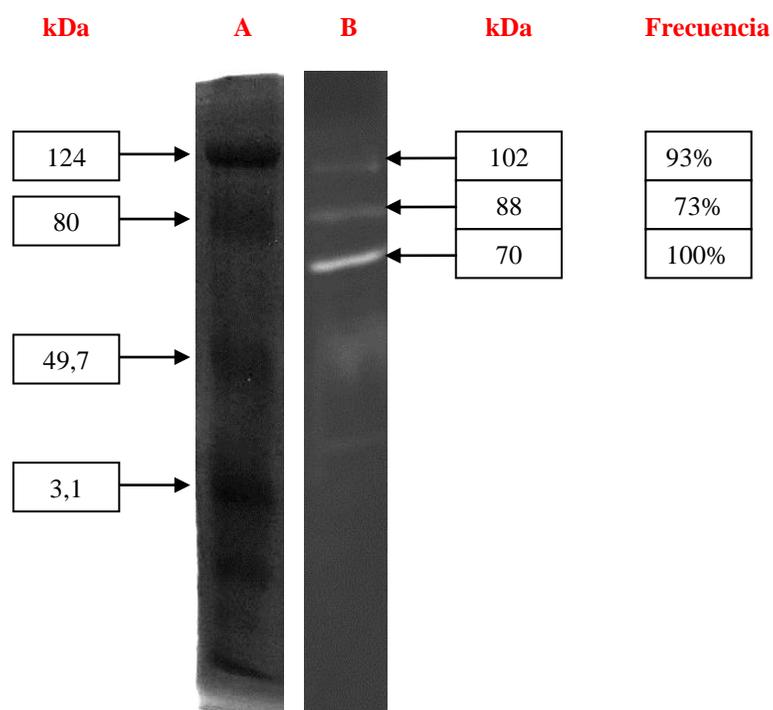


Fig 12: El carril A muestra los patrones de masa molecular conocida (kDa). En el carril B se observan las bandas producidas por la actividad gelatinolítica del líquido sinovial, en una muestra representativa con las tres bandas descritas.

En segundo lugar, con el fin de evaluar la intensidad de cada banda gelatinolítica, se realizó un análisis densitométrico, que se expresó en unidades densitométricas relativas (UDR), que se calcularon según lo descrito en “Material y Método”. Los resultados de la zimografía se expresan en los siguientes cuadros:

Cuadro N° 5 Densitometría (UDR) de bandas gelatinolíticas del grupo 1 (Normal, RCN < 300/ μ l)

MUESTRA	70 kDa	88 kDa	102 kDa
1	0,25	0,13	0,52
2	0,43	0,31	0,05
3	0,91	-	1,39
4	0,26	-	-
5	0,33	-	0,37
Promedio	0,44 \pm 0,27	0,22 \pm 0,12	0,58 \pm 0,57

Cuadro N° 6 Densitometría (UDR) de bandas gelatinolíticas del grupo 2 (Normal, RCN > 600/ μ l)

MUESTRA	70 kDa	88 kDa	102 kDa
1	0,51	1,4	0,58
2	0,5	1,21	0,43
3	1,6	1,48	0,54
4	1,24	0,71	0,36
5	1,00	1,00	1,00
Promedio	0,97 \pm 0,47	1,16 \pm 0,31	0,58 \pm 0,24

Cuadro N° 7 Densitometría (UDR) de bandas gelatinolíticas del grupo 3 (Patológico).

MUESTRA	70 kDa	88 kDa	102 kDa
1	0,66	0,55	1,53
2	3,23	0,87	2,37
3	1,09	0,71	0,81
4	0,7	0,82	0,31
5	1,38	-	0,17
Promedio	1,41 \pm 1,05	0,74 \pm 0,14	1,04 \pm 0,91

Cuadro N° 8 Cuadro resumen de los valores promedio del análisis densitométrico (UDR) para cada grupo.

