



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“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”

FRANCISCA ASTORGA ARANCIBIA

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

PROFESOR GUÍA: MARCO A. GALLEGUILLOS

SANTIAGO – CHILE
2007

RESUMEN

Las Metaloproteinasas (MMPs) son una familia de endopeptidasas involucradas tanto en los procesos de remodelación tisular, como en la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Las MMP-2 y MMP-9, conocidas también como gelatinasas, son capaces de degradar elementos de la matriz extracelular. Estas enzimas están asociadas a procesos degradativos como el que ocurre en la enfermedad degenerativa articular (EDA). Las MMPs son secretadas en forma zimógenas, expresadas como proMMPs. Este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en el líquido sinovial (LS) de articulación del carpo y en suero sanguíneo (S) de equinos Fina Sangre de Carrera (FSC), con procesos articulares agudos y crónicos reagudizados. Se detecta y cuantifica la actividad mediante zimografía, y se comparan las actividades detectadas en ambos grupos de estudio.

Se utilizó LS proveniente de la articulación del carpo y S de equinos FSC del Hipódromo Chile de dos grupos de animales. El primer grupo correspondió a equinos con inflamación aguda (grupo A, n = 10). El segundo grupo correspondió a aquellos con patología articular crónica re-agudizada (grupo C, n = 15). Además se obtuvieron 5 muestras de S desde ejemplares sin patología articular, a modo de referencia, y no para consideraciones estadísticas. Se midió la concentración de proteínas totales (PT) de cada muestra. Se determinó la actividad gelatinolítica de cada muestra mediante zimografía en gel de poliacrilamida al 8% con gelatina 0,1%. Estos geles fueron digitalizados y densitometrados, cuantificando el número de píxeles asociados a cada banda con actividad gelatinolítica. La actividad gelatinásica se expresó en unidades relativas a la muestra control cargada en cada gel (u.r.), y a las u.r. en relación a los mg de PT. Los resultados se presentaron como promedio de u.r. \pm desviación estándar, comparándose los distintos grupos mediante análisis de varianza (andeva).

No se detectaron diferencias significativas entre el grupo A y C, tanto en LS como en S. Se detectó actividad de proMMP-2 en todas las muestras, y la actividad de la proMMP-9 fue detectada en todas las muestras de S pero sólo en un 80,8% de las muestras de LS.

Respecto a la proMMP-2, no se detectó diferencia significativa en su actividad sérica entre los grupos A y C, incluso al dividir por las PT. En los grupos A y C no se evidenció diferencia para la actividad proMMP-2 entre S y LS, pero al considerar las PT como denominador, se encontró que en el grupo A la actividad de la proMMP-2 es significativamente mayor en el LS que en el S. Tanto en el grupo A como en el C, la actividad de la proMMP-2 en el LS fue significativamente mayor que la de MMP-9.

Dentro de las muestras en las que se detectó la proMMP-9, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad de la proMMP-9 del LS entre los grupos A y C.

La forma dímera de la MMP-9 en LS se detectó sólo en S, en 16 de sus muestras (61.5% del total de muestras de S estudiadas)

En las muestras de S del grupo de ejemplares normales, ambas enzimas presentaron valores de actividad significativamente menores al compararlos con la de los grupos A y C.

Las gelatinasas no cambian de manera importante su actividad gelatinolítica al comparar grupos con patologías articulares agudas, con ejemplares con patologías crónicas reagudizadas, tanto en el LS como en el S. Así también podemos concluir que las gelatinasas no se comportan igual en los distintos medios, teniendo mayor actividad la MMP-9 en S y la MMP-2 en LS. Al tener el S de ejemplares normales una menor actividad gelatinolítica, queda como posibilidad el uso de gelatinasas en S como marcadores de daño articular.

ABSTRACT

The metalloproteinases (MMPs) are a family of endopeptidases involved in tissue remodeling processes as in degradation of extracellular matrix elements. MMP-2 and MMP-9 are MMPs known as gelatinases. These enzymes are associated to degradative processes, present in degenerative joint disease. The MMPs are synthesized as zymogens, expressed as proMMPs. The objective of the present study is to determine the gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 in the synovial fluid (SF) of the carpus joint and in blood serum (S) of pure-blood racehorses with acute articular pathological process and activated chronic joint process. The gelatinolytic activity is detected and quantified with zymography electrophoresis, and the activities detected are compared in both study groups.

The carpus joint SF and the S of the pure bred racehorse from the [hippodrome](#) of both groups were used. The first group included the equines with acute articular process (group A, n = 10). The second group included those with a chronic activated articular process (group C, n = 15). Besides, we analyzed 5 samples of S from equines with no articular pathology, that were used as a reference, but not considered in the statistics. The total protein (TP) concentration was measured of each sample. The gelatinolytic activity was determined by zymography in a polyacrilamide gel 8% with gelatine 0,1%. These gels were digitalized and pixelated, quantifying the number of pixels associated to each band of gelatinolytic activity. This activity was expressed in relative units (r.u.), in relation with the control sample insert in each gel, and to the r.u. associated with the TP. The results were presented as an average \pm standard deviation, and the different groups were compared with ANDEVA program.

There was not significant difference of gelatinolytic activity between group A and C, not in the LS or the S fluid. The proMMP-2 activity was detected in all the samples, and the activity of the proMMP-9 was detected in all the S samples, but only in a 80, 8% of the LS samples.

There was no significant difference between serum activity of proMMP-2 from group A and C, not even when the results were expressed associated with TP. In the A and C groups, there was no difference in proMMP-2 activity between S and SF. But in the A group, the activity in the LS was higher than the S activity when TP was

considered. In the group A and in the group C, the activity of the proMMP-2 in the SF was significant higher than the activity of the proMMP-9.

In the SF samples where proMMP-9 was detected, there was no difference in its gelatinolytic activity between group A and C.

The dimeric form of the proMMP-9 was detected only in S samples, in 16 samples (61.5% of the S samples).

In the S samples of normal horses, both enzymes showed a lower activity compared with A and C groups.

The gelatinases do not change in an important level their activity when an acute pathologic joint group is compared with a chronic reactivated degenerative joint disease group, in SF and in S. We also can conclude that gelatinases do not have the same activity in SF and in S, having a higher activity the proMMP-9 in S and the proMMP-2 in the SF. In the S of non pathological groups have lower gelatinolytic activity, leaving the gelatinases as a possible target for markers of joint damage.

In the A group as in the C group, the activity of the proMMP-2 in the SF was significant higher than the proMMP-9. The dimeric form of MMP-9 was detected in 16 samples (7% of the total samples), all from the C group. In both study groups the activity of proMMP-9 was significant lower in the SF than in S. In the S samples of the non pathological equines, both enzymes showed lower levels of gelatinolytic activity, when compared with group A and C.

1. INTRODUCCIÓN

Los caballos de carrera están sometidos constantemente a una alta exigencia deportiva, lo que genera traumas sobre las estructuras que conforman su aparato locomotor. Estas exigencias, así como el trauma repetitivo en el tiempo, pueden provocar adaptaciones, y también distintos grados de alteración, que van desde una leve sinovitis hasta la pérdida completa de la articulación, y con ello del ejemplar (McIlwrith, 1996).

Las enfermedades articulares de origen traumático son una causa común de menor rendimiento en equinos atléticos y de consulta en la clínica equina, por lo que constituyen un campo de constante investigación. Cada día se utilizan nuevos recursos tecnológicos para prevenir, detener y reparar los daños surgidos a partir de los traumas en las articulaciones. Con esta finalidad es necesario promover la investigación científica que contribuya a establecer el mecanismo implicado en el desarrollo del daño articular.

En general el diagnóstico de una enfermedad degenerativa articular se realiza de forma tardía, y la evaluación de su progreso es poco clara. El control constante de esta enfermedad a través de métodos poco invasivos es un objetivo dentro de la medicina equina y humana. Se ha establecido que la presencia de ciertas moléculas en el líquido sinovial, como son las metaloproteinasas, podría servir como indicadores de grados de enfermedad articular. Es en ésta línea de estudio que se plantea esta investigación.

Este trabajo plantea evaluar la actividad de dos metaloproteinasas involucradas (MMP-2 y MMP-9) en los procesos de destrucción articular, tanto en el líquido sinovial como en el suero sanguíneo, de ejemplares que presentan patologías articulares agudas y crónicas reagudizadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Las Articulaciones

Las articulaciones son el componente del sistema locomotor que permite realizar movimientos. Las articulaciones sinoviales o diartrosis se caracterizan por proporcionar un alto grado de movilidad a los huesos. Desde el punto de vista anatómico, en ella se enfrentan dos superficies óseas opuestas cubiertas por cartílago articular que delimita una cavidad interna denominada cavidad articular o sinovial, y que contiene al líquido sinovial (Getty, 2000).

Entre las estructuras que componen las articulaciones sinoviales se encuentran:

- Cápsula Articular
- Cartílago Articular
- Líquido Sinovial

La **cápsula articular** está formada por dos capas, una externa compuesta por tejido fibroso, formado por una estructura de colágeno densa y otra interna, la membrana sinovial. Ambas capas se encuentran unidas alrededor de las superficies articulares (Getty, 2000).

La cápsula esta bien inervada por fibras nociceptivas, por lo tanto, el dolor asociado con cualquier lesión directa es intenso, siendo la cápsula articular el órgano sensitivo de la articulación (Colahan *et al.*, 1998).

La **membrana sinovial** (MS) de la articulación es una capa celular de aproximadamente 0,5-5 mm de grosor, normalmente de color blanco amarillento, lisa y brillante. Envuelve las superficies internas de tendones y articulaciones, teniendo irrigación, inervación y vasos linfáticos (Vásquez, 2001; Tarner *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2005). La MS tiene como principal función la producción de líquido sinovial y de algunas enzimas de importancia en el recambio de la matriz extracelular (MEC) normal y en patologías articulares, así como algunas citoquinas y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). También cumple importantes funciones inmunes y de mantención de las articulaciones, tendones y bursa (Colahan *et al.*, 1998; Clement *et al.*, 2005).

Histológicamente, la MS está organizada en estratos celulares (ver Fig.1). La capa más próxima a la cavidad articular está formada por una capa de células alineadas en forma

incompleta, llamada sinovial íntima. Luego de una red de microvascularización superficial se encuentra una capa formada por tejido conectivo denominada subíntima o subsinovia (Garnero *et al.*, 2000; Vázquez, 2001).

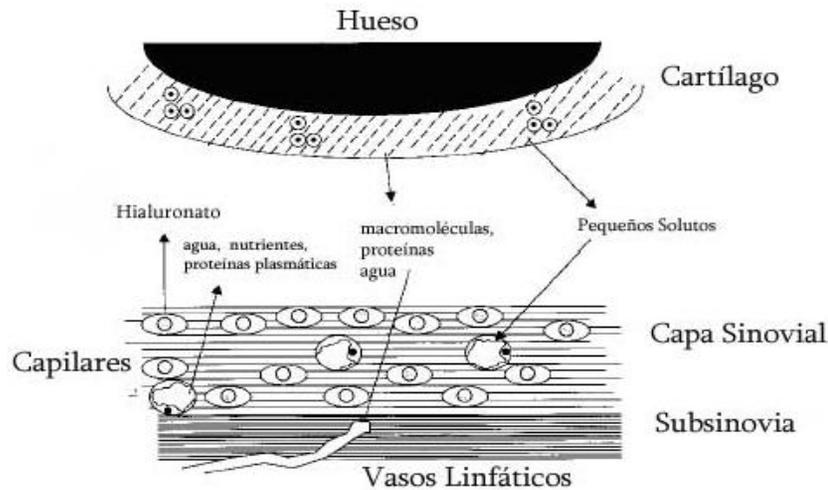


Fig. Nº 1: Esquema de Membrana Sinovial (Garnero *et al.*, 2000).

El **líquido sinovial (LS)** es un líquido claro y viscoso (Syn= como, oival= relativo al huevo), que corresponde a un dializado plasmático modificado por la adición de ácido hialurónico desde las células sinoviales especializadas, cuya función principal es la lubricación de las superficies articulares (San Román, 2000).

El LS participa en las funciones de transporte hacia y desde el cartílago articular de moléculas nutritivas y de desecho (moléculas provenientes del recambio de la matriz extracelular), ya que éste tejido carece de irrigación. Para la función articular es importante la secreción hacia el LS de distintas enzimas, inhibidores de enzimas, mediadores y glicoproteínas lubricantes (Colahan *et al.*, 1998; Clement *et al.*, 2005).

Otro componente importante del LS son las proteínas, cuyo valor normal aproximado es de 20 g/L, siendo su patrón electroforético similar al del suero. Si la cantidad de proteína presente en LS fuera anormal, esto debería reflejarse en la sangre al considerar la permeabilidad de la MS. La alteración en los niveles de proteína en el LS se puede producir por diferentes factores, como la acción de mediadores de la inflamación (Killingsworth, 1982; Colahan *et al.*, 1998).

El LS normal también contiene células mononucleares como sinoviocitos, monocitos y linfocitos, los que constituyen un 90% del total de las células presentes. Los cambios

asociados al recuento de células nucleadas en el LS pueden ser difíciles de interpretar, pero existen ciertos rangos celulares asociados, por ejemplo, a sepsis (Colahan *et al.*, 1998).

El LS recibe elementos de desecho y del metabolismo articular, de modo que su análisis proporcionaría indicadores de las reacciones y del estado de la articulación. Muchos elementos bioquímicos del LS han sido investigados para determinar su eficiencia como marcadores o indicadores de daño articular específico, metabolismo o velocidad de recambio de la MEC del cartílago articular. Se ha descrito un aumento significativo en los niveles de actividad gelatinásica de las metaloproteinasas a los pocos días luego de la lesión, manteniéndose aumentada por unos 100 días. Los análisis de algunos de los componentes bioquímicos del LS se han descrito como aporte para el monitoreo de la función y metabolismo articular (Petersson *et al.*, 1997; Swan *et al.*, 2002; Adames *et al.*, 2003; Billinghamurst *et al.*, 2004).

El **hueso subcondral** provee soporte estructural al cartílago articular que está sobre él. Se ha propuesto que un aumento o disminución de la rigidez (“*stiffness*”) del hueso subcondral podría resultar en una lesión del cartílago articular (McIlwrite, 1996).

En el caso de lesión, las células del hueso subcondral juegan un rol tanto en su propia reparación como en la del cartílago articular. Los osteoblastos son capaces de secretar metaloproteinasas de matriz, especialmente luego de la estimulación con citoquinas como IL-1 y TNF- α (McIlwrite, 1996).

El **cartílago articular** (CA) es un tejido que forma parte de las superficies articulares de los huesos, variando de grosor en las diferentes articulaciones, que tiene como función principal ayudar a reducir la fricción que producen los movimientos (Getty, 2000).

El cartílago articular es avascular, liso, sin inervación, y su consistencia es parecida a un gel. Está formado por una red dispersa, constituida por un único componente celular, los condrocitos, que se encuentran rodeados por una matriz extracelular (Getty, 2000; Tarrago, 2003).

El cartílago articular aporta con tono y tensión al tejido articular. Durante el andar, existen fuerzas de tensión considerables que presionan la articulación, amortiguadas por la deformación del cartílago que aparece en respuesta a fuerzas de compresión (Frenkel *et al.*, 1999; San Román, 2000).

La **matriz extracelular** del cartílago articular (MEC) es la responsable de las características mecánicas del cartílago, y está íntegramente sintetizada por los condrocitos. El agua representa entre un 60-80%, siendo mayor el porcentaje en la superficie, y menor en la profundidad. Un 10% está representado por una red de colágeno, un 10-15% por proteoglicanos (PGs) y el resto son otras proteínas, algunos de los cuales todavía no han sido identificados (Poole *et al.*, 2002; Garnero *et al.*, 2000; Sopena *et al.*, 2003).

El **colágeno** es una macromolécula fundamental de la MEC, y está compuesto por una triple hélice de cadenas polipeptídicas las que se organizan formando fibrillas, que a su vez se organizan originando las fibras de colágeno (Frenkel *et al.*, 1999; San Román, 2000).

Existen diferentes variantes de colágeno que se distinguen por la composición de las cadenas que forman la triple hélice. Aproximadamente el 90-95% del colágeno del cartílago articular es el tipo colágeno II, existiendo en menor cantidad los tipos V, VI, IX y XI. También puede encontrarse colágeno tipo IV, pero en asociación con procesos osteoartíticos (Frenkel *et al.*, 1999; San Román, 2000; Sopena *et al.*, 2003).

El colágeno articular se organiza en una red, que se asocia a otras moléculas de matriz, siendo la más común con los proteoglicanos que forman agregados macromoleculares con el ácido hialurónico (Poole *et al.*, 2002).

Una apreciación de la estructura de los **proteoglicanos** (PGs) (Figura N° 2) es fundamental para entender la función de estas moléculas en el cartílago articular. Los PGs son responsables de gran parte de las propiedades fisicoquímicas del tejido, y se puede decir que mientras el aporte del colágeno es la tensión, el de los PGs es la capacidad de hidratación del tejido y su resistencia a la compresión (San Román, 2000).

