



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE TIMP-1 EN
LÍQUIDO SINOVIAL DE LA ARTICULACIÓN
METACARPOFALÁNGICA NORMAL Y ALTERADA DE
EQUINOS”

JORGE LUIS JILES MEZA

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

PROFESOR GUÍA: MARCO A. GALLEGUILLOS

SANTIAGO – CHILE
2006



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE TIMP-1 EN LÍQUIDO SINOVIAL DE LA ARTICULACIÓN METACARPOFALÁNGICA NORMAL Y ALTERADA DE EQUINOS”

JORGE LUIS JILES MEZA

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA :	DR. MARCO GALLEGUILLOS.
PROFESOR CONSEJERO :	DRA. EMA GONZÁLEZ
PROFESOR CONSEJERO :	DR. ENRIQUE PINTO.

SANTIAGO – CHILE
2006

RESUMEN

La enfermedad degenerativa articular (EDA) u osteoartritis (OA) afecta el rendimiento de los equinos con las consecuentes pérdidas económicas.

El trauma articular puede provocar la liberación de mediadores químicos que incluyen citoquinas y enzimas denominadas metaloproteinasas (MMPs), que pueden degradar la matriz extracelular (MEC), componente importante del cartílago articular.

Un mecanismo de regulación en la degradación de la MEC lo constituye la acción de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), que son inhibidores naturales de las MMPs encontrados en varios tejidos y fluidos corporales. El balance que existe entre MMPs y TIMPs está involucrado en eventos normales y patológicos entre los cuales se encuentran la cicatrización, la remodelación de tejidos, la angiogénesis, tumorigénesis y metástasis.

En éste estudio se analizaron muestras de líquido sinovial equino (LS) para comparar la cantidad de TIMP-1 de las articulaciones metacarpofalángicas normales y alteradas. Se trabajó con cuatro grupos de LS clasificados según las características del cartílago articular (CA) y de la membrana sinovial (MS). En el primer grupo se consideraron las muestras de LS cuya articulación presentaba el CA y la MS normales (NN), en el segundo grupo el CA normal y la MS alterada (NA), en el tercer grupo el CA alterado y la MS normal (AN) y en el último grupo el CA y la MS alterados (AA).

Se encontró que los niveles de TIMP-1 fueron significativamente más altos en los LS provenientes de las articulaciones de equinos normales, tanto en membrana sinovial como en cartílago articular (NN), que en aquellos que al menos presentaban una alteración (AN, NA y AA).

ÍNDICE

	Página
I.- Introducción.....	1
II.- Revisión Bibliográfica.....	4
1- Cápsula articular.....	5
a.- Cápsula articular fibrosa.....	5
b.- Membrana sinovial.....	6
2- Líquido sinovial.....	7
3- Cartílago Articular.....	7
4- Hueso subcondral.....	11
5- Osteoartritis.....	11
6- Metaloproteinasas.....	15
7- Inhibidores tisulares de metaloproteinasas.....	17
III.- Objetivos.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos.....	22
IV.- Materiales y Métodos.....	23
1-Material biológico.....	23
2-Procesamiento de líquido sinovial.....	25
3-Determinación de proteínas.....	25
4-Control positivo: TIMP-1 de pulpa de diente bovino.....	26
5-Detección de TIMP-1 mediante Dot blot.....	26
6-Control del segundo anticuerpo por análisis de Dot blot	27
7-Detección de TIMP-1 mediante Western Blot	28
8-Control del segundo anticuerpo por análisis de Western Blot.....	29
9-Determinación de masa molecular de TIMP-1.....	29

11-Densitometría.....	29
11-Análisis de los datos.....	30
V.- Resultados.....	31
VI.- Discusión.....	38
VII.- Conclusiones.....	42
VIII.- Bibliografía.....	43

I.- INTRODUCCIÓN

Existen diversas enfermedades del sistema osteoarticular, que pueden afectar el rendimiento de los equinos con las consecuentes pérdidas económicas, debido a que la cojera, producto de una lesión articular, conduce a un menor rendimiento y a un retiro anticipado de la actividad competitiva. Entre las causas más comunes de cojeras se encuentran el trauma articular y la enfermedad degenerativa articular, que en conjunto constituyen un gran porcentaje de los casos clínicos que se describen en la práctica veterinaria.

Entre las alteraciones que pueden afectar el normal desplazamiento de los equinos, destacan las patologías podales y entre ellas, un número importante afecta a las articulaciones sinoviales o diartrosis.