Grupo	70 kDa	88 kDa	102 kDa
1	0,44 ± 0,27	0,22 ± 0,12 (a)	0,58 ± 0,57
2	0,97 ± 0,47	1,16 ± 0,31 (b)	0,58 ± 0,24
3	1,41 ± 1,05	0,74 ± 0,14	1,04 ± 0,91

Letras distintas: Indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Los resultados indican que la banda de 88 kDa, que está presente en el 73% de las muestras, muestra diferencia significativa entre el grupo 1, normal con bajo RCN, y el grupo 2, normal con alto RCN.

A continuación, se muestra los resultados obtenidos del estudio histológico con hematoxilina-eosina, que incluyen el grosor de la zona superficial del cartílago, la cantidad de condrocitos, grupos isógenos y lagunas vacías en un área determinada.

Cuadro N° 9 Análisis histológico del grupo 1 (Normal, RCN < 300/ μ l)

N°	Recuento en 1 mm ²			Ancho zona superficial (micrones)
	Condrocitos	Grupos isógenos	Lagunas vacías	
1	177,2	22,3	6,8	87,52
2	212,4	20,5	11,2	100,27
3	231,4	41,8	8,8	73,95
4	186,7	23,0	4,4	78,57
5	192,4	19,5	5,1	86,05
Promedio	200,0 ± 21,7	25,4 ± 9,2	7,3 ± 2,7	85,27 ± 10,04

Cuadro N° 10 Análisis histológico del grupo 2 (Normal, RCN > 600/ μ l)

N°	Recuento en 1 mm ²			Ancho zona superficial (micrones)
	Condrocitos	Grupos isógenos	Lagunas vacías	
1	176,1	13,7	39,2	63,10
2	159,0	16,9	23,1	90,22
3	206,0	13,6	58,8	104,28
4	180,2	11,8	31,2	88,97
5	152,7	25,1	35,4	88,75
Promedio	174,8 ± 20,8	16,2 ± 5,2	37,5 ± 13,3	87,06 ± 14,89

Cuadro N° 11 Análisis histológico del grupo 3 (Patológico)

N°	Recuento en 1 mm ²			Ancho zona superficial (micrones)
	Condrocitos	Grupos isógenos	Lagunas vacías	
1	119,3	11,2	9,3	32,94
2	163,7	33,3	40,7	46,46
3	105,7	1,6	91,5	19,24
4	85,2	3,5	71,0	25,82
5	233,7	38,5	24,6	25,11
Promedio	141,5 ± 59	17,6 ± 17,1	47,4 ± 33,5	29,91 ± 10,44

Cuadro N° 12 Cuadro resumen de análisis histológico

Grupo	Recuento en 1 mm ²			Ancho zona superficial (micrones)
	Condrocitos	Grupos isógenos	Lagunas vacías	
1	200,0 ± 21,7	25,4 ± 9,2	7,3 ± 2,7	85,27 ± 10,04 (a)
2	174,8 ± 20,8	16,2 ± 5,2	37,5 ± 13,3	87,06 ± 14,89 (a)
3	141,5 ± 59	17,6 ± 17,1	47,4 ± 33,5	29,91 ± 10,44 (b)

Letras distintas: indican diferencia significativa

El grupo 3, que corresponde al control positivo patológico, muestra una disminución significativa de la zona superficial del cartílago. Además, en este grupo, tiende a disminuir el número de condrocitos y a aumentar el número de lagunas vacías.

Con el fin de establecer si existe alguna relación entre estas variables, se determinó el coeficiente de correlación entre ellas. Se encontró que el contenido de la MMP de 88 kDa y el RCN son variables que se encuentran altamente correlacionadas, con un coeficiente de correlación de 0,72, lo que se puede apreciar en el gráfico N° 1.