Los PGs son moléculas de alta masa molecular, formados por una proteína central a las que se le une covalentemente y en forma perpendicular una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs). Sus características van a depender tanto de su proteína central como de los GAGs a los que se encuentre unido.

Un glicosaminoglicano (GAGs) consiste en una gran cadena lineal de unidades repetidas de disacáridos de hexosamina (glucosamina o galactosamina) alternando con otros residuos de carbohidratos (ácido glucurónico, ácido idurónico, o galactosa). Una de las principales características de los GAGs que afectan relevantemente las propiedades del

cartílago, es su capacidad para retener agua, manteniendo a la matriz con este alto porcentaje de agua que la caracteriza. El PGs más abundante es el agregán (San Román, 2000).

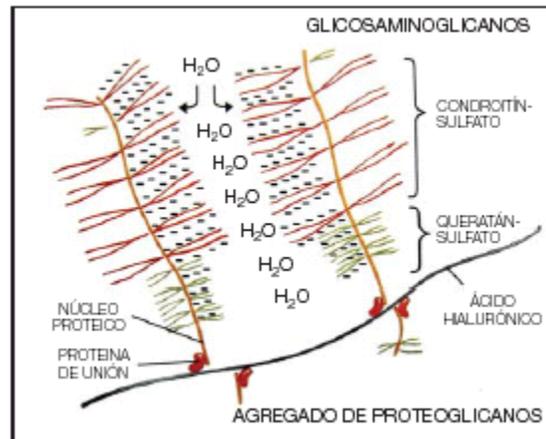


Figura N° 2: Estructura de los Proteoglicanos (Sopena, *et al.* 2003).

Los GAGs cuantitativamente más importantes en el cartílago articular son el condroitín sulfato, queratán sulfato, y ac. hialurónico o hialunorato. El ácido hialurónico no es tan abundante en el cartílago articular, pero juega un papel muy importante como eje en la agregación de PGs (Sopena *et al.*, 2003).

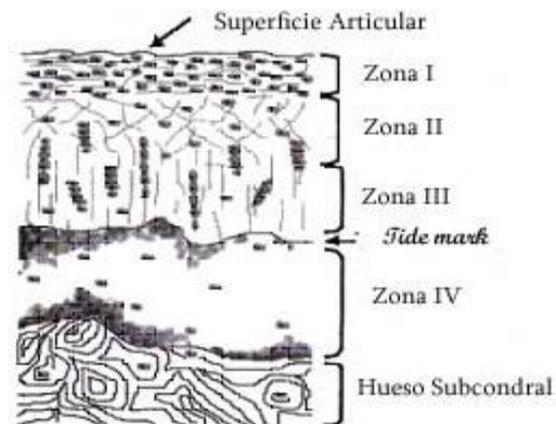


Figura N° 3: Esquema histológico del Cartílago Articular (Sopena *et al.*, 2003).

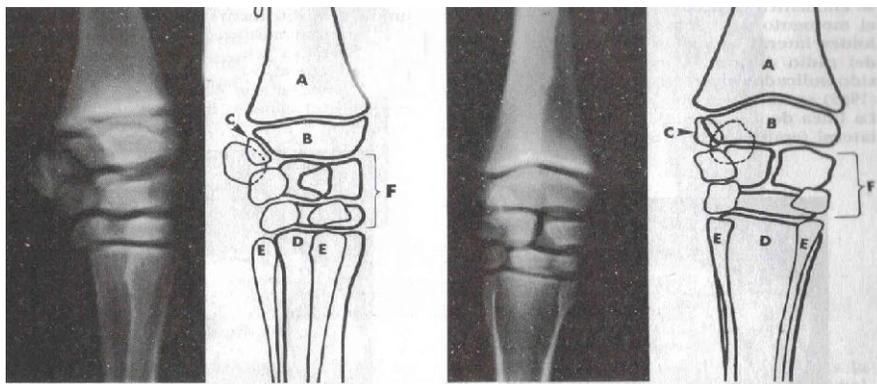
Los **condrocitos** son células especializadas que tienen como principal función la síntesis y mantenimiento del MEC, y ocupan entre el 5 y el 10% del volumen total del cartílago articular (Sopena *et al.*, 2003).

Dentro del cartílago articular, los condrocitos se distribuyen en zonas, donde adquieren distintas formas y se encuentran en distinto número (Figura N° 3). En la Zona I, que es la más superficial, los condrocitos están en mayor número, con escasa actividad metabólica y se presentan en forma ovoidal.

La capa intermedia o Zona II tiene una elevada actividad metabólica, mayor presencia de PGs y menos colágeno, y la capa profunda o Zona III es rica en PGs y fibras de colágeno. La capa del cartílago calcificado o Zona IV se compone de cartílago mineralizado y escasos condrocitos en distinto grado de degeneración. No presenta PGs, y es la capa anclaje del cartílago al hueso (San Roman, 2000; Sopena, 2003).

2.2 Anatomía de la Región Carpal

La región carpal constituye un conjunto de articulaciones compleja, ya que involucra a varios elementos articulares. En este conjunto se involucra a los huesos radio, cúbito, huesos carpales, y los metacarpianos. El carpo es una de las articulaciones más complejas del equino, y una de las que presenta mayor frecuencia de lesión (Figura N° 4). La articulación debe sostener una alta carga, y está formada por una serie de huesos semicuboidales, con estructuras sinoviales y ligamentos intra y extra-articulares (Getty, 2000)



4.1

4.2

Figura N° 4: Radiografía y esquema de la región carpal. 4.1: Radiografía craneocaudal y dorso palmar medio oblicua del carpo derecho de un potro raza Shetland de 2 semanas de edad (izquierda) y su diagrama (derecha). 4.2: Radiografía craneocaudal y dorsopalmar del carpoderecho de un potro Shetland de 2 semanas de edad(izquierda) y su diagrama (derecha) A, Diáfisis del radio; B, epífisis distal del radio; C, apófisis estiloides (epífisis distal del cúbito); D, III hueso metacarpiano; E, Huesos metacarpianos pequeños; F, huesos del carpo (De Sisson y Grossman, 1982).

Las tres articulaciones conformadas por la agrupación de los huesos carpales son: (Sisson y Grossman, 1982)

1) Articulación antebraquiocarpal: formada por el extremo distal del radio (radiocarpal), el extremo distal del cúbito (cubito-carpal) y la fila proximal del carpo.

2) Articulación intercarpal: compuesta por dos filas del carpo e incluye las articulaciones medio-carpales y carpal accesorias.

3) Articulación carpo-metacarpiana: formada por la fila distal del carpo y la terminación proximal de los huesos del metacarpo. Esta articulación a diferencia de las anteriores tiene una estructura plana.

En un número importante de animales se presenta un primer carpal, en ubicación palmomedial, en uno o ambos miembros. Ocasionalmente se puede encontrar el quinto carpal, de ubicación palmolateral (Sisson y Grossman, 1982).

La porción fibrosa de la cápsula articular puede considerarse común a todas las articulaciones. Se inserta muy cerca del borde de la cara articular del radio en su porción proximal, y distalmente en el metacarpo. Su cara profunda está unida a los huesos del carpo y a los pequeños ligamentos (Sisson y Grossman, 1982).

En la articulación carpal la MS tiene tres sacos que se corresponden con las tres articulaciones, pero las cámaras intercarpal y carpometacarpal se encuentran comunicadas (Sisson y Grossman, 1982).

2.3 Recambio de la Matriz Extracelular Normal

El recambio de las estructuras biológicas es una fase que permite, a través de sus continuas modificaciones, adaptarse a los diferentes cambios medioambientales a los que se ve enfrentado (McIlwrith, 1996.)

El recambio de la matriz extracelular del cartílago articular es organizado, sintetizado y regulado por los condrocitos, de acuerdo a cada estado de crecimiento, remodelación o equilibrio. La edad, factores mecánicos y determinados factores de crecimiento pueden inducir la condrogénesis. Se han descrito dos factores frente a los cuales los condrocitos responden aumentando el recambio de la MEC; la carga dinámica y las citoquinas. Por otro lado existe una regulación de los elementos degradativos, los cuales serían los inhibidores de

enzimas, o por ejemplo factores de crecimiento (McIlwrith, 1996, Poole *et al*, 2002; Sopena, 2003).

El recambio del colágeno articular es extremadamente lento y requiere de la actividad de colagenasas secretadas y activadas por los condrocitos, y tiene un tiempo de recambio aproximado entre 300 y 1800 días para el perro y el humano respectivamente (Salamanca, 1995; Vásquez, 2001). Esto a diferencia de los PGs, cuyo recambio es más rápido por su mayor sensibilidad a enzimas proteolíticas. Existe al parecer un punto, no definido, donde los PGs son incapaces de sintetizarse adecuadamente y comienza su degradación (Salamanca, 1995; McIlwrith, 1996; Vásquez, 2001).

Existen muchos elementos biológicos que intervienen en el metabolismo del cartílago articular, y entre ellos se encuentran las **enzimas proteolíticas**, las que hidrolizan enlaces peptídicos. Dentro de ellas se encuentran las **metaloproteinasas** (MMPs), que se definen como una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que poseen la capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular, por lo tanto, se asocian a la destrucción tisular, y cumplen importantes papeles en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos (Wang *et al.*, 2004).

Las MMPs que se encuentran en la matriz reciben también el nombre de matrixinas. Los dominios catalíticos de las matrixinas contienen una estructura adicional que incluye un ion de zinc, el que es requerido para la estabilidad. Además requiere de Ca^{2+} para la actividad enzimática (Nagase y Woesner, 1999).

La mayoría de las MMPs y sus inhibidores fisiológicos son secretados tanto por condrocitos como por células sinoviales (Garnero *et al.*, 2000), y son liberados en forma de zimógeno. También participan en la producción de MMPs otros tipos celulares, como fibroblastos, macrófagos y PMNn, siendo éstos últimos la mayor fuente de MMP-9 en el LS. El ritmo de producción de las enzimas desde los distintos tejidos puede variar según el estado de las células que participan (Trumble *et al.*, 2001; Klimiuk *et al.*, 2002).

Los estudios que relacionan el grado de la enfermedad y la cantidad de MMPs han llegado a diferentes resultados, pero indican en general que la progresión de una patología degradativa articular está a menudo relacionada con la producción y mayor actividad de diferentes formas de MMPs (Marini *et al.*, 2003).

Entre las MMPs existen diferencias según el sustrato de matriz preferente sobre el cual actúan (Frederiks y Mook, 2004). Algunas MMPs son capaces de degradar colágeno en su estructura fibrilar, y otras sólo en su estructura de triple hélice, complementándose en su acción degradativa. Pueden tener como sustrato otras MMPs, produciendo cambios en ellas asociados a la activación desde zimógeno, provocando una cascada de degradación (Toth *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

La caracterización de las MMPs ha sido motivo de estudio constante durante los últimos años. Su función, tanto en procesos biológicos como patológicos, abre nuevas posibilidades de tratamiento y prevención de enfermedades. Hoy se sabe que su función no sólo se centra en cambiar elementos de la matriz, sino que cambian el medio en el cual se desenvuelven las células, y con esto sus funciones son regular en gran medida muchos procesos intracelulares (Nagase y Woessner, 1999).

Hoy se conocen más de 26 tipos de MMPs, que según criterios estructurales, funcionales y de especificidad de sustrato se clasifican como se muestra en la Tabla N°1.

2.4 Regulación de las MMPs de Matriz

Debido a sus fuertes efectos potenciales, las MMPs están en constante regulación. Un aumento significativo en la actividad de MMPs en el LS provocan un desequilibrio entre la síntesis y degradación de la MEC del cartílago, y la consecuente pérdida neta de tejido cartilaginoso (Brama *et al.*, 1998).

La regulación de las MMP de matriz está basada en el control de 3 puntos principales: transcripción/síntesis/secreción, activación e inhibición (Clegg *et al.*, 1997a; Cunnane *et al.*, 2001; Catterall y Cawston., 2003).

La primera fase es el punto donde la mayoría de las MMPs presentan su mayor control, a excepción de la MMP-2, la cual es la única que presenta un control restringido a la etapa de activación (Sternlicht y Werb, 2001). Dentro de los inductores de la transcripción/síntesis y secreción de MMPs se encuentran factores de crecimiento, hormonas, proteína activadora 1, algunas citoquinas, el estrés físico y otras transformaciones celulares, como por ejemplo las de origen oncogénico (Nagase y Woessner, 1999; Catterall y Cawston, 2003; Peake *et al.*, 2005).

La **activación** de las MMPs se ha estudiado tanto con modelos *in vitro* como *in vivo*, siendo esta última la más desconocida (Tchetverikov *et al.*, 2005). Se ha demostrado *in vitro* que la activación de las MMPs se puede desarrollar a través de una vía proteolítica o una no proteolítica. En la vía proteolítica, se produce proteólisis limitada de la porción N-terminal de 8-10 kDa, mediante un proceso autocatalítico específico o por alguna otra proteasa no-específica. La activación de las MMPs también se puede producir por cambios conformacionales inducidos, tanto por agentes oxidantes como por detergentes. Cualquiera de los dos mecanismos produce la disrupción del *switch* de cisteína, vale decir un quiebre en la interacción Cys-Zn²⁺ (Nagase y Woesner, 1999; Trumble *et al.*, 2001; Makowski y Ramsby, 2005; Peake *et al.*, 2005).

La mayoría de las MMPs parecen ser activadas *in vivo* por otras MMPs, o bien por proteinasas bacterianas oportunistas (Trumble *et al.*, 2001). Por ejemplo, las MMP-1, -2 y -3 tienen un efecto proteolítico sobre la pro-MMP-9, desencadenando su activación (Clegg *et al.*, 1997a; Ishiguro *et al.*, 1999).

Por otro lado, la actividad de las MMPs es **inhibida** por elementos endógenos como las α 2-macroglobulinas (α 2M), pero los principales son los inhibidores específicos de tejido o TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) (Nagase y Woesner, 1999; Tchetverikov *et al.*, 2005).

Los TIMPs (21-30kDa) actúan formando un complejo con el dominio catalítico de las MMPs, siendo un complejo reversible no covalente, a diferencia de la inhibición producida por α 2M, que forma junto a las MMPs un complejo irreversible. Este complejo formado es resistente a la denaturación, proteólisis y calor (Sternlicht y Werb, 2001; Lambert *et al.*, 2004; Tchetverikov *et al.*, 2005).

Hasta ahora se conocen 4 tipos de TIMPs, que van del TIMP-1 al -4, siendo abundantes en el LS de articulaciones sanas e inflamadas. La producción de TIMPs está regulada por una serie de factores, pero es de especial importancia el rol que cumplen las citoquinas, en especial la IL-1. Muchos de estos factores son productos liberados por monocitos/macrófagos en estados de inflamación, formando parte de la cascada de degradación tisular (Reynolds, 1996; Klimiuk *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2004).

Tabla N° 1: Metaloproteinasas según grupo, número y sustrato principal. (Yoshihara *et al.*, 2000; Sternlicht y Werb, 2001; Petrow *et al.*, 2002; Frederiks y Mook., 2004)

Numero de MMPEnzima		Sustratos principales
Colagenasas		
MMP-1	colagenasa intersticial	proMMP-9, proMMP-2, colágeno helicoidal
MMP-8	colagenasas de neutrófilo	colágeno helicoidal
MMP-13	colagenasa-3	colágeno helicoidal
MMP-18	colagenasa-4	colágeno helicoidal
Gelatinasas		
MMP-2	gelatinasa A (72 kDa/ 62-66kDa activa)	proMMP-9, gelatina, elastina, proMMP-13
	Colagenasa tipo IV	
MMP-9	gelatinasa B (92 kDa/ 82 kDa activa)	gelatina, elastina
	Colagenasa tipo V	
Estromelisinas:		
MMP-3	Estromelisina-1	proMMP-1, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9, proMMP-13, agregán, componentes de MEC.
MMP-10	Estromelisina-2	agrecán, fibronectina
MMP-11	Estromelisina-3	poca actividad en componentes de la MEC.
Metaloproteinasas de membrana o MT-MMPs:		
MMP-14	MT1-MMP	proMMP-2, proMMP-13, colágeno helicoidal.
MMP-15	MT2-MMP	
MMP-16	MT3-MMP	proMMP-2
MMP-17	MT4-MMP	
MMP-24		
MMP-25		
Otras metaloproteinasas:		
MMP-7	matrilisina	proMMP-9, agregán, componentes MEC.
MMP-12	mataloelastasa de macrófago	elastina
MMP-19	RASI-1	
MMP-20	enamelisina	
MMP-23		

Los TIMPs, particularmente el TIMP-1, se sintetiza en la mayoría de las células, y es el inhibidor de MMPs tisular de mayor importancia. Tanto los TIMPs como las MMPs son sintetizadas por las mismas células dentro de la articulación, pero tienen distintas vías de regulación (Reynolds, 1996; Cunnane *et al.*, 2001; Tchetverikov *et al.*, 2005).