Se ha descrito que no sólo las anomalías mayores de las articulaciones, como una fractura o daño de ligamentos pueden causar una alteración de ella, sino también, cambios sutiles en la biomecánica como es, la inestabilidad o alteración de la forma de la articulación, el golpeteo constante de las articulaciones, el sobre entrenamiento, la mala conformación de aplomos, los movimientos viciosos que no corresponden al normal desplazamiento de los miembros o el estrés excesivo peso-presión que pueden constituirse en factores predisponentes del daño articular que podrían contribuir al progreso de la enfermedad.

Cuando se produce alguna alteración en la articulación, no sólo se ve afectado el cartílago, sino también pueden alterarse los otros elementos articulares como hueso, membrana sinovial y cápsula articular. Este daño articular, en lugar de ser un proceso pasivo, se presenta de forma activa en la articulación y su origen se asocia entre otras a una degradación o pérdida de la arquitectura normal del colágeno, seguido por una respuesta de reparación de la matriz producto de la capacidad de los condrocitos para producir cartílago de reemplazo.

El cartílago de reemplazo es menos resistente al uso que la estructura original y con el tiempo, las superficies articulares pueden desarrollar pérdida en el espesor del cartílago.

El daño articular provoca la activación de procesos enzimáticos degradativos de componentes de la matriz extracelular (MEC) del cartílago, tanto colágeno como proteoglicanos. Si esta acción permanece en el tiempo puede conducir a un proceso degenerativo de carácter crónico, en el que se produce una disminución en la capacidad funcional del cartílago y por ende de la articulación. La alteración de la MEC del cartílago, hace que el cuadro patológico se perpetúe en el tiempo, pasando de un estado agudo inicial a uno crónico degenerativo, a veces en forma irreversible, si no es diagnosticado y tratado oportunamente. De este modo y en estas condiciones, la probabilidad de recuperación de esa articulación en el tiempo se hace cada vez más difícil, debido a que el cartílago se degenera al punto en que el hueso queda expuesto al espacio sinovial y finalmente se puede llegar a la inmovilidad permanente de la articulación por artrosis.

Entre las enzimas degradativas descritas en las articulaciones se encuentra un grupo particular llamado metaloproteinasas de la matriz (MMPs) ó matrixinas. Las MMPs constituyen una familia única de metaloenzimas especializadas en el catabolismo de componentes de la matriz extracelular y que tienen un papel importante en la remodelación de los tejidos en condiciones de normalidad, así como también en la destrucción patológica de la matriz de muchos tejidos cuando sus niveles se ven alterados como en artritis, periodontitis, ulceración de los tejidos, en la invasión de células cancerígenas y metástasis.

En la articulación sinovial se han encontrado MMPs y sus inhibidores, en distintas regiones anatómicas de ésta como son: el cartílago en reabsorción, el líquido sinovial osteoartrítico y reumatoideo, los huesos, y los tejidos blandos adyacentes.

Un mecanismo de regulación en la degradación de la MEC se relaciona con los inhibidores tisulares de metaloproteínas (TIMPs) que actúan inhibiendo la

actividad de las metaloproteinasas, contribuyendo al balance entre la formación y la degradación de la matriz extracelular.

En este trabajo se planteó comparar la cantidad de TIMP-1 en líquido sinovial proveniente de articulaciones metacarpofalángicas alteradas y normales de equinos con la finalidad de ver si existía alguna diferencia entre ellas.

Se ha elegido el análisis de líquido sinovial, porque los TIMPs son proteínas secretadas al líquido sinovial y por constituir éste una muestra de fácil obtención, cuyas modificaciones en su composición en condiciones normales o como consecuencia de una inflamación, reflejan los cambios físicos y químicos del medio ambiente articular.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las principales funciones de las articulaciones diartrodiales en el equino son el permitir el movimiento de las extremidades en asociación con los músculos y tendones, junto con la distribución y transferencia de carga (Todhunter, 1996).

La articulación diartrodial en el equino consta de estructuras óseas y cartilaginosas, ligamentos y fluido sinovial. La articulación metacarpo-falángica está compuesta por el extremo distal del hueso metacarpiano principal, la extremidad proximal de la primera falange y los dos huesos sesamoideos proximales. Estos huesos se relacionan entre sí por un sistema de ligamentos, y por una cápsula articular (Sisson y Grossman, 1994), que delimita un espacio hermético denominado cavidad articular.