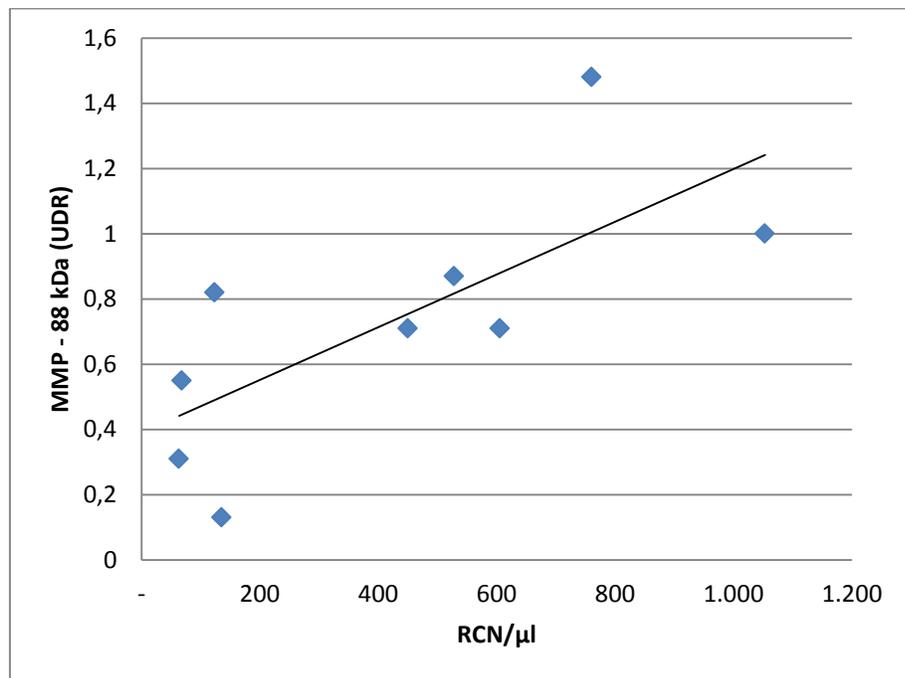


Gráfico N°1 Relación entre el recuento de células nucleadas y el contenido de MMP de 88 kDa en el líquido sinovial. Coeficiente de correlación: 0,72.

Además, se encontró que los valores de proteínas totales y la cantidad de lagunas vacías se encuentran altamente correlacionados, con un coeficiente de correlación de 0,78.

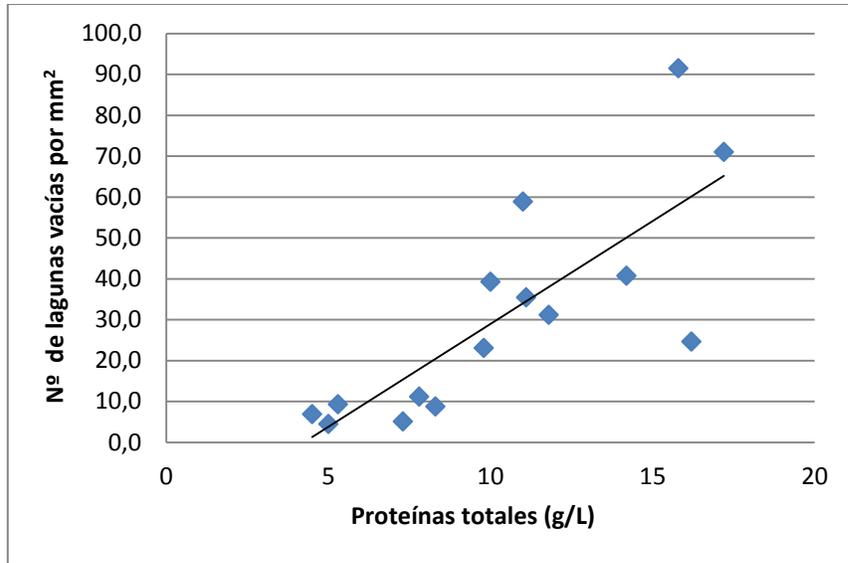


Gráfico N°2 Relación entre el contenido de proteínas totales y el número de lagunas vacías por mm² en el cartílago articular. Coeficiente de correlación: 0,78.

También se encontró una correlación negativa importante entre la cantidad de proteínas totales y el grosor de la zona superficial del cartílago articular, con un coeficiente de correlación de - 0,6.