A nivel sanguíneo la $\alpha 2M$ cumple un rol importante en la inhibición de MMPs, pero debido a su gran tamaño molecular se le hace difícil llegar a tejidos como el cartílago articular (Tchetverikov *et al.*, 2005).

Las **MMP-2** y **MMP-9** son colagenasas/gelatinasas de especial importancia en enfermedades de tejido conectivo. Estas enzimas son capaces de degradar una serie de elementos de la matriz extracelular, como colágeno tipo V y I denaturado, y tipo IV en forma nativa o denaturado (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000; Shankavaram *et al.*, 2001).

Las MMP-2 y MMP-9 tienen características moleculares específicas en su dominio catalítico, que le dan la capacidad para poder interactuar con sustratos específicos, como la gelatina (Nagase y Woesner, 1999).

Según su ubicación dentro de la articulación, la MMP-2 está ampliamente expresada en la capa íntima celular de la MS y en la área subíntima proliferativa del estroma y en el estroma. La MMP-9 está expresada de manera más limitada y focal (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000).

Algunas de las células capaces de producir o expresar MMP-2 son los fibroblastos, condrocitos, mastocitos y células vasculares, estando asociada en este caso a un rol de angiogénesis. En la MS, tanto en su capa íntima como subíntima, se ha detectado que en estados inflamatorios su principal fuente de expresión son los sinoviocitos B, o de tipo fibroblastos. La MMP-9 en cambio es secretada principalmente por neutrófilos y macrófagos, pero también por células sinoviales, osteoclastos, trofoblastos, neuronas del hipocampo, keratinocitos, condrocitos y fibroblastos (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000; Kenneth *et al.*, 2000; Yoshihara *et al.*, 2000; Sternlicht y Werb, 2001; Petrow *et al.*, 2002).

La MMP-2 se considera, en su forma inactiva, como elemento constitutivo del LS, sugiriendo un rol de homeostasis para la remoción de colágeno maduro. A su vez, la alta cantidad de MMP-2 presente en el LS de articulaciones sanas podría estar relacionada con el

rol de ésta para la activación de otras MMPs, como la MMP-9 o la -13 (Trumble *et al.*, 2001).

La **MMP-2** se diferencia de otras MMPs por que su transcripción no es inducida en respuesta a citoquinas proinflamatorias, siendo regulada mayormente de manera post-transcripcional (Shankavaram *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2004).

El proceso mediante el cual la MMP-2 es activada en la membrana, y todos los elementos que participan, no está completamente dilucidado. La MMP-2 a diferencia del resto de las MMPs, no requiere de una proteasa para su activación, siendo la única MMP que en su forma zimógena no presenta un sitio de anclaje aparente para proteinasas que activan a otras MMPs (Nagase y Woessner, 1999; Shankavaram *et al.*, 2001; Trumble *et al.*, 2001).

La MMP-2 puede ser activada por las MMPs de membrana MT3-MMP (*Membrane type 3 MMP*) o MT1-MMP (*Membrana type 1 MMP*), proceso dependiente de TIMP-2 o de TIMP-3. El TIMP actúa como un *link* molecular entre la MMP de membrana activa desde la superficie celular y la proMMP-2. Se ha sugerido que se requiere dos moléculas de MMP de membrana para la activación de la MMP-2. El TIMP-2, por lo tanto, tendría un rol regulador más que inhibitor, pudiendo estimular o inhibir la actividad de MMP-2 dependiendo de las señales que reciba (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000; Shankavaram *et al.*, 2001; Toth *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004).

La **MMP-9** se describe en su forma zimógena de 94kD, y de 82kD la forma activa. También existe una forma dimérica de proMMP-9, y en la enzima aislada desde neutrófilos se describe una forma de 110kD, que corresponde a un complejo asociado a la proteína lipocalina, que podría tener un rol en la activación de otras MMPs (Peake *et al.*, 2005).

La inducción de la MMP-9 está dada por una serie de elementos bioquímicos, entre ellos citoquinas inflamatorias como TNF- α y IL-1. El TNF- α es un importante estimulador de la transcripción de la MMP-9 (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005). La presencia de MMP-9 en el LS tanto en forma activa como en zimógeno, aparece directamente relacionada al nivel de inflamación, siendo su potencial de daño asociada a su estado de activación (Trumble *et al.*, 2001; Makoski y Ramsby, 2005).

La proMMP-9 es susceptible de ser activada por enzimas proteolíticas de diferentes familias, incluidas las MMPs: MMP-3, MMP-2, MMP-13, MMP-7 y MMP-26, todas ellas con diferentes eficiencias. Estudios realizados para determinar sus mecanismos de activación

han sido complicados, debido a los resultados erráticos que presenta su activación en cultivos celulares. Se sabe que la MMP-2 es capaz de activar a proMMP-9 en solución, pero en recientes estudios se demostró que el complejo TIMP-2/M1-MMP/MMP-2 también es capaz también de activar a la MMP-9 en la superficie celular, ayudado por el medioambiente pericelular (Toth *et al.*, 2003).

La MMP-9 es altamente susceptible a la autoactivación. Aunque el TIMP-1 es producido en el LS, la cantidad producida tiende a ser regulada y coordinada en la misma sinovia, y, por lo tanto, podría ser inefectiva comparada con una potencial gran fuente de MMP-9 exógena, como en el caso de una infiltración neutrofílica (Makowski *et al.*, 2005).

La actividad de las gelatinasas aparece como reflejo del grado de daño erosivo en pacientes humanos con osteoartritis (Peake *et al.*, 2005). Su presencia se puede relacionar a procesos degenerativos contiguos al lugar donde son liberados, además de procesos de invasión del tejido sinovial hacia el cartílago y hueso contiguo, y con esto el desarrollo de erosiones en la articulación (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000). Es esta capacidad de invasión a otros tejidos lo que las hace un elemento bioquímico clave en el cáncer estando asociadas a malignidad (Bernardo *et al.*, 2002).

A pesar de sus similitudes, ambas gelatinasas tienen roles únicos y definidos durante la lesión y reparación tisular (Kenneth *et al.*, 1999). Se ha descrito que la MMP-9 se encuentra aumentada con mayor intensidad en artropatías crónicas, severas y degenerativas inflamatorias, aunque su aumento sería más intenso según algunos autores, en artropatías inflamatorias, tanto en tejido sinovial como en suero. En procesos osteoartíticos y traumáticos también aumentaría, pero en menor intensidad. La MMP-2, en cambio, se ha encontrado en humanos con lesiones tanto de origen inflamatorio como de tipo mecánico, y a diferencia de la MMP-9 se encontró correlacionada a erosiones en sinovitis. La MMP-2 jugaría un papel más importante en procesos agudos, en escala de tiempo de segundos a horas, como en la agregación plaquetaria, mantenimiento del tono vascular y regulación de respuestas inflamatorias (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000; Jouglin *et al.*, 2000; Lalu *et al.*, 2002).

Por lo tanto, no existiría una relación directa entre el aumento de la MMP-2 y de MMP-9, ya que ambas aumentarían en distintos estados patológicos, a través de diferentes vías de regulación. Las gelatinasas difieren en su regulación trascricional y en su vía de

activación, además no comparten una distribución tisular común. De todos estos elementos se puede concluir que la MMP-2 y la MMP-9 contribuyen de manera diferente a la fisiopatología de la destrucción tisular (Goldbach-Mansky *et al.*, 2000).

2.5 Biopatología del Daño Articular

Conociendo los procesos de recambio tisular en una articulación normal, se puede comprender mejor el desarrollo de sus alteraciones.

Los cambios bioquímicos entre el proceso degradativo de una artritis, capsulitis o sinovitis aguda no difieren mayormente de una fase temprana osteoartritis. Los cambios biopatológicos se suceden de manera similar, pero se hacen crónicos e irreparables en una osteoartritis (Frenkel y Di Cesare, 1999).

La destrucción del cartílago articular es un evento común para diferentes patologías articulares, incluyendo a la Enfermedad Degenerativa Articular (EDA). Se conocen dos vías principales de destrucción del cartílago. La vía intrínseca, en donde los mismos condrocitos degradan la MEC que los rodea. Y la vía extrínseca, en donde tejidos o células ajenas al cartílago, como células inflamadas de la sinovia o células inflamatorias infiltradas, rompen la MEC principalmente a través del LS. En ambas vías la destrucción enzimática de la MEC es el principal mecanismo de destrucción (Yoshihara *et al.*, 2000).

En una fase temprana luego de la lesión, los tejidos articulares intentan repararse, y recuperar su integridad anatómica y funcional. Se activan procesos de compensación, se desarrolla un proceso celular en donde fibroblastos, condroblastos, osteoclastos y condrocitos se activan, aumentando la síntesis de elementos de la MEC. Pero los procesos degradativos superan la capacidad de síntesis y la reparación puede fallar. En la medida que pase el tiempo el daño en el cartílago va penetrando, haciéndose más profundo e irreparable (Salamanca, 1995; Frenkel y Di Cesare, 1999).

A través de los diferentes mecanismos bioquímicos de las alteraciones articulares, existirán cambios en los componentes de la matriz, los que a su vez generarán cambios en la biomecánica y fisiología del cartílago, siendo la pérdida de cartílago articular la que se relaciona directamente con la pérdida de la funcionalidad articular (Buckwalter y Mankin, 1998).

La pérdida de cartílago articular lleva a cambios secundarios en el tejido sinovial, ligamentos, cápsula y músculos que mueven la articulación lesionada. Con el tiempo, todos los elementos de la articulación se contraen, disminuyendo más la movilidad. Con el poco uso o baja movilidad, la articulación desarrolla una atrofia (Buckwalter y Mankin, 1998).

El **cartílago articular**, al carecer de irrigación propia, carece también de un mecanismo que le otorgue los nutrientes y mensajeros adecuados para una correcta cicatrización. A diferencia de otros tejidos, en un daño directo al cartílago articular no se produce inflamación, no hay transudación, ni fibrina, ni coágulo, entre otros elementos. Con esto se deduce que los procesos de inflamación-reparación que son conocidos para otros tejidos aquí son reemplazados por mecanismos más lentos. Su respuesta frente a la lesión o a la degeneración será una reparación sub-óptima. Las propiedades bioquímicas y mecánicas del nuevo tejido difieren del cartílago nativo, resultando en una función alterada o inadecuada. Recién al año se desarrolla un tejido de reparación, formado por una mezcla entre cartílago hialino y un fibrocartílago, con un componente sustancial de colágeno tipo I (Colahan *et al.*, 1998; Frenkel y Di Cesare., 1999; Tew *et al.*, 2000). En el cartílago articular, la **MEC** se desorganiza, aumentando la vulnerabilidad del tejido a un nuevo daño mecánico (Buckwalter y Mankin, 1998).

El **colágeno** del cartílago articular se verá afectado desde un principio, siendo denaturado por las enzimas proteolíticas. En una primera fase el contenido de colágeno se altera, existiendo un aumento de la síntesis de colágeno tipo II, la síntesis y expresión de colágeno III se verá limitada, el colágeno tipo IV aumentará y se expresará el colágeno X, el cual no es sintetizado por condrocitos normales, sino sólo por los condrocitos hipertróficos de la OA (Poole, 1999; Goggs *et al.*, 2003).

Existen cambios en todos los componentes de la matriz, aumentando el contenido de **agrecán** en las zonas medias y profundas, presumiblemente para compensar la mayor presión sufrida por los condrocitos por la pérdida de colágeno superficial. Además existirá un aumento en la síntesis en muchas de las proteínas de la MEC, entre ellas tenascina, osteonectina y fibronectina (Poole, 1999).

A pesar de ser los **condrocitos** capaces de producir MEC durante toda su vida, son ineficientes en su respuesta frente a las lesiones del cartílago articular. La salud de la matriz

depende de los condrocitos, y los condrocitos dependen de la salud de la matriz que los contiene (O'Driscoll, 1998; Vharas *et al.*, 2003)

Frente a una lesión, los condrocitos modifican su metabolismo. Por un lado, se altera su capacidad de síntesis, paralelamente desarrollan dos procesos principales en respuesta a la lesión: apoptosis y proliferación (Salamanca, 1995; Tew *et al.*, 2000; Sandell y Aigner, 2001).

Los condrocitos cambiarán la proporción de sus componentes sintetizados, el ritmo de síntesis y los componentes en sí, lo que repercutirá en la estructura de la MEC. Se produce un aumento en la síntesis en la zona media y profunda, donde el tejido permanece por mayor tiempo intacto, y sus células aún activas. Es en la capa superficial de células donde los cambios se observan más intensamente (Poole, 1999; Sandell y Aigner, 2001; Goggs *et al.*, 2003).

Cuando se produce cierto grado de avance la enfermedad, el intento compensador de los condrocitos es insuficiente, ya que son incapaces de crear la matriz organizada que caracteriza al cartílago articular sano (Frenkel y Di Cesare, 1999; Sandell y Aigner, 2001).

Los condrocitos más cercanos a la lesión son los más afectados en su metabolismo. En un estado osteoartrítico inicial, los condrocitos son capaces de replicar su ADN en respuesta a la lesión, desarrollándose una proliferación celular o “generación de clones de condrocitos”. Pero esta respuesta durará poco, siendo la apoptosis, el efecto que se mantiene en el tiempo, con una subsecuente hipocelularidad (Tew *et al.*, 2000; Goggs *et al.*, 2003).

Si la etiología de la lesión es una fractura directa, que incluya al hueso subcondral, el proceso se acorta, y en dos semanas el reclutamiento, proliferación y diferenciación celular en la zona ya ha dado por resultado un tejido formado por células tipo condrocito. Al cabo de seis a ocho semanas el tejido de reparación contiene células tipo condrocito en una matriz de PGs y de colágeno tipo II, con algo de colágeno tipo I. Pero, a medida que la matriz se degenere, el tejido condroide será reemplazado por un tejido más fibroso y fibrocartilaginoso (Salamanca, 1995; Frenkel y Di Cesare, 1999).

En estudios realizados con pacientes humanos, se ha detectado que la principal causa de destrucción patológica del cartílago articular, especialmente en condiciones crónicas, es la elevada actividad proteolítica, que incluye la actividad de las MMPs. El aumento en la producción de MMPs en la biopatología articular ha sido demostrada por los altos niveles de

mRNA a nivel de tejido, y por el aumento en la cantidad de la enzima detectada en el LS (Marini *et al.*, 2003; Tchetverikov *et al.*, 2005).

Una de las diferencias bioquímicas importantes existentes entre una articulación normal y una alterada, sería la relación existente entre sus MMPs y sus TIMPs. Se ha demostrado que existe un desbalance entre las MMPs y los TIMPs en favor de las MMPs en muchas condiciones patológicas como en la EDA, asociándose directamente a destrucción de tejido articular (McIlwite, 1996; Yoshihara *et al.*, 2000; Tchetverikov *et al.*, 2005).

En una lesión articular son muchos los mediadores que son capaces de estimular la liberación de MMPs. Se ha descrito la liberación desde la MS lesionada de nucleótidos (ATP, ADP), enzimas lisosomales, prostaglandinas E₂, radicales libres, citoquinas hacia el medio extracelular, en particular hacia el LS, todos los cuales a su vez estimularían la liberación de MMPs desde condrocitos, sinoviocitos y fibroblastos, y además, por los macrófagos que pueden encontrarse en infiltrados en un proceso inflamatorio (Clegg *et al.*, 1999a).

El análisis de la cantidad y nivel de actividad de las MMPs en diferentes estados de enfermedad articular es importante para identificar su rol y su función, y así contribuir a la elucidación de la compleja red de interconexiones entre los diferentes procesos patológicos. Más aún, los resultados obtenidos pueden llegar a ser útiles para encontrar marcadores tempranos relacionados a los diferentes grados de la enfermedad, y así desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico y terapia (Marini *et al.*, 2003).

Hoy se sabe que existe una relación entre la cantidad de MMP-9 en LS y la artritis en el equino, tanto en su forma monómera como dímera. Pero aún no existe un estudio en equinos que relacione tanto los grados de daño articular con la actividad proteolítica de gelatinasas, tanto en LS como en suero sanguíneo (Jouglin *et al.*, 2000).

Tanto las **citoquinas** como los factores de crecimiento parecen ser producidos primero por las células de MS, y luego difundir al cartílago por el LS, donde activan a los condrocitos, los que a su vez producen factores catabólicos, proteasas y más citoquinas (Martel-Pelletier *et al.*, 1999).

El **óxido nítrico** (NO) también participa en la degeneración articular, siendo un gas multifuncional que tiene la capacidad de atravesar libremente las membranas biológicas. Las funciones del NO están asociadas a actividades tanto fisiológicas como patológicas (Goggs *et al.*, 2003).

El NO inhibe la síntesis de las macromoléculas de la matriz, y aumenta la actividad de las MMPs. También estimula la actividad de IL-1, por lo cual existe una vía indirecta de estimulación a las células de la articulación (Martel-Pelletier *et al.*, 1999).