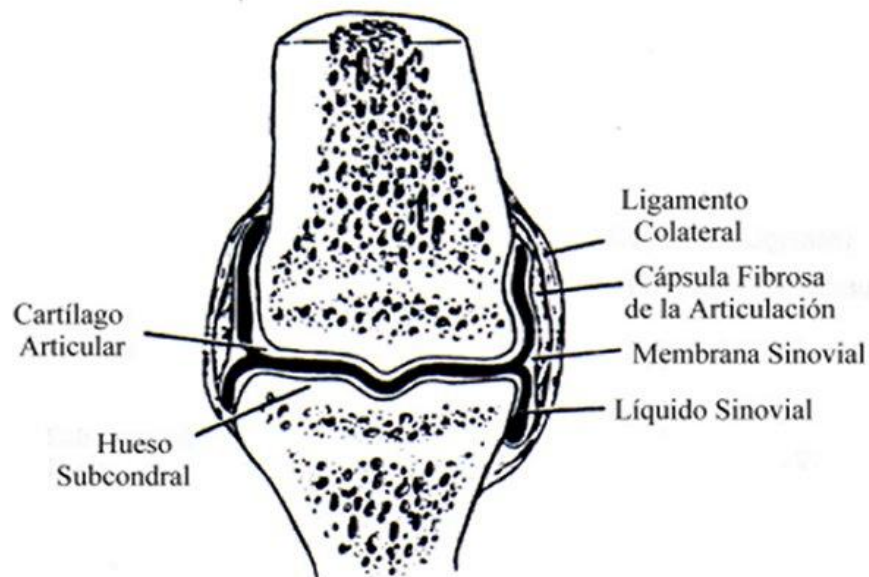


Figura 1. Esquema de una articulación normal.
(McIlwraith, 1987).

1.- CÁPSULA ARTICULAR

Esta compuesta por:

a.- Cápsula articular fibrosa (CF):

La cápsula articular fibrosa, los ligamentos y los tendones, junto con la geometría propia de la articulación, proveen la sujeción mecánica de la articulación (Figura 1). La falla de cualquiera de estos puntos conduce a la incongruencia de las superficies articulares y a un deterioro mecánico acelerado del cartílago articular. La CF contiene terminaciones nerviosas propioceptivas y nociceptivas y, por lo tanto, es el órgano sensitivo de la articulación. Aunque la cápsula fibrosa tiene una estructura colágena densa, la cápsula en sí está vascularizada y su proximidad al lecho capilar de la cobertura sinovial la hace responder muy sensiblemente a los mediadores usuales de la inflamación. La CF se continúa con el periostio del hueso adyacente a la articulación. La calcificación de los tejidos en esta unión (entesiopatía) es un cambio morfológico frecuente, correspondiente a la enfermedad degenerativa articular u osteoartritis. Aunque la entesiopatía puede ser resultado del estiramiento y desgarramiento del tejido capsular, también puede ser una respuesta inespecífica a otras alteraciones articulares. La inmovilización de una articulación debida a fijación externa o producto de dolor, también conduce a cambios de la CF, disminuyendo la flexibilidad y los rangos de movimiento de la articulación (Richardson, 1998).

b.- Membrana Sinovial (MS):

Es la capa más interna de la cápsula articular que reviste a toda la articulación, excepto a nivel de los cartílagos articulares y actúa como barrera selectiva para la ultra filtración de componentes del plasma sanguíneo, los que difunden hacia los condrocitos determinando así, la composición del líquido sinovial (González y Adames, 1990). La cobertura sinovial de la articulación tiene dos estratos: uno delgado externo, compuesto por tejido laxo y otro interno (íntimo) compuesto por células sinoviales especializadas (Richardson, 1998). La superficie interna de la membrana sinovial suele ser lisa y brillante y puede presentar gran número de excrecencias llamadas franjas o vellosidades, que se proyectan en la

cavidad sinovial y contienen una cantidad importante de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Ham, 1975). La parte más interna está formada por una capa de células sinoviales (sinoviocitos), dispuestas sobre una matriz de fibras de colágeno y proteoglicanos, existiendo dos tipos de sinoviocitos: el tipo A, muy parecido a un macrófago, con gran cantidad de organelos citoplasmáticos como lisosomas, vacuolas y vesículas picnóticas (vesículas de digestión). El tipo B o fibroblástico, contiene menos organelos y una cantidad más abundante de retículo endoplásmico; sintetiza el ácido hialurónico que forma parte del líquido sinovial. Además, en el tejido sinovial subyacente (subintima), se puede encontrar una serie de tipos celulares como son células presentadoras de antígeno, mastocitos y un escaso número de leucocitos polimorfonucleares y linfocitos. Esta parte más externa de la membrana se continúa en forma ininterrumpida con el tejido fibroso denso de la cápsula articular (Byars *et al.*, 1982; Palmer y Bertone, 1994).