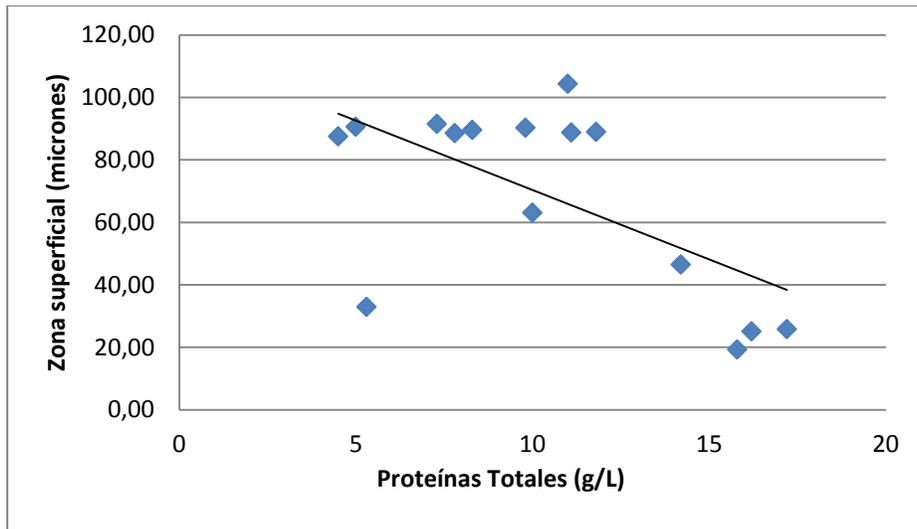


Gráfico N°3 Relación entre el contenido de proteínas totales y el grosor de la zona superficial en el cartílago articular. Coeficiente de correlación: - 0,6.

DISCUSIÓN

En la evaluación de la salud articular, el líquido sinovial es capaz de aportar información de una forma relativamente poco invasiva. Dentro del análisis del mismo, el recuento de células nucleadas es una característica que, a lo largo del tiempo, se ha considerado como un factor importante al momento de diferenciar patologías articulares, o bien para evaluar la normalidad de una articulación. En este estudio, que se enfoca en la normalidad articular, se consideró el recuento de células nucleadas en el líquido sinovial como el factor diferencial para definir ambos grupos normales, una vez realizada la clasificación macroscópica. Con el fin de incluir un control positivo, se estableció un grupo con alteraciones macroscópicas del cartílago articular.

Como ha sido descrito por van Pelt (1962, 1974) y Todhunter (1996), una articulación normal no debería tener más de 500 células nucleadas por μl de líquido sinovial. Sin embargo, en algunas de nuestras muestras de matadero se encontraron articulaciones clasificadas como normales a la inspección macroscópica, pero con recuentos celulares bastante elevados respecto a lo descrito por van Pelt (1962, 1974) y Todhunter (1996).

Por esto, ambos grupos de articulaciones normales se dividieron según su recuento de células nucleadas en el líquido sinovial, a fin de evaluar si esta diferencia en el contenido celular se traduce en alguna alteración no apreciable a simple vista, tanto a nivel histológico como en la actividad de las MMPs 2 y 9.

Puesto que lo que se busca en este trabajo es caracterizar un modelo de normalidad articular, se seleccionaron articulaciones cuya concentración de proteínas totales en el líquido sinovial fuese igual o inferior a 17 g/L, según lo descrito por Adames *et al.* (2006, 2008) y Villasante (2006) para articulaciones normales.

En nuestros resultados, a pesar de que se estableció un límite superior en la cantidad de proteínas totales, se encontraron diferencias significativas entre el grupo normal con bajo

recuento celular ($6,58 \pm 1,7$ g/L) con el grupo patológico ($13,74 \pm 4,8$ g/L), lo que se podría asociar en este último caso a un predominio de los procesos proteolíticos a nivel articular. El grupo normal con alto recuento celular (>600 células nucleadas) en el líquido sinovial, no mostró diferencias significativas en su concentración de proteínas con los otros grupos.

En relación a la actividad de las MMPs 2 y 9 en el líquido sinovial, se identificaron bandas de 70, 88 y 102 kDa (Figura 12). De acuerdo a Clegg (1997a), la pro-MMP-2 correspondería a una enzima de 64 kDa, mientras que su forma activa tendría un peso molecular de 59 kDa. Sin embargo, McIlwraith (1996) describe a la pro-MMP-2 como una proteinasa de 72 kDa, antecedente que se ajusta a lo encontrado en este trabajo (70 kDa). También Astorga (2007), en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, utilizando una metodología semejante a la de este trabajo, llega al mismo resultado que el de este estudio, describiendo como pro-MMP-2 a una banda de 70 kDa.