Las citoquinas activadas en la inflamación también activan la cascada de **ácido araquidónico**, la cual estimula a la MS a producir varios mediadores inflamatorios, como son las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y citoquinas, siendo la de mayor importancia la Prostaglandina-E₂ (PG-E₂), que participan en procesos característicos de la inflamación, como la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad de los pequeños vasos que desencadenan edema. Además la PG-E₂ sensibiliza los nocioreceptores periféricos, con lo cual se desarrolla el proceso doloroso de la patología, generando cojera (Trumble *et al.*, 2004).

Los huesos son tejidos dinámicos que, como otros tejidos, responde a las fuerzas a las que es enfrentado. Cuando a un hueso se le aplica presión, éste altera sus propiedades geométricas, para así lograr repartir de mejor manera las fuerzas (Gravallese, 2002).

Las sobrecargas mecánicas ocasionan, como un intento de adaptación ósea, su remodelación apresurada asociada a generación de microfracturas subcondrales, desde las cuales se desarrolla un proceso que ayudaría a la degeneración del cartílago (Bravo *et al.*, 1999; Sicard *et al.*, 2005).

Es necesario recordar que a diferencia del cartílago articular, el hueso es un tejido vascular. En los tejidos vascularizados la respuesta reparatoria consta de tres etapas: necrosis, inflamación y reparación. El espacio generado por la fractura tenderá a llenarse de sangre, activando toda una cascada inflamatoria. El coágulo se transforma luego en un tejido fibrovascular de reparación y los diferentes componentes celulares liberan factores de crecimiento y citoquinas, como el TGF- β . Todos estos componentes estarán presentes para estimular la reparación (Frenkel y Di Cesare, 1999).

Las microfracturas cicatrizan con un tejido fibroso, sin las características del tejido original, modificándose las características propias del tejido, como su densidad (esclerosis subcondral, formación de cavidades óseas y la apariencia de cartílago regenerado en y sobre su superficie). Todos estos cambios alteran las propiedades mecánicas del área (Buckwalter y Mankin, 1997; Bravo *et al.*, 1999; Tarrago, 2003).

La remodelación y modelación del hueso se altera según la intensidad de carga que enfrenta. Así una carga baja y constante en el tiempo permitirá una modelación adecuada, pero ésta no se logra en un corto período de tiempo. Idealmente el caballo debe ser enfrentado a una carga que le permita una remodelación que se traduzca en el máximo rendimiento (Gravellese, 2002).

2.6 Patologías articulares más comunes

Las cojeras son una causa importante en la consulta veterinaria equina, tanto por su alta incidencia como por su gravedad. Las afecciones articulares pueden llevar a cambios morfológicos degenerativos, muchas veces irreversibles (Khumsap *et al.*, 2003).

Las cojeras a menudo involucran lesión en más de una articulación, lo que hace más difícil la diferenciación entre los distintos tipos de cojera. Cuando existe sólo un tipo de cojera, la severidad de los signos clínicos varía entre los diferentes individuos. Por lo general la articulación presenta dolor y cojera cuando existe un proceso inflamatorio agudo (Khumsap *et al.*, 2003).

Los cuadros claudicógenos que involucran la articulación del carpo, se presentan especialmente durante los primeros años de competencia, debido fundamentalmente a factores como la alta exigencia de trabajo a la que son sometidos, y la temprana edad a la que empiezan a competir (McIlwrith, 1996).

Las enfermedades articulares de origen traumático incluyen una serie de condiciones patológicas: (McIlwrith, 1996)

- 1) **Fractura** o fragmentación del cartílago articular y/o del hueso
- 2) **Sinovitis** : inflamación de la membrana sinovial.
- 3) **Capsulitis** : inflamación de la cápsula articular (capa fibrosa).
- 4) **Enfermedad Degenerativa Articular (EDA)**: Proceso crónico y degenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de cartílago articular.

Se ha descrito que en el carpo es frecuente la aparición de **fracturas**, especialmente intraarticulares. Su importancia no sólo radica en el cuadro agudo producido por la fractura misma, sino además como factor inductor de EDA, debido a la liberación de mediadores de la inflamación y el roce constante de la esquirola ósea, provocan un deterioro progresivo del cartílago articular (McIlwrith, 1996).

En general más que asociarse a traumas directos, como un golpe contra una pared, las fracturas se asocian a situaciones como la sobre-rotación de la articulación radiocarpal. Son mucho más comunes las fracturas de la cara dorsal de la articulación. Las fracturas de la cara palmar se asocian generalmente a trauma directo (Colahan *et al.*, 1998).

Se ha sugerido que la fatiga, defectos de conformación, desarrollo óseo incompleto y algunas malas técnicas de herraje pueden provocar sobre extensión de la articulación carpal durante el ejercicio, lo que concentra resistencia y las fuerzas de impacto en la cara dorsal de la articulación (Vásquez, 2001).

Entre las fracturas carpales se pueden distinguir dos entidades clínicas definidas: las fracturas en esquirla (fractura en “*chip*”) y la fractura en laja (fractura “*slab*”). Las fracturas en esquirla corresponden al 90% del total de las fracturas de la región carpal, y corresponden a la primera causa de artroscopia quirúrgica en equinos adultos. La fractura en esquirla involucra al tejido cartilaginoso articular y en menor o mayor grado al tejido óseo subcondral (McIlwrtite, 1996).

Durante el curso de una fractura carpal en esquirla, se produce la alteración del funcionamiento normal de la MS, debido al daño constante producido por los fragmentos óseos liberados desde la zona fracturada, así como también por fenómenos inflamatorios que producen en ella (McIlwrtite, 1996).

Las fracturas en laja es una fractura que se extiende desde una superficie articular a la superficie articular opuesta. Este tipo de fractura produce una cojera más evidente que en una fractura en esquirla (McIlWrite, 1996).

La **sinovitis** o inflamación de la MS, es un proceso inflamatorio común para muchas enfermedades articulares. Una sinovitis temprana puede terminar con una rápida y completa remisión, hasta generar un proceso inflamatorio persistente, asociado a daño articular irreversible y con una menor funcionalidad articular. La sinovitis, tanto como la capsulitis, pueden representar un estado temprano en el desarrollo de una EDA. Las causas de una sinovitis son variadas, pero en caballos de carrera la causa más común es el trauma. (El-Gabalawy, 1999; Khumsap *et al.*, 2003; Clements *et al.*, 2005).

Los cambios en el metabolismo de las células sinoviales pueden no afectar de manera importante los elementos que componen el LS, pero sí podría aumentar su volumen de

manera transitoria. La molestia en el animal seguramente se deberá más al aumento de la presión del fluido intraarticular que a la sinovitis misma (Lipowitz y Newton, 1985).

La MS alterada requiere de una oxigenación y nutrición adecuada, la cual no puede ser entregada por la irrigación pre-existente, generándose una hipoxia local, lo que es un fuerte estímulo para la angiogénesis, con el subsecuente aumento de vascularización (Turner *et al.*, 2005).

La sinovia subíntima inflamada se caracteriza por una pronunciada infiltración celular de linfocitos T, B, células plasmáticas, células NK (“*natural killer*”) y mastocitos. Los neutrófilos se acumulan primero en el LS más que en el tejido sinovial, pero también podrían encontrarse cerca de la unión cartílago-sinovia. Los neutrófilos pueden participar en la destrucción del cartílago, al liberar enzimas proteolíticas y productos tóxicos oxidativos (Turner *et al.*, 2005).

Los signos clínicos de la sinovitis son en general similares para los diferentes tipos y orígenes de la patología: cojeras de distinto grado, acumulación de fluido en la articulación o efusión sinovial, aumento de volumen y deformación de la articulación a la vista. A la palpación se sentirá fluctuante y con aumento de temperatura. La sinovitis en un estado crónico tiene una signología más suave que en un proceso agudo (McIlwraith, 1996; Clement *et al.*, 2005).

Histológicamente, la sinovitis se puede evidenciar por una disminución del espesor de la MS, morfología alterada de las células sinoviales, infiltración celular en zona perivascular e intersticial, aumento en la vascularidad, edema de mediana intensidad y vasodilatación. En la medida que la sinovitis pase de aguda a crónica, estos cambios evolucionarán hacia un estado de fibrosis sinovial (Lipowitz y Newton, 1985; Clements *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2005)

Se ha descrito que los cambios histológicos preceden a los signos clínicos por un período aún no determinado, por lo tanto los conceptos de artritis o sinovitis temprana (definidos clínicamente) pueden llevar a malos entendidos. La artritis temprana es un término clínico, y no histológico. Se encuentra definido en pacientes que presentan dolor e inflamación articular por primera vez. En la literatura se pueden encontrar diferentes definiciones de artritis temprana en términos de duración de los signos clínicos, encontrándose rangos desde 2 a 6 semanas hasta de un año (Turner *et al.*, 2005).

Muchos de los hallazgos radiológicos, como inflamación de tejidos blandos, pérdida ósea periarticular, neoformación y erosión ósea pueden no ser hallazgos específicos. Establecer precisiones acerca de la sinovitis durante el primer año del proceso puede ser notoriamente difícil (El-Gabalawy, 1999; Clements *et al.*, 2005).

Asumiendo que no existiera otro trauma adicional, el problema debiera ser transitorio, y debería responder bien a fármacos y a reposo forzado. El curso clínico de la patología no debería exceder los 7 – 10 días, y no se debería requerir de intervención quirúrgica (Lipowitz y Newton, 1985).

La **enfermedad degenerativa articular (EDA)** es común tanto en hombres como en animales (Lipowitz y Newton, 1985), y se caracteriza por ser una alteración crónica de las articulaciones diartrodiales con degeneración del cartílago articular, formación de osteofitos marginales y cambios articulares proliferativos y degenerativos (Bravo *et al.* 1999; Malemud, 1999).

Su importancia en equinos de carrera se acentúa con la exigencia deportiva, ya que la pérdida de la movilidad articular y el dolor son una causa muy común de bajo rendimiento (Kim *et al.*, 2003).

Probablemente el EDA representa el estado final de un gran número de procesos patológicos multifactoriales, que incluyen a factores predisponentes (defectos de conformación, malos aplomos, mal herraje, envejecimiento) y a factores desencadenantes (traumas, fracturas, luxaciones). Estos procesos llevan a la pérdida de la homeostasis de los tejidos articulares, particularmente del cartílago articular, lo que finalmente provoca una falla de la función articular (Tarrago, 2003; Vharas *et al.*, 2004).

Existen muchas clasificaciones de la enfermedad, siendo una de ellas entre EDA primaria y secundaria. Se denomina EDA primaria cuando no existen antecedentes previos de alguna enfermedad articular, relacionándose casi siempre con una degeneración de la articulación relacionada con la edad. La EDA secundaria, como su nombre lo dice, es aquella en la cual existe una lesión u origen determinado, como una infección o trauma. Por lo complejo de la determinación de su origen específico, la EDA se manifiesta más como la fase final de una variedad de problemas articulares que como una entidad patológica independiente (Lipowitz y Newton, 1985; Trumble *et al.*, 2001; Tarrago, 2003).

Las bases moleculares del proceso de la EDA no está aún totalmente descubierto, pero los estudios de los procesos que acontecen luego de una lesión pueden darnos claves acerca del proceso exacto que lleva a una EDA (Tchetverikov *et al.*, 2005).

Según Tarrago, 2003, el desarrollo de una EDA se puede dividir en las siguientes etapas:

Estadio I Se produce la destrucción proteolítica de la matriz del cartílago, lo que conduce a la destrucción cartilaginosa.

Estadio II Fibrilación y erosión de la superficie del cartílago. Se liberan productos de degradación en el LS, produciéndose como consecuencia la inflamación de la MS.

Estadio III Las células sinoviales ingieren los productos de degradación, produciendo proteasas y citoquinas inflamatorias. Esto conduce a la remodelación del hueso subcondral.

En el caso de la articulación carpal del equino, la EDA se debe a una sobrecarga focal de la articulación. Esta ocurre en el caballo fatigado que corre en velocidad en posición anormal, pudiendo deberse ésta a una debilidad en la musculatura y en los tendones flexores de soporte (Colahan *et al.*, 1998).

El **diagnóstico** temprano de la EDA es complicado, y generalmente se detecta cuando el proceso está avanzado, ya que las modificaciones bioquímicas y micro-estructurales que se producen durante la degeneración del cartílago, se activan mucho antes de que se noten sus indicios clínicos, radiográficos o histológicos (Bravo *et al.*, 1999; Tchetverikov *et al.*, 2005).

Para el diagnóstico de la OA se utiliza la anamnesis, exploración clínica y radiografía (Tarrago, 2003)

En la exploración clínica puede observarse inflamación articular y cojera. Radiológicamente se pueden observar ciertos rasgos que caracterizan la degeneración articular como el espacio interarticular disminuido, menor congruencia articular, formación de osteofitos y un aumento de la turbidez articular (Tarrago, 2003)

Los osteofitos corresponden a un elemento clave al momento del diagnóstico, siendo en la radiografía un signo patognomónico de EDA. Se desarrollan a partir de una prominencia generada a nivel osteocondral, que finalmente se formaliza en un nódulo. En todas las articulaciones en donde aparecen, los osteofitos causan dolor y limitan la movilidad articular (Sandell y Aigner, 2001; Tarrago, 2003; Clemet *et al.*, 2005).

También pueden ayudar en el diagnóstico las pruebas citológicas, que revelan fibrosis periarticular, aumento de la pared de la cápsula y un incremento en la cantidad de LS. La artroscopía puede ser de gran ayuda para una mejor visualización de la articulación (Tarrago, 2003).

Las enfermedades articulares tienen complejas y diversas etiologías, y muchos de sus procesos son hasta hoy desconocidos. Es por este motivo la importancia de profundizar en los elementos que participan en su desarrollo, como es el caso de las metaloproteinasas.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en el líquido sinovial y suero sanguíneo de articulación de carpo de equino FSC, con procesos articulares patológicos agudos y crónicos reagudizados.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Detectar y cuantificar la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en suero sanguíneo y líquido sinovial de articulación del carpo de ejemplares con procesos articulares agudos y crónicos reagudizados.
- Comparar la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 de suero sanguíneo y líquido sinovial entre ambos grupos.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Material Biológico

En este trabajo se utilizó líquido sinovial de la articulación del carpo y suero sanguíneo de equinos FSC del Hipódromo Chile. Los ejemplares se agruparon en aquellos que presentaron inflamación aguda asociada a trauma de la carrera, y en ejemplares con patología articular crónica reagudizada.

En el grupo de equinos con inflamación aguda (grupo A), se incluyeron a 10 ejemplares, los que habían sido ingresados a la clínica con claudicación de la articulación carpal de orígenes diversos, pero que no tuvieran en su ficha o historial clínico información de alguna patología previa en la articulación muestreada.

El grupo de los ejemplares con patología articular crónica reagudizada (grupo C), incluye un n=15, en donde se consideraron a todos aquellos ejemplares que ingresaban a la clínica con claudicación en la articulación carpal, y que en su ficha clínica existía un diagnóstico previo de EDA en dicha articulación.

En la selección de los ejemplares de estudio, se incluyeron animales que, sin considerar la lesión en la articulación del carpo, no presentaban otra patología, ni se encontraban bajo ningún tratamiento. En caso de haber sido tratados médicamente por su patología articular, éste debió haberse realizado con un mes de anterioridad a la fecha de toma de muestra.

En la práctica, la selección de cada grupo se basó fundamentalmente en la información dada por las fichas clínicas del Hipódromo, la cual es actualizada por los Médicos Veterinarios tratantes, y también se consideró la información proporcionada por los preparadores.

En todos los ejemplares seleccionados se revisó la existencia de radiografías de la articulación carpal, para así confirmar el diagnóstico de EDA, o descartar que algún ejemplar considerado del grupo A tenga signos radiológicos compatibles con EDA.

4.2. Procesamiento del Líquido Sinovial y Suero Sanguíneo

Las muestras de LS fueron obtenidas por artrocentesis, en forma aséptica, usando puntos apropiados de referencia para minimizar la posibilidad de trauma iatrogénico en la articulación, y así no contaminar con sangre el LS y obtener una muestra del máximo volumen posible (Colahan *et al.*, 1998). Se analizaron las propiedades físicas del LS recién obtenido como color, transparencia, viscosidad, volumen adquirido y sanguinolencia. Las muestras de sangre fueron obtenidas por venipuntura yugular.

Con el fin de eliminar células y restos de tejido, tanto el LS como el suero sanguíneo (S), fueron centrifugados a 1000xg por 15 y 10 minutos respectivamente. Luego los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C hasta su análisis posterior.