Esta banda de 70 kDa se detectó en todas las muestras de nuestro estudio, lo que indica que su expresión sería constitutiva. Esto permite suponer que esta enzima podría tener un rol fisiológico en el recambio molecular normal en la articulación. Sin embargo, se observó a través del análisis densitométrico que esta pro-MMP-2 mostró una tendencia a aumentar en el grupo patológico. Esto se relacionaría con el incremento de los procesos catabólicos e indicaría su participación en los procesos degradativos intraarticulares. Esto es coincidente con lo descrito para la pro-MMP-2, lo que entrega otro antecedente que respalda la identificación de la banda de 70 kDa con esta proenzima.

Por otro lado, Clegg (1997a) describe la pro-MMP-9 en su forma monomérica como una proenzima de 94 kDa, y su forma activa correspondería a una banda de 85 kDa. McIlwraith (1996) a su vez, describe la pro-MMP-9 como una proenzima de 92 kDa. De acuerdo con estos antecedentes, la banda de 88 kDa detectada en este trabajo es la que más se aproxima a lo descrito como pro-MMP-9, y fue detectada en el 73% de las muestras.

Además, la banda de 102 kDa encontrada en nuestro trabajo, que fue detectada en un 93% de las muestras, podría corresponder a un complejo formado por la unión de una pro-MMP-2, de 72 kDa, con un TIMP-2, de 21 kDa (Taraboletti *et al.*, 2002); sin embargo es difícil comprender la presencia de una banda gelatinolítica en este caso, dado el efecto inhibidor del TIMP.

En relación al análisis densitométrico de las bandas gelatinolíticas (cuadro N° 8), se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) únicamente en la banda de 88 kDa entre ambos grupos normales, con distinto recuento celular. Así, a mayor recuento celular en el grupo 2 ($1.022 \pm 342,6$ RCN/ μ l), se encontró mayor actividad gelatinolítica de esta banda de 88 kDa en el análisis densitométrico ($1,16 \pm 0,31$ UDR) respecto al grupo 1 ($0,22 \pm 0,12$ UDR), con bajo recuento celular ($95 \pm 32,1$ RCN/ μ l). Estas dos variables se encontraron altamente correlacionadas, con un coeficiente de correlación de 0,72.

Esta banda de 88 kDa estuvo presente en el 100% de las muestras con recuento celular elevado en el líquido sinovial, y sólo en un 40% de las muestras con bajo recuento celular, lo que entrega otro antecedente que permite afirmar que la banda de 88 kDa corresponde a la pro-MMP-9, dado que esta enzima proteolítica se produce principalmente por las células neutrófilas (Clegg, 1997a).

Con respecto a la descripción histológica del cartílago articular, se encontró ausencia de diferencias significativas entre los tres grupos, tanto en el recuento de condrocitos como de los grupos isógenos, que indican la presencia de mitosis. Aparece diferencia significativa en el grosor de la zona superficial del cartílago de ambos grupos normales respecto al grupo control patológico, lo que se podría considerar como esperable, dado el aspecto macroscópico del cartílago en este grupo.

Sin embargo, se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ambos grupos normales en relación al contenido de lagunas vacías (Grupo 1: $7,3 \pm 2,7$; Grupo 2: $37,5 \pm 13,3$). Este resultado se relacionaría con el elevado recuento celular encontrado en el líquido sinovial del grupo 2 ($1.022 \pm 342,6$) respecto al grupo 1 ($95 \pm 32,1$), y que de