4.3. Determinación de Proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas presente en el suero sanguíneo y LS por medio del método colorimétrico de Lowry usando como estándar albúmina sérica bovina (Lowry *et al.*, 1951), y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

4.4. Zimografía

Para la determinación de la actividad gelatinolítica de las MMPs se trabajó con el método modificado por Valenzuela *et al.*, 1999. Cada muestra fue diluida 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, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en condición desnaturizante y no reductora, en un gel de poliacrilamida (8% gel separador y 5% gel concentrador) polimerizado en presencia de gelatina al 0,1%, que actúa como sustrato. El gel fue sometido a 70 voltios la primera hora y a 100 voltios la siguiente. Posteriormente los geles fueron lavados con una solución Tritón X-100 al 1% por 30 minutos en agitación constante, para así eliminar el SDS y poder renaturar la enzima. Luego fueron incubados a 37°C por 18 horas en una solución que contenía Tris HCl 100mM pH 8 y CaCl_2 5mM. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie 0,1% y lavados con una solución de destinción. La actividad gelatinolítica se evidenció como bandas claras (sin teñir). Luego los geles fueron secados en papel celofán y escaneados para posteriormente, mediante el programa Un-scan-it 4.1, determinar la cantidad de pixeles (unidades densitométricas) de las bandas

gelatinolíticas obtenidas. Con el objetivo de establecer una comparación entre zimografías realizadas en días distintos, en cada gel se cargó una muestra control (muestra de LS), la cual se mantuvo alicuotada a -20°C (Fig. 5).

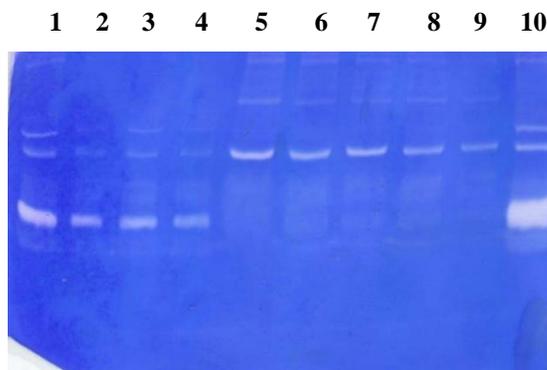


Figura N° 5 : Ejemplo de un zimograma. Se observan 10 carriles verticales, cada uno cargado con muestras independientes. Las bandas blancas representan la actividad gelatinolítica.

Las unidades densitométricas (u.d.) obtenidas de cada muestra fueron divididas por las u.d de una de las banda de la muestra control, expresándose los resultado en u.r. (unidades relativas a la muestra control).

4.4.1- Determinación de la dilución óptima de LS y S para la Zimografía.

Para estandarizar la metodología de la zimografía, se realizaron ensayos con muestras de LS y S para determinar la dilución y el volumen óptimo a utilizar.

En este proceso, se buscó comprobar la existencia de proporcionalidad entre la cantidad de LS y S cargada, y la intensidad de las banda en el gel. La dilución óptima se estableció mediante una serie de ensayos con distintas diluciones (1:2, 1:4, 1:6, 1:10) en suero fisiológico 0,9%, posteriormente se diluyeron en una proporción fija de 1:1 con “buffer” de electroforesis (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.01%). Se utilizó un volumen constante de 4 μL de cada muestra para facilitar su carga en el carril, disminuyendo la posibilidad de derrame.

Se encontró una proporcionalidad entre la concentración de la muestra utilizada y la intensidad creciente de las bandas, como se observa en las figuras N° 6 y 7. Este hecho se grafica en las Figuras 6B y 7B, en donde se observa la relación lineal entre la intensidad de las bandas, medidas en píxeles y la concentración de la muestra.

Se estableció como dilución óptima 1:4 para LS y 1:6 para S, considerando la linealidad observada en los gráficos 6B y 7B.

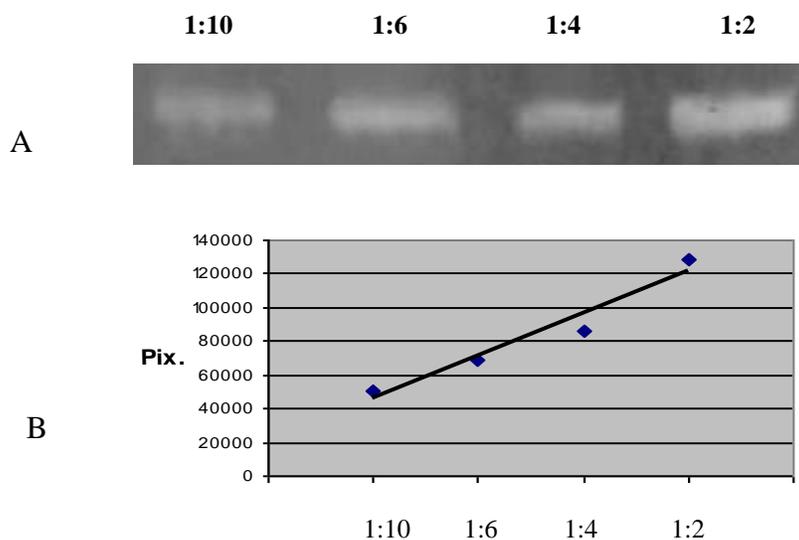


Figura N° 6. A: Zimograma en cuyos carriles 1-4 se utilizaron concentraciones crecientes en base a las diluciones 1:10, 1:6, 1:4, 1:2 de LS. Se observa la dependencia entre la concentración de la muestra y la intensidad de la banda. B: Relación entre las diluciones del LS y los pixeles obtenidos de las bandas del Gel de la figura N° 6A.

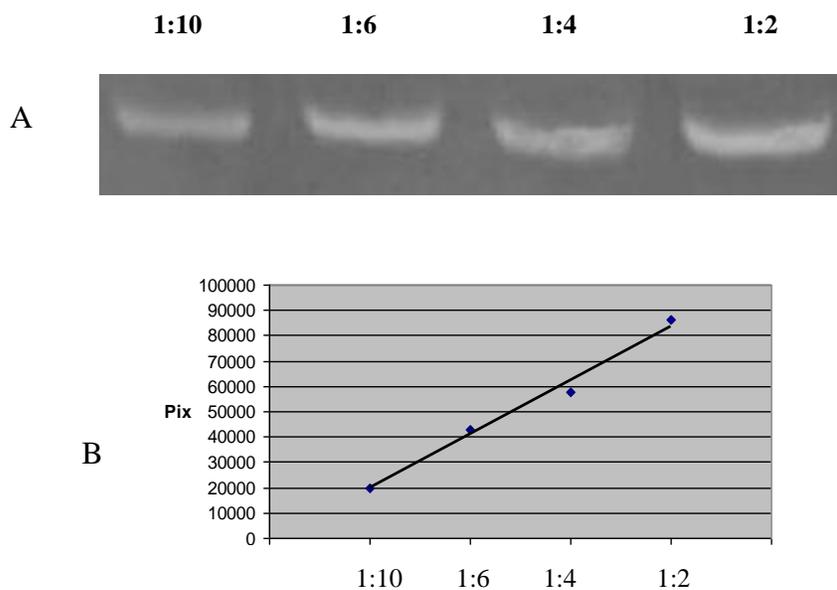


Figura N° 7. A: Recorte de un Zimograma en cuyos carriles 1-4 se utilizaron diluciones decrecientes entre 1:10 y 1:2 de S. Se observa, al igual que en el caso de LS, la relación entre la mayor concentración de la muestra y la mayor intensidad de la banda. B: Relación entre las diluciones del S y los pixeles obtenidos de las bandas del Gel de la figura N° 7A.

4.4.2 Identificación de Bandas Gelatinolíticas de MMP-2 y MMP-9

En el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Cs. Veterinaria y Pecuarias ya se habían identificado las bandas de MMP-2 y MMP-9 de equinos en LS, tanto la forma zimógena como la activa (Bravo, 2001). Por lo tanto, para la determinación de la identidad de las bandas obtenidas en las zimografías del presente estudio, se utilizaron como estándares LS de dichos estudios previos. Sin embargo, no se habían realizado estudios similares en S, por lo tanto se debió realizar un proceso de caracterización, utilizando como criterios su especificidad de sustrato (detección de banda gelatinolítica), la movilidad en la electroforesis (masa molecular MM), su dependencia de Ca^{2+} (con el quelante de calcio EDTA) y el cambio en la MM por un pre-tratamiento con un activador específico de MMPs (APMA).

Se determinó la masa molecular de las bandas con actividad gelatinolítica por medio del cálculo de la movilidad relativa en los geles de poliacrilamida comparados con la migración de estándares moleculares. Estos estándares fueron obtenidos de muestras de una tesis anterior realizada en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Las MMPs son dependientes de calcio para su actividad y por ello se realizaron ensayos con EDTA, un quelante de Ca^{2+} . Se realizaron dos zimografías en paralelo, cargando las mismas muestras, pero uno de los geles fue incubado con EDTA (50mM) y sin Ca^{2+} .

En el ensayo con APMA, se sometieron algunas muestras a una pre-incubación con el agente mercurial APMA 1 mM (4- aminofenilmercúrico acetato), durante tres horas a 37°C. Paralelamente, se pre-incubó un duplicado control sin APMA. Luego se realizó la zimografía, cargando carriles con muestras pre-incubadas con APMA y otros carriles con muestras sin APMA.

4.5. Análisis de datos

En cada uno de los geles se cargó en uno de los carriles un volumen constante de muestra control. Los pixeles obtenidos de cada muestra se dividieron por los pixeles de la banda de la muestra control del gel correspondiente. Los resultados de cada muestra son expresados unidades densitométricas relativas a la muestra control (u.r.) \pm desviación estándar.

Además, al haber obtenido los datos de la cantidad de proteínas presentes en las muestras, se dividió las u.r. por los mg de PT encontrados en la muestra para comprender la importancia relativa de las MMPs dentro de las PT del fluido, resultados que se expresaron en u.r/mg de PT.

Los valores de los distintos grupos se compararon mediante análisis de varianza (ANDEVA), para analizar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. Para determinar la presencia o ausencia de la banda gelatinolítica generada por la MMP-9 en su forma dímera, se realizó la prueba de X^2 .

5. RESULTADOS

En este trabajo, para los grupos patológicos se consideró un total de 25 animales, 10 de los cuales cursaban con una lesión aguda en su articulación carpiana, incluidos en el grupo A, y 15 con una lesión carpal crónica reagudizada (grupo C). Adicionalmente, se analizaron 10 sueros sanguíneos de ejemplares clínicamente sanos, los cuales se encontraban en actividad y de edad similar a las de los ejemplares de los grupos patológicos.

El promedio de edad de los equinos seleccionados para el presente estudio en el caso del grupo A, fue de $4,1 \pm 1,1$ años, y en el caso de los ejemplares del grupo C fue de $4,2 \pm 1$ años. Para el grupo de animales sanos, se consideró un $n = 10$, con edades desde los 2 y hasta las 4 años, con un promedio de edad de $2,4 \pm 0,8$ años.

5.1.- Concentración de Proteínas en Líquido Sinovial y Suero Sanguíneo

Se determinó la concentración de proteínas en el LS y S de ambos grupos patológicos, obteniéndose un promedio general de $24,9 \pm 7,2$ mg/ml en el LS y $58,3 \pm 9,4$ mg/ml en el suero sanguíneo de todas las muestras patológicas utilizadas. En el grupo A el promedio en el LS fue de 24 ± 6 mg/ml, y en el suero de 55 ± 11 mg/ml, mientras que en grupo de los crónicos el promedio fue de 25 ± 8 mg/ml en el LS y de 61 ± 7 mg/ml en el S.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de concentración de proteínas entre los grupos A y C, tanto en LS como en el S.

Se encontró una diferencia significativa entre los valores de proteínas al comparar los 2 fluidos, entre el LS y S, siendo significativamente mayor la concentración de proteínas encontradas en el S, tanto en el grupo A ($p < 0,05$) como en el grupo de los C ($p < 0,0001$).

5.2.- Identificación de Bandas Gelatinolíticas de MMP-2 y MMP-9

Para la identificación de las bandas gelatinolíticas obtenidas se utilizaron distintos criterios. El primero de los criterios fue la especificidad del sustrato, que se evidencia con las bandas gelatinolíticas en el zimograma.

El segundo criterio fue la MM de las bandas obtenidas. Dos de las bandas de las muestras de S coincidieron con las bandas de la muestra estándar, previamente identificadas como proMMP-2 y proMMP-9, y además en algunos geles se presentó la MMP-9 en su forma dimérica.

Otro criterio fue la dependencia de Ca^{+2} de las MMPs. En la figura N° 8 se observa que al incubar el gel con las muestras de S en ausencia de Ca^{+2} , debido a la adición de EDTA 50 mM al medio de incubación, no se detecta actividad gelatinolítica (columna 1). En la columna 2 se observa actividad gelatinolítica de la misma muestra anterior, pero incubada paralelamente en un medio de ensayo con Ca^{+2} .

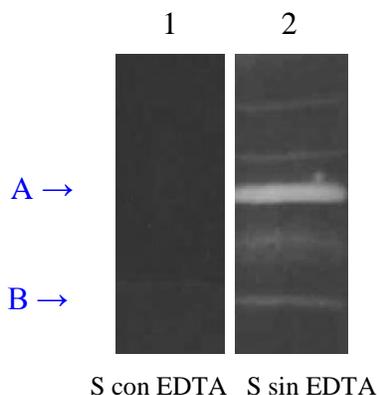


Figura N° 8: En la columna 1 se observa la zimografía con muestras de S, al que en su medio de incubación no se le agregó Ca^{+2} , pero sí EDTA 50 mM para quelar posibles residuos del ión. En la Columna 2 se encuentra la muestra control de S. La línea demarcada por A corresponde a la ubicación de la banda gelatinolítica de proMMP-9, y B a la banda de la proMMP-2.

El último de los criterios utilizados, fue el cambio de MM de las enzimas al pre-incubar las muestras con APMA. En nuestro estudio, realizamos una zimografía cargando carriles con muestras pre-incubadas con APMA y otros carriles con muestras control. En la figura N° 9, se observan las proMMPs, y sus formas activas, de menor MM, generadas por la preincubación con APMA.

5.3.- Cuantificación de la Actividad Gelatinolítica

La banda que corresponde a proMMP-2 fue un hallazgo en todas las muestras de LS estudiadas.

En los resultados obtenidos no se encontraron diferencias significativas entre los valores de u.r. de la MMP-2 de los LS entre los grupo A y C, dando un promedio de $5,8 \pm 2,5$ y $4 \pm 3,5$ u.r. respectivamente (tabla N° 2). Al corregir por las proteínas totales (PT) se detecta la misma tendencia, siendo en el grupo A y C los promedios 256 ± 150 y 165 ± 138 u.r./mg proteínas respectivamente (tabla N° 3).

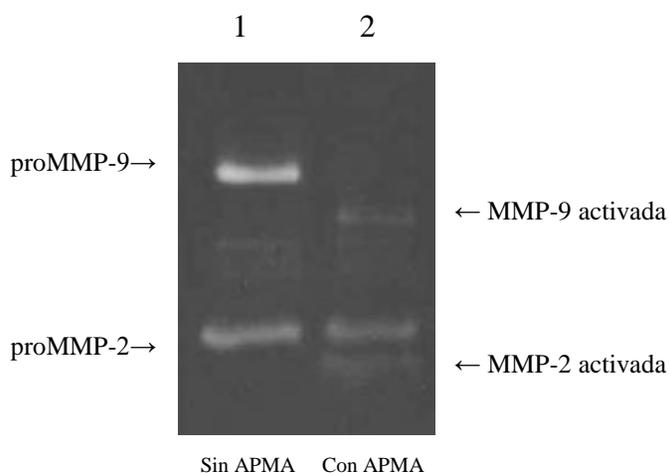


Figura N°9: En la columna 1 se observan las bandas correspondientes a una muestra control. En la columna 2 se observa la misma muestra, pero previamente tratada con el activador de MMPs, APMA. Se puede observar el desplaamiento de las bandas, lo que confirma su identidad de MMPS.

Tabla N° 2: Actividad Gelatinásica de los grupos A y C, expresadas en u.r. a la muestra estándar. Se muestran los promedios de los grupos y su desviación estándar.

	Líquido Sinovial		Suero Sanguíneo	
	MMP-2 (u.r)	MMP-9 (u.r.)	MMP-2 (u.r)	MMP-9 (u.r.)
Agudos (A)	5,8 ± 2,5*	1,7 ± 1,5*□	6,9 ± 4,0	8,8 ± 4,8□
Crónicos (C)	4 ± 3,4●	0,9 ± 0,8●□	7,4 ± 4,5	11 ± 5□
Normales	-	-	1,41 ± 0,3	3,41 ± 1

(* , □ , ● : p≤0,05)

La banda correspondiente a proMMP-2 en S, al igual que en LS, se encontró en todas las muestras, con un promedio de 6,9 ± 4 u.r. en el grupo A y de 7,4 ± 5 u.r en el grupo C (tabla N° 2). Al dividir por la concentración de proteínas los resultados fueron 126,7 ± 66 y 124,1 ± 76,4 u.r./mg proteínas respectivamente (tabla N° 3).

No se encontró diferencia significativa para la actividad sérica de MMP-2 entre los grupos A y C, incluso al dividir por la concentración de proteínas.

En los grupos A y C no se evidenció diferencia para la actividad MMP-2 entre S y LS. Al considerar la concentración de proteínas como denominador, se encontró que en el grupo A la actividad de la MMP-2 es significativamente mayor en el LS que en el S (p = 0,016), lo que no se evidenció en el grupo C.

Por otro lado la banda que corresponde a la actividad de la MMP-9 no fue detectada en todas las muestras de LS, encontrándose en un 80,8 % de las muestras (tabla N° 4).