alguna forma podría estimular la muerte de condrocitos. El aumento en el número de células que muestran signos de degeneración o muerte en el cartílago es un signo característico de osteoartritis, y se ha relacionado tanto con procesos apoptóticos como necróticos. Es posible que esto se deba al aumento de la producción de radicales libres como el óxido nítrico por parte de los leucocitos presentes en el líquido sinovial y de los mismos condrocitos, ya que el exceso de producción de este último ha sido relacionado con apoptosis de condrocitos, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, aunque los mecanismos exactos mediante los cuales el óxido nítrico puede producir apoptosis en estas células todavía no se comprende completamente (Pelletier *et al.*, 2000; Roush *et al.*, 2002). Junto con contribuir a la degradación de la matriz, la muerte de condrocitos es ahora considerada como un factor que contribuye de manera importante en la reducción cuantitativa de la matriz extracelular en OA. La pérdida de condrocitos reduce la capacidad del cartílago de repararse y puede acelerar el progreso de las lesiones, particularmente en etapas tempranas de OA, cuando el proceso reparativo predomina (Pelletier *et al.*, 2000; Henrotin *et al.*, 2003).

Por otro lado, la concentración de proteínas totales se correlacionó en forma negativa con el grosor de la zona superficial del cartílago, con un coeficiente de correlación de $-0,6$, lo que se podría asociar con el aumento de los procesos catabólicos del cartílago en el grupo patológico.

El recuento de condrocitos no mostró diferencia significativa entre los tres grupos, aunque se encontró que tiende a disminuir hacia el grupo patológico.

CONCLUSIONES

- Recuentos celulares elevados en el líquido sinovial se relacionaron con un incremento en la actividad de la MMP-9.
- La expresión de la MMP-2 sería de naturaleza constitutiva.
- Se encontró diferencia significativa en el grosor de la zona superficial del cartílago articular entre los grupos normales y el grupo control patológico.
- En ambos grupos normales, con similar apariencia macroscópica pero con distintos recuentos celulares, no se encontró diferencia significativa en el grosor de la zona superficial del cartílago, en el recuento de condrocitos totales y en la cantidad de grupos isógenos. Si se encontró diferencias en la actividad de la MMP-9 y en la cantidad de lagunas vacías, valores que fueron significativamente mayores en el grupo con elevado recuento de células nucleadas en su líquido sinovial.

BIBLIOGRAFÍA

1. ADARMES, H.; CROXATTO, A.; GALLEGUILLOS, M.; GONZÁLEZ, E. 2006. Contenido de glicosaminoglicanos, aldehídos y proteínas en el líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. *Arch. Med. Vet.* 38 (1): 47-52.
2. ADARMES, H.; VÁSQUEZ, F.; GALLEGUILLOS, M.; GONZÁLEZ, E. 2008. Detección de glicosaminoglicanos de la matriz del cartílago articular en el líquido sinovial de carpo equino con fractura en esquirola. *Arch. Med. Vet.* 40, 77-81.
3. ASTORGA, F. 2007. Memoria de Título Médico Veterinario. Detección de actividad de metaloproteinasas 2 y 9 en líquido sinovial de la articulación carpal y suero sanguíneo, de equinos Fina Sangre de Carrera con inflamación aguda y alteración crónica reagudizada. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
4. BANKS, W. J. 1993. *Applied veterinary histology*. 3ª ed. Orlando, Florida, Mosby International, 103-111.
5. BENITO, M. J.; VEALE, V. J.; FITZGERALD, O.; VAN DEN BERG, W. B.; BRESNIHAN, B. 2005. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64: 1263-1267.
6. BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M. 1992. *Medicina veterinaria*. 7ª ed. México, Nueva Editorial Interamericana. Vol. 1.
7. BONO, M.R. 1998. Citoquinas. En: *Fundamentos de Inmunología*. Ferreira A., Palomo I., Roseblatt M., Sepúlveda C., Vergara U., 1ª Ed.: 219-250.
8. BRAMA, P. A.; VAN DEN BOOM, R.; KIERS, G. H.; WEEREN, P. R. 2004. Collagenase-1(MMP-1) activity in equine synovial fluid: influence of age, joint pathology, exercise and repeated arthrocentesis. *Equine Vet. J.* 36(1): 34-40.
9. CLEGG P.D., BURKE R.M., COUGHLAN A.R., RIGGS C.M., CARTER S.D. 1997a. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Vet. J.* 29 (5): 335-342.
10. CLEGG, P. D.; COUGHLAN, A. R.; RIGGS, R. M.; CARTER, S. D. 1997b. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet. J.* 29 (5): 343-348.