Dentro de las muestras en las que se detectó la MMP-9, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de u.r. de la MMP-9 del LS entre los grupo **A** y **C**, detectándose un valor de $1,7 \pm 1,5$ y $0,9 \pm 0,8$ u.r. respectivamente (tabla N° 2). Al dividir por la concentración de proteínas se detecta la misma tendencia, obteniéndose valores de $76,5 \pm 76,9$ y de $39,7 \pm 40,3$ u.r./mg proteínas respectivamente para los grupos **A** y **C** (tabla N° 3).

Tabla N° 3: Actividad Gelatinásica de los grupos A y C, expresadas en u.r./mg de P. Se muestra los promedios y su desviación estándar

	Líquido Sinovial		Suero Sanguíneo	
	MMP-2 (ur/mg PT)	MMP-9 (ur/mg PT)	MMP-2 (ur/mg PT)	MMP-9 (ur/mg PT)
Agudos (A)	256 ± 150 ^{α*}	77 ± 77 ^{*◇}	127 ± 66 ^α	160 ± 84 [◇]
Crónicos (C)	166 ± 138 [●]	40 ± 40 ^{●/}	124 ± 76	180 ± 91 [/]
Normales	-	-	17,63 ± 3,5	42,7 ± 13,4

(* , ^α , [●] , [◇] , [/] , ^α : p≤0,05)

Tanto en el grupo **A** como en el **C**, la actividad de la MMP-2 en el LS fue significativamente mayor que la de MMP-9 (**A**: p = 0,0002; **C**: p = 0,0017) (tabla N° 2). La tendencia se mantuvo al dividir por la concentración de proteínas (**A**: p = 0,002; **C**: p = 0,002) (tabla N° 3).

La forma dímera de la MMP-9 en LS se detectó en 2 muestras (7 % del total de las muestras estudiadas), ambas corresponden a ejemplares del grupo **C**.

En el S las bandas de actividad de la MMP-9 se observaron en todas las muestras analizadas. La cuantificación de la actividad de la MMP-9 en suero sanguíneo de los grupos **A** y **C**, resultó en $8,8 \pm 4,8$ u.r y 11 ± 5 u.r. respectivamente, no teniendo entre ellas diferencias significativas. Tampoco mostraron diferencias significativas las u.r. al dividir por las proteínas, siendo de $160,3 \pm 84$ ur/mg proteínas y de $180 \pm 90,5$ ur/mg proteínas en los grupos **A** y **C**, respectivamente.

La forma dímera de la MMP-9 se detectó en 16 muestras de suero, lo que corresponde a un 61,5 % del total de las muestras de S estudiadas. En el grupo **A** se detectó el dímero en 7 muestras (63,6 % del total del grupo), y en el grupo **C** se detectó en 9 muestras (60 % del

total del grupo). No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de detección del dímero entre los grupos **A** y **C**.

Tabla N° 4: Muestras de LS en las que se detectó la banda gelatinolítica correspondiente a proMMP-9, sus respectivos porcentajes de detección, en los grupos agudo y crónico reagudizado.

Líquido Sinovial	Número de muestras donde se detectó MMP-9	Porcentaje (%)
Agudo (A)	10	90
Crónico (C)	11	73,3
Total	21	80,8

En **S** se detectó un dímero de MMP-9 de menor MM en 7 casos (26,6% del total de muestras de **S**), siendo 3 muestras del grupo **A** (27,4% del total del grupo) y 4 del grupo **C** (26% del total del grupo). No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de detección de la forma dímera de menor MM entre el grupo **A** y **C**.

Tabla N° 5: Muestras de suero sanguíneo, en donde se detectó la forma dímera de la MMP-9, por grupos de estudio y sus respectivos porcentajes.

Suero Sanguíneo	Número de muestras donde se detectó Dímero MMP-9	Porcentaje (%)
Agudo (A)	7	63,60
Crónico (C)	9	60
Total	16	61,50

Tanto en el grupo **A** como en el grupo **C** la actividad de la MMP-9 fue significativamente menor en el LS que la detectada en el S (**A**; $p = 0,0095$, **C**; $p = 0,003$). Al dividir por la concentración de proteínas, esta tendencia se mantiene (**A**: $p = 0,02$; **C**: $p < 0,0001$).

En el **S** del grupo de los ejemplares normales se detectó la actividad gelatinolítica de la proMMP-2, siendo de $1,41 \pm 0,3$ u.r., y la de la proMMP-9 fue de $3,4 \pm 1$, siendo significativamente mayor que la de la MMP-2. En el grupo normal, ambas enzimas

presentaron valores de actividad significativamente menores al compararlos con la de los grupos **A** y **C**.

5.4. Detección de otras Bandas Gelatinolíticas

En el LS se detectaron 2 bandas desconocidas. En 10 casos (38,5%) se detectó una banda gelatinolítica ubicada entre los 92kDa y 64kDa (banda 1) aproximadamente, entre las bandas que corresponden a la proMMP-2 y proMMP-9. Esta banda se detectó en 3 muestras del grupo **A** (27,3%), y en 7 muestras del grupo **C** (46,7%) (figura N°10).

La otra banda gelatinolítica se ubicó por encima de la correspondiente a proMMP-9, entre los 92kDa y los 180kDa (banda 2), y también se detectó en 10 casos (38,5%), pero 7 de ellos son del grupo **A** (63,6%) y 3 de ellos del grupo **C** (20%).

En el S de detectaron 2 bandas gelatinolíticas desconocidas, las que coinciden en MM con las detectadas en el LS. La banda 1 fue detectada en 17 muestras (65,4%), 8 en el grupo **A** (72,7%), y 9 en el grupo **C** (60%). En cambio la banda 2, detectada sobre la banda que corresponde a la MMP-9, se detectó en 14 casos (53,8%), 5 (45,5%) de ellos en el grupo **A** y 9 en el grupo **C** (60%).

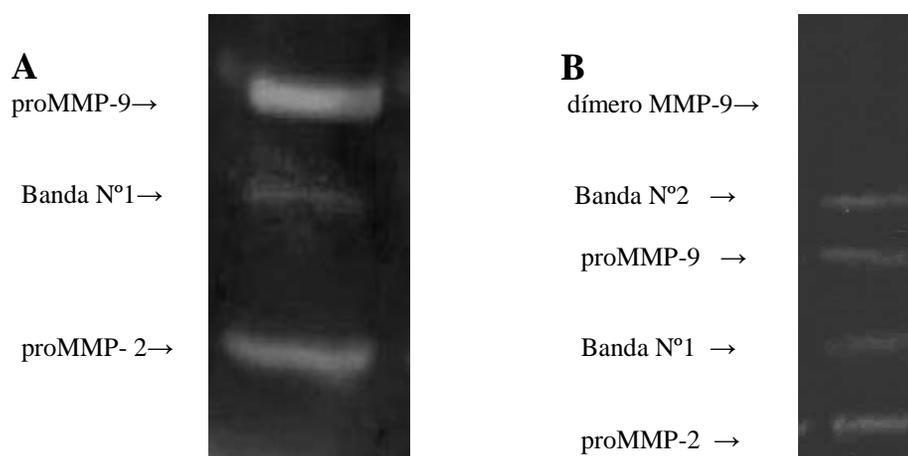


Figura N° 10 : 10A; Recorte de un Zimograma en donde se observa la ubicación de la banda N°1. 10B; Recorte de un Zimograma en donde se observa la ubicación de la banda N°1 y la banda N°2.

Tabla N° 6: Se muestran las bandas no identificadas, tanto en LS como en S. Su identificación podrá ser parte de futuros estudios.

Líquido Sinovial	Banda 1	Banda 1 (%)	Banda 2	Banda 2 (%)
A	3	27,3	7	63,6
C	7	46,7	3	20
Total Ls	10	38,5	10	38,5
Suero Sanguíneo				
A	8	72,7 %	5	45,5 %
C	9	60 %	9	60 %
Total S	17	65,4 %	14	53,8 %
Normales	5	50%	0	0%

6. DISCUSIÓN

En la primera etapa de este trabajo se buscó la detección de bandas gelatinolíticas correspondientes a la actividad de MMP-2 y MMP-9. Se utilizó como patrón muestras de LS en las que previamente se habían detectado bandas gelatinolíticas para MMP-2 y MMP-9 (Bravo, 2001). La comigración de muestras con el patrón fue un paso clave para la caracterización de nuestros zimogramas.

La caracterización en LS había sido realizada previamente, pero faltaba realizar los ensayos en el suero sanguíneo. En nuestro estudio se realizaron ensayos con EDTA, tanto en LS como en S, donde no se observó actividad enzimática (figura N° 6). Esto nos confirmó que las enzimas detectadas son dependiente de Ca^{2+} , característica compatible con las MMPs.

El APMA es un agente mercurial, que al preincubarse con proMMPs, provoca su auto-activación, lo que se observa en el zimograma como una disminución de su MM. Preincubamos nuestras muestras con APMA, y el zimograma mostró claramente el cambio de posición de las bandas (figura N° 7). Este ensayo nos permitió determinar que las bandas observadas en LS y S correspondían a pro-MMPs.

A través de los ensayos descritos, podemos confirmar la identidad de las bandas identificadas como MMP-2 y MMP-9, y cuantificar la intensidad de sus bandas gelatinolíticas.

Previo a la densitometría de las bandas obtenidas, fue necesario determinar la dilución óptima a utilizar. Para ello, se realizaron ensayos seriados, probando con distintas diluciones de varias muestras de LS y S a volumen constante. La decisión de utilizar un volumen constante, se debe a la facilidad de cargar no más de 4 μ L en los carriles, disminuyendo el riesgo de verter muestra hacia los carriles adjuntos. La dilución óptima se determinó como aquella en la que la cantidad de muestra cargada tuviera dentro de una relación lineal con la intensidad de la banda. En este ensayo de linealidad se utilizó LS y S de distintos ejemplares con variadas patologías. Finalmente se eligió una dilución intermedia dentro del amplio rango observado, de 1:4 para LS y 1:6 para S (figuras N° 8 y N° 9).

Los equinos de los cuales se obtuvieron las muestras patológicas tienen edades similares, pero las muestras de suero sanguíneo de ejemplares sanos, promediaron

significativamente menos. El nivel de exigencia de los equinos en los deportes hípicos genera diferentes grados de daño articular desde temprana edad, por lo que la obtención de muestras de ejemplares de más de 4 años sin ningún antecedente de patología articular es particularmente difícil.

Por otro lado, se hizo imposible la obtención de LS desde ejemplares con articulaciones no lesionadas, y que tuvieran la misma edad, raza y actividad que nuestros ejemplares de estudio. Esto por el riesgo en la artrocentesis, ya que una mala manipulación puede dañar irreversiblemente la articulación sana, y provocar la pérdida del ejemplar. En seres humanos recién el año 1993 se obtuvo muestras de LS normal para este tipo de estudios (Naughton, 1993). Pero, a modo de referencia, se obtuvo suero sanguíneo de ejemplares con características similares a los del presente estudio (edad, actividad), pero que no presentaban, ni habían presentado hace por lo menos 1 año, ningún problema articular.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de las proMMP-2 y proMMP-9 en LS y S entre los ejemplares de los grupos A y C (Tabla N° 4 y 5), lo que indicaría la ausencia de cambios en la actividad gelatinolítica al comparar los fluidos de un ejemplar con una lesión primera y reciente, con la actividad existente en un ejemplar con un historial de patologías articulares en el carpo. Sin embargo, la actividad enzimática detectada en los grupos A y C es significativamente mayor que la encontrada en S de ejemplares normales (Tabla N° 5). La actividad de la proMMP-2 en S de los grupos A y C fue en promedio 5 veces mayor que la del grupo normal. Además, en el grupo normal se observa un cambio en la relación entre la MMP-2 y la MMP-9, encontrándose la MMP-2 con una actividad significativamente menor que la MMP-9. Estos resultados sugieren que estas MMPs están asociadas a cuadros de patologías articulares, especialmente la MMP-2. Hubiera sido interesante contrastar estos datos con los de LS normal, además de un seguimiento de la actividad metaloproteínásica en S en los ejemplares estudiados, con la finalidad de establecer sus cambios durante el progreso de la patología. El reestablecimiento de los valores normales de las MMPs en S estudiadas en los ejemplares patológicos, sugeriría su utilidad como marcador de daño articular.

En otras patologías previamente estudiadas, como la AIJ en humanos (Artritis Idiopática Juvenil), no se encontraron diferencias entre los niveles de actividad de las gelatinasas en LS según la duración de la patología, lo que supone la actividad de las MMPs

sobre los componentes articulares desde el inicio de la enfermedad (Gatono *et al.*, 2001; Peake *et al.*, 2005).

Durante los últimos años se han desarrollado muchos estudios en esta área, llegando a diferentes conclusiones. Mazui *et al.*, (2001) encontró en LS de la articulación témporo-mandibular de humanos, que el aumento de la proMMP-2 está relacionada al daño visible en radiografías. La degradación articular está asociada a patologías de mayor duración, con predominio de los procesos degradativos por sobre los procesos de reparación. Esto nos podría llevar a concluir que la actividad de la MMP-2 debería detectarse en mayor cantidad en muestras de pacientes con OA.

El desarrollo de cambios radiológicos y macroscópicos en la articulación es precedido por cambios tempranos en el metabolismo del cartílago articular. Inmediatamente luego de un trauma se han detectado altos niveles de MMPs en el LS de las articulaciones afectadas. Se puede entender, entonces, que los niveles de MMPs, y por lo tanto su acción degradativa empieza antes de que se manifiestan las lesiones (Tchetverikov *et al.*, 2005).

Van Meurs *et al.*, (1999) desarrolló una investigación en conejos, para estudiar el impacto de una segunda lesión luego de haberse desarrollado una OA, y observó que las MMPs del LS aumentan su actividad en un menor período de tiempo. Por lo tanto, un cartílago post-artrítico tiene una mayor capacidad de producir MMPs al compararlo con un cartílago sano, lo cual lo hace más vulnerable.

Al parecer no existe una diferencia entre los niveles de MMPs entre los grupos A y C por diversas razones. Al inicio de la lesión, el aumento en la actividad gelatinásica es rápido, pudiendo detectarse a las pocas horas. En el caso de una OA reagudizada, los niveles de actividad estarían igualmente aumentados. Los tejidos articulares, a pesar de estar lesionados, serán capaces de expresar MMPs, ya que la articulación podría ser capaz de desarrollar y utilizar reservas de enzimas. En el caso de las células secretoras de MMPs que no están presentes en la articulación, estas responderán de la misma manera, ya que no se encontrarán lesionadas. Se sabe que los PMNn tienen MMP-9 almacenada intracelularmente, a diferencia del resto de las células, que la sintetizan cuando es requerido (Clegg *et al.*, 1997a).

En nuestro estudio no se encontraron diferencias entre los valores en suero de la MMP-9 al comparar el grupo A con el grupo C. En otras patologías, como la artritis reumatoídea (AR) en humano, sí se ha encontrado una diferencia significativa al comparar la

cantidad de MMP-9 en el tiempo. Yoshihara *et al.*, (2000) encontró que los niveles de proMMP-9 aumentan en la medida que avanza la Artritis Reumatoidea (AR). Pero los niveles de proMMP-9 en AR son significativamente mayores que en OA, y al ser una enfermedad inflamatoria, los niveles de enzimas tienen vías de producción distintas que en una patología como la OA.

La acción gelatinolítica de las MMPs está en constante equilibrio con los TIMPs, sus inhibidores específicos. Si los niveles gelatinolíticos no cambian en distintas manifestaciones de la OA, ni cambian en las distintas etapas de la enfermedad, cabe preguntarse si los niveles de TIMP varían. Jiles (2005) detectó una diferencia significativa entre los niveles de TIMP-1 entre grupos de equinos con articulaciones normales y alteradas, creando un marco para futuras investigaciones, en las que se estudie en paralelo la actividad de MMPs y sus inhibidores específicos, TIMPs.

La banda correspondiente a la actividad proMMP-9 del LS fue detectada en un 80,8% de las muestras estudiadas, mientras que la actividad proMMP-2 se encontró siempre presente (100%). En otros estudios que han utilizado LS normal, siempre se ha detectado la actividad de la proMMP-2, por lo que muchos autores la consideran una enzima constitutiva del LS. La intensidad de las bandas de proMMP-2 fue significativamente mayor a la banda correspondiente a la proMMP-9 (Clegg *et al.*, 1999a y b; Kontinen *et al.*, 1999; Mizui *et al.*, 2001).

El origen de las MMPs detectadas en el LS no ha sido totalmente determinado. En el caso de la MMP-2, en una patología articular su principal fuente de producción son las células sinoviales, fibroblastos y condrocitos. Esta producción local podría explicar los niveles enzimáticos significativamente más altos en el LS que en la circulación (Clegg *et al.*, 1997b; Yoshihara *et al.*, 2000; Peake *et al.*, 2005).

En diferentes estudios de detección de MMP-9 en LS los resultados han sido diversos. Yoshihara *et al.*, en su estudio de LS de humanos con OA, tampoco logró detectar actividad de proMMP-9 en todas las muestras estudiadas. En el trabajo de Urbina, (2005), realizado en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se detectó proMMP-9 sólo en 84% de las muestras estudiadas. Kottinen *et al.*, (1999) utilizó muestras de articulaciones con traumas directos, y detectó la

enzima en un 55-84 % del total. En otros estudios la MMP-9 de LS no se ha detectado en absoluto (Clegg *et al.*, 1997a; Konttinen *et al.*, 1999; Yoshihara *et al.*, 2000; Urbina, 2005).

Los niveles de proMMP-9 detectados en los diferentes estudios han variado mucho, pero coinciden en que en articulaciones sin enfermedad inflamatoria, los niveles de proMMP-9 son prácticamente indetectables. En humanos, se ha detectado un aumento de los niveles de proMMP-9 tanto en suero como en LS en artropatías de origen inflamatorio. La cantidad de proMMP-2, en cambio, no ha sido relacionada con el nivel de inflamación, pero sí se relaciona con su nivel de activación (Yoshihara *et al.*, 2000; Peake *et al.*, 2005).

En el estudio de Yoshihara *et al.*, 2000 en LS de pacientes con OA, no se detectaron niveles de MMP-9. Esto podría deberse a la diferencia de sensibilidad de la zimografía en comparación con la EIA (“*Enzyme Immuno Assay*”). En nuestro estudio, la proMMP-9 del LS fue significativamente menor que la actividad detectada en S. A pesar que la OA no es una enfermedad inflamatoria, se debe considerar que siempre existe un componente inflamatorio en su desarrollo (Clegg *et al.*, 1997; Goldbach-Mansky *et al.*, 2000; Jougli *et al.*, 2000; Yoshihara *et al.*, 2000; Tchvetverikov *et al.*, 2005).

A diferencia de la MMP-2, la MMP-9 es sintetizada por una serie de elementos celulares, siendo los más activos durante una enfermedad los neutrófilos y también los macrófagos en circulación, aunque con suficiente estimulación pro-inflamatoria, también las células sinoviales (tipo A) y condrocitos pueden producir la enzima (Clegg *et al.*, 1999b; Peake *et al.*, 2005). Se cree que los niveles de MMP-9 en LS de articulaciones enfermas, se debe principalmente a la producción periférica, que luego ingresa a la articulación, o a la producción desde neutrófilos infiltrados, más que a la producción interna de los tejidos articulares. Por esta razón en equinos con casos de sepsis se ha demostrado que los niveles de MMP-9 en el LS han aumentado significativamente, en relación directa a la cuenta de PMN detectados. Esta sería una explicación a los bajos niveles de actividad de proMMP-9 encontrada en el LS, resultado que coincide con los de otros estudios (Clegg *et al.*, 1999a; Yoshihara *et al.*, 2000; Peake *et al.*, 2005; Urbina, 2005).

Las MMPs son secretadas como zimógenos, y los procesos de activación de estas enzimas son complejos, y en el caso particular de la MMP-2, aún los mecanismos no son conocidos en su totalidad. La forma activa de la enzima se detecta en la zimografía por un cambio en su MM. Para identificar la ubicación de las bandas correspondientes a la forma

activa de las enzimas, se utilizaron las muestras preincubadas con APMA, usadas previamente en la etapa de caracterización de las bandas. En ellas se encontraban las formas activas de MMP-2, MMP-9 y de la forma dímera de la MMP-9. En ensayos no mostrados, se hizo comigrar las muestras preincubadas con APMA en paralelo a aquellas muestras en las que se observaba una banda que podría corresponder a la MMP-2 o MMP-9 activa. En esos ensayos, no se observó la presencia de la forma activa en ninguna de nuestras.

Mizui *et al.*, (2001) detectó MMP-2 activa en todos los grupos estudiados, incluso aquellos que no mostraban cambios radiográficos. La mayor frecuencia de detección fue en las muestras de pacientes con OA, seguido del grupo con degradación articular, y por último en el grupo de alteraciones sin cambios radiográficos, lo que los ordena por nivel de gravedad de la lesión. En su estudio, Mizui *et al.*, (2001) concluye que la cantidad de MMP-2 activada detectada, refleja el grado de degeneración en el espacio articular. La MMP-2 activa detectada en aquellos LS de articulaciones sin cambios radiográficos, reflejan un historial de daño de la articulación, es decir, la cantidad de MMP-2 activa reflejaría un daño anterior. Aunque se utilizó nuestra misma técnica zimográfica, los desórdenes estudiados pueden tener una fisiopatología distinta, o tal vez la dilución de LS utilizado fue distinta.

Por otro lado, los niveles de MMP-9 activa son más fácilmente detectables en pacientes con erosiones radiográficas visibles, pero en nuestro estudio no se detectó ninguna muestra de LS con MMP-9 activa, a pesar del estado avanzado de las enfermedades degradativas de algunos de los ejemplares estudiados (Jouglin *et al.*, 2000).

Según la literatura, existe un aumento significativo en los niveles de MMP-9, tanto monómero como dímero, en el LS de articulaciones con daño articular severo. Los niveles de MMP-9 en el LS podrían reflejar la alteración en el cartílago en artritis en los caballos (Jouglin *et al.*, 2000). En nuestro estudio, en 2 muestras de LS del grupo C se detectó el dímero de MMP-9, lo que equivale a un 7%. En el caso de una de ellas, coincide con ser la que presentó mayor cantidad de proMMP-9. En el S se detectó el dímero en 16 de las muestras (61,5 %), 7 de ellos (63,6 %) del grupo A, y 9 del grupo C (60%).

Jouglin *et al.*, (2000) encontró que existía una relación lineal entre las actividades de la MMP-9 dímero y monómero. Ambas tendían a crecer en la medida que aumentaba la gravedad de las lesiones. Jouglin encontró un aumento significativo en el nivel de actividad del dímero MMP-9 en los casos de mayor gravedad. Estos resultados pueden explicarse con

estudios realizados *in vitro*: la estimulación que origina las enfermedades articulares en equino, no sólo estimula un incremento en la producción de MMP-9, sino además un aumento en la liberación de una serie de enzimas activadas. La detección del dímero, por lo tanto, podría reflejar un exceso de MMP-9, y representar un estado degradativo activo dentro de la articulación. El dímero además, tiene mayor sensibilidad a la activación que la forma monómera, ya que, a diferencia del monómero, es capaz de ser activada por estromelisina (Clegg *et al.*, 1999a).

En nuestro estudio tampoco se detectaron diferencias significativas entre las proteínas de los grupos A y C en el LS, como tampoco en el S. En el estudio de Jouglin *et al.*, 2000, no se encontraron diferencias significativas entre la concentración de proteínas del LS de los grupos de estudio. En uno de los pocos estudios realizado en caballos, analizaron las relaciones entre grado de daño en lesiones articulares (criterio macroscópico *post mortem*) y niveles de proteínas, MMP-2, MMP-9 monómero y MMP-9 dímero en el LS de equinos. Sólo la MMP-9 monómera se encontró relacionada directamente al nivel de daño (Jouglin, 2000).

Los niveles de MMPs en el suero son determinados por una serie de elementos fisiológicos. Muchos eventos del metabolismo generan la producción y liberación de MMPs hacia el torrente sanguíneo, a diferencia del LS, que se encuentra más aislado del resto del organismo. Así, la determinación de los orígenes de los componentes de los fluidos se hace más precisa en LS que en S. En el presente estudio, intentamos limitar estas variables, estandarizando lo más posible nuestros ejemplares, y descartando a aquellos que cursaran con algún proceso que pudiera hacer variar los valores fisiológicos del suero sanguíneo.

La MMP-2 en suero sanguíneo se detectó significativamente en menor cantidad que la MMP-9. La MMP-9 sérica, como se describió, es principalmente sintetizada por neutrófilos y otros PMN, en cambio la MMP-2 es sintetizada principalmente por células articulares. La MMP-2 de la circulación sanguínea probablemente proviene de células vasculares, fibroblastos, y tal vez incluso por filtración desde las mismas articulaciones dañadas. En el caso, por ejemplo, de la MMP-3 y la MMP-1, casi la totalidad de las enzimas detectadas en suero sanguíneo son producidas en la articulación, y desde ahí pasan hacia la circulación, siendo los niveles plasmáticos correlativos al grado de lesión de la articulación (Cunnane *et al.*, 2001; Klimiuk *et al.*, 2002).

Según los estudios de Tchvetverikov *et al.*, (2005) en pacientes con AR, la MMP-9 detectada en S sería representativa del nivel de inflamación de la articulación. Los niveles de MMP-9 estarían altamente relacionados con el nivel de degradación del colágeno articular. Los niveles de MMP-9 sistémica reflejarían la cantidad de la MMP-9 en el LS.

Las muestras de suero sanguíneo de ejemplares sanos mostraron una actividad gelatinásica distinta a la de las muestras patológicas, lo que está ya documentado en otros estudios en humanos, que demuestran una mayor actividad gelatinásica en las muestras patológicas que en las sanas. En humanos se ha encontrado que en LS de articulaciones que cursan con OA, los niveles de MMP-9 doblan los niveles de la misma enzima en articulaciones normales (Jouglin *et al.*, 2000).

Sin ser parte de nuestros objetivos, dentro de los hallazgos de nuestro estudio se encontraron algunas bandas no identificadas dentro de los geles. Tanto en el LS como en el S se detectó actividad gelatinolítica similar a la de las MMPs estudiadas, pero que fueron descartadas por su MM.

La toma de muestra de LS desde la articulación, es un proceso que conlleva importantes riesgos. En una articulación inflamada, la artrocentesis forma parte del tratamiento, ya que el exceso de producción de LS en la articulación provoca un aumento en la presión interna, lo que genera más daño. Es por eso que muchas investigaciones apuntan a la búsqueda de correlaciones entre los niveles de elementos bioquímicos en la sangre y en el LS, para así no necesitar ingresar a la articulación. Para la obtención de muestras de LS de animales sanos, la complicación se multiplica, ya que los niveles de LS son menores que en una inflamada, siendo la obtención de fluido más difícil.

En nuestro estudio no se encontró una correlación entre los valores de las MMPs entre el LS y en suero sanguíneo, de modo que la actividad gelatinásica de MMP-2 y MMP-9 de la circulación no representa el daño en la articulación.

Durante los últimos años se han realizado investigaciones con el objetivo de determinar la utilidad de las MMPs como indicador de daño de algunas patologías. En algunas enfermedades no se ha encontrado una correlación, como en el caso de la hepatitis C (Lichtinghagen *et al.*, 2000), pero en otras las MMPs han dado señales de constituir un potencial marcador biológico, como es el caso del aneurisma aórtico abdominal (Hovsepien *et al.*, 2000).

En el caso particular de las MMPs y su posible utilidad como marcador de enfermedades articulares, los resultados han sido hasta ahora contradictorios. Se ha encontrado una relación entre la cantidad de MMPs encontrada en el suero y el grado de AR, pero no se ha detectado una relación consistente entre la cantidad de MMPs y la neoformación de erosiones articulares (Cunnane *et al.*, 2001).

Otros estudios demostraron una correlación entre la MMP-3 y la disminución del espacio interarticular, pero no han sido muy definitivos, y no se ha demostrado la relación entre MMPs y la generación de nuevas erosiones articulares en OA o sinovitis de otros orígenes, como el traumático. Por otro lado, los niveles de MMP-1 fueron asociados a la formación de nuevas erosiones articulares, pero no con estatus de inflamación articular (Cunnane *et al.*, 2001).

Una de las condiciones que debían reunir los ejemplares incluidos en este estudio era que no estuvieran bajo ningún tratamiento. Los tratamientos utilizados en patologías articulares de equinos son variados, entre los que destacan los corticoesteroides, que han demostrado la disminución en la producción de MMPs, y el aumento de la producción de TIMPs (Cunnane *et al.*, 2001).

La degradación del cartílago articular es el factor crítico al definir OA. Muchas de las modalidades del tratamiento están inspiradas en prevenir este proceso, y con esto la actividad de las enzimas degradativas, como las MMPs (McIlWraith *et al.*, 1996).

La actividad de las MMPs depende de una interacción entre la concentración local de MMPs, TIMPs y la presencia de activadores. Las MMPs extracelulares se pueden acumular por secreción desde células que pueden ser residentes normales o atraídas hacia sitios de lesión, aumentadas por una potencial contribución de preformas presentes en el plasma extravasado (Kenneth *et al.*, 1999).

En resumen, los hallazgos de los niveles de MMPs en OA son todavía limitados, y no está claro que enzima y cuál de sus formas (activa, pro-enzima, complejos con TIMP) tiene la mayor significancia clínica (Garnero *et al.*, 2000).

Las MMPs han sido objeto de una serie de estudios en los últimos años. Y se les ha tratado de utilizar como marcadores de diferentes enfermedades, o marcadores de etapas de una enfermedad. Los resultados de estos estudios han sido muchas veces contradictorios o poco claros, por lo que se espera el desarrollo de nuevos estudios en la misma materia. La

mayor parte de los estudios realizados hasta ahora han sido en humanos, siendo éste uno de los pocos estudios en equinos realizado en animales vivos. El hecho de encontrar aumentada la actividad gelatinásica en suero de los animales patológicos comparado a los sanos, representa un hallazgo interesante y un buen aporte en la búsqueda de un marcador de daño articular. Una proyección de este trabajo sería el monitoreo de los niveles de estas enzimas durante el progreso de las enfermedades articulares en el equino FSC.

7. CONCLUSIONES

- A través de la zimografía fueron detectadas las formas zimógenas de la MMP-2 y de la MMP-9 del LS y del S
- La MMP-2 y la MMP-9 no cambian de manera importante su actividad gelatinolítica en el progreso de una patología articular de origen traumático, tanto en el LS como en el S.
- La MMP-2 y la MMP-9 no se comportan igual en los distintos medios. La MMP-2 tiene una actividad gelatinásica mayor que la MMP-9 en el LS, mientras que en el S de los ejemplares de ambos grupos la actividad gelatinolítica de la MMP-2 y la MMP-9 son similares.
- El S de los ejemplares normales presenta una menor actividad gelatinolítica, tanto de MMP-2 y MMP-9, al compararlo con el S de las muestras de grupos patológicos, pero al igual que en las muestras de los grupos patológicos, la actividad de la proMMP-9 es significativamente mayor que la de la proMMP-2. Por lo tanto la MMP-2 en S podría constituirse como un posible marcador de daño articular en equinos.
- La MMP-2 sufre un mayor cambio que la MMP-9 al comparar la actividad gelatinolítica entre el grupo de los ejemplares patológicos con los normales.

8. BIBLIOGRAFIA

ADARMES, H.; RIVEROS, A.; GALLEGUILLOS, M.; GONZÁLEZ, E. 2003. Contenido de glicosaminoglicanos del líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica de caballos castrados y yeguas de diferentes edades. Arch. med. vet. v.35 n.1

BERNARDO, M.M.; BROWN, S.; LI, Z.H.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. 2002. Design, Synthesis and Characterization of potent, Slow-binding Inhibitors That Are Selective for Gelatinases. J. Biol. Chem. 277: 11201-11207.

BILLINGHURST, R.C.; BRAMA, P.A.J.; VAN WEEREN, P.R.; KNOWLTON, M.S.; MCILWRAITH, C.W. 2004. Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals. AJVR. 65 (2).

BRAMA, P.A.J.; TEKOPPELE, J.M.; BEEKMAN, B.; VANWEEREN, P.R.; BARNEBELD, A. 1998. Matrix metalloproteinase activity in equine sinovial fluid: Influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. Ann. Rheum. Dis. 57: 697-699.

BRAVO MO, MONTELONGO C, HERNÁNDEZ M, CASAS C, MALDONADO G. 1999. Estudio retrospectivo de 36 casos de enfermedad articular degenerativa asociada a ruptura del ligamento cruzado anterior. Rev AMMVEPE ; 10(2): 53-57.

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.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. 1998. Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *JBJS*. 79-A (4).

CATTERALL, J.B.; CAWSTON, T.E. 2003. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Res. Ther.* 5: 12-24.

CLEGG, P.D.; BURKE, R.M.; COUGHLAN, A.R.; RIGGS, C.M.; CARTER, S.D. 1997a. Characterization 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.

CLEGG, P.D.; COUGHLAN, A.R.; RIGGS, C.M.; CARTER, S.D. 1997b. Matrix metalloproteinase 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet. J.* 29(5): 343-348.

CLEGG, P.D.; CARTER, S.D. 1999a. Metalloproteinase-2 and 9 are activated in joint disease. *Equine Vet. J.* 31(4): 324-330.

CLEGG, P.D.; RADFORD, A.D.; CARTER, S.D. 1999b. Short Communication. Molecular Studies of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Equine Joints. *The Vet. J.* 157: 336-338.

CLEMENT IV, J.P.; KASARJIAN, A.; PALMER, W.E. 2005. Synovial inflammatory processes in the hand. *Eu. J. of Rad.*

COLAHAN, P; MAYHEW, I; MERRIT, A; MOORE, J. 1998. *Medicina y Cirugía Equina*. Tomo II. 4ta edición. Interméd. Buenos Aires, Argentina.