11. CLUTTERBUCK, A. L.; HARRIS, P.; ALLAWAY, D.; MOBASHERI, A. 2008. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *Vet. J.* doi:10.1016/j.tvjl.2008.09.022
12. CORMACK, D. H. 1988. *Histología de HAM*, 9ª Ed.: 400-417.
13. ERLICH, G. E. 1987. The subclinical phase of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 14(S14): 88-90.
14. FIRTH, E. C. 1996. Functional joint anatomy and its development. *En McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. Joint disease in the horse.* W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 80-86.
15. GETTY, R. 1982. Sindesmología general (artrología). *En: Anatomía de los animales domésticos.* Sisson S., Grossman J.D., 5ª Ed.: 42-44.
16. GOODRICH L. R.; NIXON, A. J. 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *Vet. J.* 171: 51-59.
17. 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.
18. HALL, A. C.; BUSH, P. G.; DAVIDSON, M. E. B.; KEMPSON, S. A. 2003. Equine articular cartilage chondrocytes: opening the black box. *Equine vet. J.* 35 (5): 425-428.
19. HENROTIN, Y. E.; BRUCKNER, P.; PUJOL, J.-P. L. 2003. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *OsteoArthritis and Cartilage* 11: 747-755.
20. HOWARD, R. D.; MCILWRAITH C. W. 1996. Hyaluronan and its use in the treatment of equine joint disease. *En McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. Joint disease in the horse.* W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 257-269.
21. JACKSON, R. L.; BUSCH, S. J.; CARDIN, A. D. 1991. Glycosamino-glycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* 71: 481-539.
22. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R. O. 1989. *Basic histology.* 6ª ed. Norwalk, Connecticut, Appleton & Lange. pp

23. KIDD, J. A.; BARR, A. R.; TRALTON, J. F. 2007. Use of matrix metalloproteinases 2 and 9 and White blood cell counts in monitoring the treatment and predicting the survival of horses with septic arthritis. *Vet. Rec.* 161: 329-334.
24. LOPEZ M. L., LEYTON C., GRAF M. E. 1982. Técnicas de histología y citología. 2ª Ed.: 13-14, 36-37.
25. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-675.
26. MALIKIDES, N. 2007. Equine lameness. En: McGowan, C. M.; Stubbs, N.; Goff, L. *Animal physiotherapy : assessment, treatment and rehabilitation of animals.* Blackwell. Oxford, UK; Ames, Iowa. Pp. 82
27. MARDONES, R.; FIGUEROA, D. 2001. Cartílago normal y patológico. *Rev. Chilena Ortop. y Traum.* 42: 91-99.
28. MCILWRAITH C. W. 1996. General pathobiology of the joint and response to injury. *En* McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. *Joint disease in the horse.* W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 40-70.
29. NELSON, R. W.; COUTO, C. G. 2003. *Small Animal Internal Medicine.* 3ª Ed. Mosby. Missouri. 1079p.
30. OSTALOWSKA, A.; BIRKNER, E; WIECHA, M.; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; KAPOLKA, D.; ZON-GIEBEL, A. 2006. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in sinovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthr. Cartil.* 14: 139-145.
31. PALMER, J. L.; BERTONE, A. L. 1996. Joint biomechanics in the pathogenesis of traumatic arthritis. *En* McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. *Joint disease in the horse.* W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 104-119.
32. PARRY, B. W. 1989. Synovial Fluid. En: Cowell, R. L.; Tyler, R. D. *Diagnostic cytology of the dog and the cat.* Goleta, California, USA. American Veterinary Publications, Pp. 121-136.
33. PEACH, C. A.; CARR, A. J.; LOUGHLIN, J. 2005. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *J mol med* 11(4): 186-191.
34. PELLETIER, J. P.; JOVANOVIC, D. V.; LASCAU-COMAN, V; FERNANDEZ, J. C.; MANNING, P. T.; CONNOR, J. R.; CURRIE, M. G.; MARTEL-PELLETIER, J. 2000.

- Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo. *Arthr Rheum* 43(6): 1290-1299.
35. POOL, R. R. 1996. Pathologic manifestations of joint disease in the athletic horse. *En McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 87-104.*
 36. RAY, C.S.; POOLE, A.R.; MCILWRAITH, C.W. 1996. Use of synovial fluid and serum markers in articular disease. *En McIlwraith, C.W., Trotter G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 203-216.*
 37. ROUSH, J. K.; MCLAUGHLIN, R. M.; RADLINSKY, M. A. 2002. Understanding the pathophysiology of osteoarthritis. *Veterinary medicine* 108-117.
 38. SHMERLING, R. H.; DELBANCO, T. L.; TOSTESSON, A. N.; TRENTHAM, D. E. 1990. Synovial fluid tests. What should be ordered? *J.A.V.M.A.* 264(8): 1009-1014.
 39. STOCKWELL, R. A. 1991. Cartilage failure in osteoarthritis: relevance of normal structure and function: a review. *Clin Anat.* 4, 161-191.
 40. TARABOLETTI, G.; D'ASCENZO, S.; BORSOTTI, P.; GIAVAZZI, R.; PAVAN, A.; DOLO, V. 2002. Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-Associated Components by Endothelial Cells. *American Journal of Pathology* 160 (2): 673-680.
 41. TODHUNTER, R.J. 1996. Anatomy and physiology of sinovial joints. *En McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 1-28*
 42. TROTTER, G. W.; MCILWRAITH, C. W. 1996. Clinical features and diagnosis of equine joint disease. *En McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 120-145.*
 43. TRUMBLE, T. N.; TROTTER, G. W.; THOM, J. R.; MCILWRAITH, C. W.; CAMMARATA, S. GOODNIGHT, J. L.; BILLINGHURST, R. C.; FRISBIE, D. D. 2001. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am. J. Vet. Res.* 62(9):1467-1477.
 44. TSUJI, G.; KOSHIBA, M.; NAKAMURA, N.; KOSAKA, H.; HATACHI, S.; KURIMOTO, C.; KUROSAKA, M.; HAYASHI, Y.; YODOI, J.; KUMAGAI, S. 2006.

- Thioredoxin protects against joint destruction in a murine arthritis model. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1721-1731.
45. VALENZUELA, M, A.; CARTIER, L.; COLLADOS, L.; KETTHUM, 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.
46. VAN PELT, R. W. 1962. Properties of equine synovial fluid. *J.A.V.M.A.* 141(9):1051-1061.
47. VAN PELT, R. W. 1974. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. *J.A.V.M.A.* 165(1):91-95.
48. VILLASANTE, A. 2006. Memoria de Título Médico Veterinario. Determinación de la capacidad antioxidante y del daño oxidativo en el líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina macroscópicamente sana y con daño crónico. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
49. YOSHIHARA Y., NAKAMURA H., OBATA K., YAMADA H., HAYAKAWA T, FUJIKAWA K., OKADA Y. 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59(6): 455-461

ANEXO N° 1

Tabla resumen global

Grupo	RCN/ μ l	Proteínas (g/L)	MMP 70 kDa	MMP 88 kDa	MMP 102 kDa	Condrocitos mm^2	Grupos isógenos mm^2	Lagunas Vacías mm^2	Grosor zona Superficial (micrones)
1	95 \pm 32,1	6,58 \pm 1,7	0,44 \pm 0,27	0,22 \pm 0,12	0,58 \pm 0,57	200,0 \pm 21,7	25,4 \pm 9,2	7,3 \pm 2,7	85,27 \pm 10,04
2	1.022 \pm 342,6	10,74 \pm 0,8	0,97 \pm 0,47	1,16 \pm 0,31	0,58 \pm 0,24	174,8 \pm 20,8	16,2 \pm 5,2	37,5 \pm 13,3	87,06 \pm 14,89
3	258 \pm 213,4	13,74 \pm 4,8	1,41 \pm 1,05	0,74 \pm 0,14	1,04 \pm 0,91	141,5 \pm 59	17,6 \pm 17,1	47,4 \pm 33,5	29,91 \pm 10,44