CUNNANE, G.; FITZGERALD, O.; BEETON, C.; CAWSTON, T.E.; BRESNIHAN, B. 2001. Early Joint Erosions and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase 1, Matrix Metalloproteinase 3, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 44 (10): 2263-2274.

EL-GABALAWY, H. 1999. [en línea] In: The challenge of early synovitis: multiple pathways to a common clinical syndrome (review). <<http://www.arthritis-research.com/26oct99/ar0101r03>> [04-05-2005].

FREDERIKS, W.M., MOOK O.R.F. 2004. Metabolic Mapping of Proteinase Activity with Emphasis on In Situ Zymography of Gelatinases: Review and Protocols. *J. Histochem.&Cytochem.* 52(6): 711–722.

FRENKEL, S.R; DI CESARE P.E. 1999. Degradation and repair of articular cartilage. *Front. Biosc.* 4: d671-685.

GARNERO, P.; ROUSEAU, C.J.; DELMAS, P.D. 2000. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases; a review. *Arthritis Rheum.* 43 (5): 953–968.

GATTORNO, M.; VIGNOLA, S.; FALCINI, F.; SABATINI, F.; BUONCOMPAGNI, A.; SIMONINI, G.; PICCO, P.; PISTOIA, V. 2001. Serum and Synovial Fluid Concentrations of Matrix Metalloproteinases 3 and Its Tissue Inhibitor 1 in Juvenile Idiopathic Arthritides . *J. Rheum.*

GETTY, R. 2000 *Sindesmología general*. In: S. Sisson – J.D. Grossman. Anatomía de los animales domésticos. Tomo I. 5ta edición Masson, S.A. Barcelona, España. Pp. 39.

GOGGS, R.; CARTER S.D.; ASHULZE-TANZIL, G.; SHAKIBAEI M.; MOBASHERI, A. 2003. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet. J.* 166: 140-158.

GOLDBACH-MANSKY, R.; LEE, J.M.; HOXWORTH, J.M.; SMITH II,J.;DURAY, P.; SCHUMACHER JR, H.R.; YARBORO, C.H.; KLIPPEL, J.; KLEINER D.; EL-GABALAWY H.S. 2000. Active synovial matrix metalloproteinase-2 is

associated with radiographic erosions in patients with early synovitis. *Arthritis Res.* 2: 145-153.

GRAVALLESE E.M. 2002. Bone destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis*; 61 (suppl II): 84-86.

HOU, P.; TROEN, T.; OVEJERO, M.C.; KIRKEGAARD, T.; ANDERSEN, L.; BYRJALSEN, I.; FERRERAS, M.; SATO, T.; SHAPIRO, S.D.; FOGED, N.T.; DELAISEE, J.M. 2004. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involment of MMPs in bone absortion. *Bone* 34: 37-47.

HOVSEPIAN, D.V.; ZIPORIN, S.J.; SAKURAI, M.K.; LEE, J.K.; CURCI, J.A.; THOMPSON, R.W. 2000. Elevated Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-9 in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms: A Circulating Marker of Degenerative Aneurysm Disease. *J. Vasc. Inter Rad.* 11: 1345-1352.

ISHIGURO N, ITO T, ITO H, IWATA I, JUGESUR H, IONESCU M, POOLE R. 1999. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover. *Am. Coll. Rheum.* 42 (1): 129–136.

ITO, A.; MUKAIYAMA, A.; ITOH, Y.; NAGASE, H.; THØGERSEN, I.B.; ENGHILD, J.J.; SASAGURI, Y.; MORI, Y. 1996. Degradation of Interleukin 1 β by Matrix Metalloproteinases *J. Biol. Chem.* 271 (25): 14657-14660.

JILES, J.L. 2005. Comparación de la cantidad de TIMP-1 en Líquido Sinovial de la Articulación Metacarpofalángica Normal y alterada de Equinos. Memoria de Título Facultad de Cs. Vet. y Pec. U. de Chile.

JOUGLIN, M. ; ROBERT, C. ; VALETTE, J.P. ; GAVARD, F. ; QUINTIN-COLONNA, F. ; DENOIX, J.M. 2000. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha

activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. *Vet. Res.* 31: 507- 515.

KENNETH , C.F.; WOLTERS, P.J.; STEINHOFF, M.; BIDGOL,A.; BLOUNT, J.L.; CAUGHEY, J.H. 2000. Mast Cell Expression of Gelatinases A and B Is Regulated by *kit* Ligand and TGF-b1. *J Immunol.* 1; 162(9):5528-35.

KHUMSAP, S.; LANOVAZ, J.L.; ROSENSTEIN, D.S.; BYRON, C.;CLAYTON, H.M. 2003. Effect of induced unilateral synovitis of distal intertarsal and tarsometatarsal joints on sagittal plane kinematics and kinetics of trotting horses. *Am. J. Vet. Res.* 64(12).

KILLINGSWORTH, L.M. 1982. Clinical Applications of Protein Determinations in Biological Fluids Other Than Blood. *Clin. Chem.* 28 (5): 1093-1102.

KIM, D.J.; TAYLOR, H.W., MOORE, R.M.; PAULSEN, D.B.; CHO, D.Y. 2003. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. *Vet. J.* 199: 52-57.

KLEINER, D.E.; STETLER-STEVENSON, W.G. 1999. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chem. Pharm.* 43 (7): 42-51.

KLIMIUK, P.A.; S. SIERAKOWSKI, S.; LATOSIEWICZ1, R.; CYLWIK2, B.; SKOWRONSKI, J.; CHWIECKO, J. 2002. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in different histological variants of rheumatoid synovitis. *Rheum.*, 41: 78-87.

KONTTINEN, Y.T.; AINOLA, M.; VALLEALA, H.; MA, J.; IDA, H. MANDELIN, J.; KINNE, R.W.; SANTAVIRTA, S.; SORSA, T.; LÓPEZ-OTÍN, C.; TAKAGI. 1999. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in

the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid. Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 58: 691-697.

LALU, M.M.; CSONKA, C.; GIRICZ, Z.; CSONT, T.; SCHULZ, R.; FERDINANDY, P. 2002. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2. Biochem. Biophys. Res. Comm. 296: 937-941.

LAMBERT, E.; DASÉ, E.; HAYE, B.; PETITFRÈRE, E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. Crit. Rev. in Onc/Hem. 49: 187-198.

LEE, H.Y.; PARK, K.S.; KIM, M.K.; LEE, T.; RYU, S.H. WOO, K.J. KWON, T.K.; BAE, Y.S. 2005. A small compound that inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 regulation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 336: 716-722

LICHTINGHAGEN, R.; HUEGEL, O.; SEIFERT, T.; HABERKORN, I.; MICHALES, D.; FLEMMING, P.; BAHR, M.; BOEKER, K. 2000. Expression of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. Clin Chem. 46(2): 183-192.

LIPOWITZ, A.J.; NEWTON C.D. 1985. Degenerative Joint Disease and Traumatic Arthritis In: Textbook of Small Animal Orthopaedics. Newton C.D. and Nunamaker D.M. (Eds.). Ithaca: International Veterinary Information Service, 1985; B0088.0685 (Last Updated: 1-Jan-1985) 097528801.

LOWRY, OH.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin's phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

MAKOWSKI, G.S.; RAMSBY, M.L. 2005. Autoactivation profiles of calcium-dependent matrix metalloproteinase-2 and -9 in inflammatory synovial fluid: Effect of pyrophosphate and bisphosphonates. Clin Chim Acta. Article in press.

MALEMUD, C.J. 1999. Fundamental pathways in osteoarthritis: an overview. Front. Biosc. 4, d659-66.

MARINI, S.; FASCIGLIONE, G.F.; MONTELEONE, G.; MAIOTTI, M.; TARANTINO, U.; COLETTA, M. 2003. A correlation between knee cartilage degradation observed by arthroscopy and synovial proteinases activities. Clin. Biochem. 36: 295-304.

MARTEL-PELLETIER, J.; ALAAEDDINE,N.; PELLETIER,J.P. 1999. Citokines and their role in the pathophysiology osteoarthritis. Front. Biosc. 4: d694-703.

MCILWRAITH, C.V. 1996. Anatomy and physiology of synovial joints. In: Joint Disease in the Horse. Philadelphia. W.B. Saunders p. 1-29.

MCILWRAITH, C.W. 2005. [en línea] In: Traumatic Joint Injuries and Disease. <<http://www.colostate.edu/depts/equine/graduate/orthopedics/questions/tjd.html>>. [10-12-2005].

MIZUI, T.; ISHIMARU, J.I.; MIYAMOTO, K.; KURITA, K. 2001. Matrix metalloproteinase-2 in synovial lavage fluid of patients with disorders of the temporomandibular joint. Br. J. Oral Maxil. Surg. 39: 310–314.

NAGASE H, WOESNER JF. 1999. Matrix metalloproteinases, minireviw. J Biol Chem. 274 (31): 21491-21494.

NAUGHTON, D.P.; HAYWOOD, R.; BLAKE, D.R.; EDMONDS, S.; HAWKED, G.E.; GROOTVELD, M. 1993. A comparative evaluation of the metabolic profiles of normal and inflammatory knee-joint synovial fluids by high resolution proton NMR spectroscopy. FEBS. 332 (3): 221-225.

O'DRISCOLL, S.W. 1998. The Healing and Regeneration of Articular Cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 80: 1795-1812.

PEAKE, N.J.; FOSTER, H.E.; KHAWAJA, K.; CAWSTON, T.E.; ROWAN, A.D. 2005. Assessment of the clinical significance of gelatinase activity in Juvenile Idiopathic Arthritis patient using quantitative protein substrate zymography. *Ann. Rheum. Dis.* Doi. 10:1136

PETERSON, I.F.; SANDQVIST, B.; SAXNE, T. 1997. Cartilage markers in synovial fluid in symptomatic knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 56: 64 – 67.

PETROW, P.K.; WERNICKE, D.; WESTHOFF, C.S.; HUMMEL, K.M.; BRÄUER, R.; KRIEGSMANN, J.; GROMNICA-IHLE, E.; GAY, R.E.; GAY, S. 2002. Characterisation of the cell type-specificity of collagenase 3 mRNA expression in comparison with membrane type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 6: 391-397.

POOLE, R.A. 1999 An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. [Front. Biosc. 4: d662-670.](#)

POOLE, R.A.; KOBAYASHI, M.; YASUDA, T.; LAVERTY, S.; MWALE, F.; KOJIMA, T.; SAKAI, T.; WAHL, C.; EL-MAADAWY, S.; WEBB, G.; TCHETINA, E.; WU, W. 2002. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis *Ann. Rheum. Dis.* 61: 78-81.

REYNOLDS, J.J. 1996 Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis.* Mar. 2(1): 70-6.

ROONEY, J.R. 2000. Equinos: Introducción In: S. Sisson- J.D. Grossman. Anatomía de los animales domésticos. Tomo I 5ta edición Masson, S.A. Barcelona, España. Pp 287.

RUGGLES, A.J. 2005. Stress remodelling and lameness in horses. 11^o Congresso Nazionale Multisala SIVE. Pisa. Italia.

SALAMANCA, L. 1995. Modelo de reparación biológica en cartílago articular de conejo. Memoria de título Med. Vet. . Fac. Cs. Vet.y Pec. U. de Chile.

SAN ROMAN, F. 2000. [en línea] In: El cartílago articular. Iams Nutrition Symposium, Chicago. <http://www.colvet.es/infovet/ene01/ciencias_v/articulo1.htm>. [06-10-2005].

SANDELL L. J.; AIGNER T., 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: Cellular Biology of Osteoarthritis. Arthritis Res. 3: 107-113.

SHANKAVARAM, U.T.; LAI, W.; NETZEL-ARNETT, S.; MANGAN, P.R.; ARDANS, J.A.; CATERINA, N.; STETLER-STEVENSON, W.G.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; WAHL, L.M. 2001. Monocyte Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase. J. Biol. Chem. 276 (22): 19027-19032.

SICARD, G.K., MARKEL, M.D.; MANLEY, P.A. 2005. Histomorphometric analysis of the proximal portion of the femur in dogs with moderate osteoarthritis. Am J. Vet. Res. 66(1).

SISSON, S; GROSSMAN, J.D. 1982. Anatomía de los animales domésticos. Tomo I 5ta edición JGH editores, Barcelona, España.

SOPENA, J.J.; CARRILLO, J.M.; RUBLO, M.; REDONDO, J.; SERRA, I.; SOLAR, C. 2003. [en línea]. In: Estructura y Función del Cartílago articular. <http://www.traumatologiaveterinaria.com/articuls/docs/cartilago_articular.pdf> . [18-11-2005].

STERNLICHT, M.D, WERB Z. 2001. How Matrix Metalloproteases Regulate Cell Behavior. Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 17: 463-516.

SWAN, A.; AMER, H.; DIEPPE, P. 2002. The value of synovial fluid assays in the diagnosis of joint disease: a literature survey. *Ann Rheum Dis.* 61; 493-498.

TARNER, I.H.; HARLE, P. ; MULLER-LADNER, U.; GAY, R.; GAY, S. 2005. The different stages of synovitis: acute v/s chronic, early v/s late and non-erosive v/s erosive. *Best Pract. and Res Clinic. Rheum.* 19(1): 19-35.

TARRAGÓ, A. 2003. [en línea] In: Osteoarthritis: Diagnóstico y Evaluación. <<https://Sl.acens.com/traumatologiaveterinaria.com/articuls/docs/osteoarthritis.pdf>> [08-10-2005].

TCHETVERIKOV, I.; LOHMANDER, L.S.; VERZIJL, N.; HUIZINGA, T.W.J.; TEKOPPELE, J.M.; HANEMAAIJER, M.; DEGROOT, J. 2005. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis;* 64; 694-698 .

TEW, S.R.; KWAN, A.P.L.; HANN, A.; THOMSON, B.M.; ARCHER, C.W. 2000. The reactions of articular cartilage to experimental wounding: Role of Apoptosis. *Arthritis Rheum.* 43(1): 215–225.

TOTH, M.; CHVYRKOVA, I.; BERNARDO, M.M.; HERNANDEZ-BARRANTES, S.; FRIDMAN, R. 2003. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membrans. *Biochem. biophys. Res Comm.* 308; 386-395.

TRUMBLE T.N, TROTTER G.W, THOM OXFORD, J. 2001. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytoquine expression in naturally occuring joint disease in horses. *AJVR.* 62(9).

TRUMBLE, T.N.; BILLINGHURST, R.C.; MCILWRAITH, C.W. 2004. Correlation of prostaglandin E₂ concentrations in synovial fluid with ground reaction forces

and clinical variables for pain or inflammation in dogs with osteoarthritis induced by transection of the cranial cruciate ligament. AJVR. 65(9).

[URBINA, A. 2005. Comparación de la actividad gelatinásica A y B MMP-2 y MMP-9 en el líquido sinovial proveniente de la articulación metacarpo falángica equina normal y alterada.](#) Memoria de Título Facultad de Cs. Vet. y Pec. U. de Chile. _

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 matriz metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of various patient populations. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 104 (1): 42-52.

VAN MEURS, J.B.J.; VAN LENT, P.; VAN DE LOO, A.A.J.; HOLTHUYSENET E.M. 1999. Increased vulnerability of postarthritic cartilage to a second arthritic insult: accelerated MMPs activity in a flare up of arthritis. Ann. Rheum. Dis. 58: 350.

VÁSQUEZ, F. 2001. Detección en el líquido sinovial de moléculas de la matriz extracelular del cartílago articular de carpo equino en condición de fractura. Memoria de título Med. Vet. Fac. Cs. Vet. y Pec. U de Chile.

VRAHAS, M.S.; MITHOEFER, K.; JOSEPH, D. 2004. The Long-Term Effects of Articular Impaction [SECTION I: SYMPOSIUM: Articular Fractures] Clin. Orthop. Rel. Res. 423: 40-43

WANG, X.; LIANG,J.; KOIKE, T.; SUN, H.; ICHIKAWA, T.; KITAJIMA, S.; MORIMOTO, M.; SHIKAMA, S.; WATANABE,T.; SASAGURI, Y.; FAN, J. 2004. Overexpression of Human Matrix Metalloproteinase- 12 Enhances the Development of Inflammatory Arthritis in Transgenic Rabbits. Am. J. Path. 165(4).

YOSHIHARA, Y.; NAKAMURA, H.; OBATA, K.; YAMADA, H.; HAYAKAWA, T.; FUJIKAWA, K.; OKADA, Y. 2000. Matriz metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in sinovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 59: 455-461.

ZHAO, H.; BERNARDO, M.M.; OSENKOWSKI, P.; SOLHAIL, A.; PEI, D.; NAGASE, H.; KASHIWAGI, M.; SOLOWAY, P.D.; DECLERCK, Y.A. 2004. Differential Inhibition of Membrane Type 3 (MT3)-Matrix Metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 Regulates Pro-MMP-2 Activation. *J. Biol. Chem.* 279(10).