2.- LIQUIDO SINOVIAL (LS):

El LS es un dializado plasmático al que las células sinoviales especializadas le agregan ácido hialurónico y otras sustancias. Distintas enzimas, inhibidores de enzimas, mediadores y glicoproteínas lubricantes secretadas al líquido sinovial son muy importantes para la función articular. Se piensa que el líquido sinovial es como un aceite para la articulación o que actúa como un lubricante por sus características palpables. Además tiene un papel igualmente importante en el apoyo nutricional y la regulación metabólica del cartílago articular (Richardson, 1998).

En la formación del líquido sinovial se encuentra involucrado un proceso de filtración de tres pasos. En primer lugar, el endotelio de los capilares presentes en la subintima sinovial restringe el pasaje de las células sanguíneas y de las proteínas más grandes. En segundo lugar, la brecha entre los sinoviocitos en la íntima sinovial filtra las proteínas más pequeñas. En tercer lugar, un estrato límite

de ácido hialurónico que cubre la superficie interior de la articulación filtra las moléculas difusibles mas pequeñas (Richardson, 1998).

El ácido hialurónico está formado por unidades de ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina que se alternan, llegando a alcanzar masas moleculares relativas superiores a un millón; es así como forma disoluciones claras y viscosas que sirven de lubricante en el líquido sinovial de las articulaciones (Lehninger *et al.*, 1993; Mcllwraith, 1996).

El líquido sinovial tiene una composición, aproximadamente entre un 25% a un 35% de las proteínas del plasma del mismo animal. En la filtración, se excluyen las proteínas de alto peso molecular existiendo un predominio de albúminas en relación con las globulinas (Mcllwraith, 1987; Todhunter, 1996).

El líquido sinovial tiene las siguientes funciones, de acuerdo a Richardson (1998):

1. Lubricación de las superficies articulares, ligamentos, tendones, etc.
2. Regulación de la presión osmótica, favoreciendo la difusión del dializado plasmático debido al efecto de la presión coloide-osmótica ejercida por los hialuronatos del líquido sinovial.
3. Absorción de impactos. Esta característica está ligada a la capacidad de deformación de sus polímeros (hialuronatos).
4. Vía de difusión para la nutrición de los tejidos articulares, especialmente para los condrocitos del cartílago, junto con la evacuación de sus desechos metabólicos.

3.- CARTÍLAGO ARTICULAR (CA):

La degeneración del CA es el punto de referencia para la enfermedad degenerativa articular u osteoartritis. Siendo un tejido hipocelular que carece de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y de nervios en su interior, se había considerado que el cartílago articular era un material inerte. Sin embargo, se le ha identificado actualmente como una sustancia extraordinaria que en estado normal soporta millones de ciclos de carga. Esta función mecánica es una consecuencia

de su estructura, ya que el cartílago es un gel sobrehidratado con un esqueleto de refuerzo de fibras de colágeno. Es un tejido altamente hidratado (70%) constituido por una pequeña proporción de células (2-5%) denominadas condrocitos, que se encargan de mantener (sintetizar y degradar) los componentes de la MEC que constituye el resto del porcentaje del cartílago (Ham, 1975; Palmer y Bertone, 1994).

El espacio extracelular, en el cartílago articular de los tejidos animales, se encuentra ocupado por un material de consistencia parecida a la de un gel, denominado matriz extracelular, en el que se encuentran incluidas células llamadas condrocitos, encargadas a su vez de sintetizar los componentes de la matriz del cartílago. La MEC está compuesta por una red de fibras de colágeno y proteoglicanos que conforman un gel que se caracteriza por su porosidad, indispensable para la difusión de nutrientes y oxígeno hacia cada una de las células (Lehninger *et al.*, 1993, McIlwraith, 1996).

En la MEC del cartílago el componente orgánico cuantitativamente más importante son los proteoglicanos, que están formados por una proteína central a la que se unen numerosas cadenas de heteropolisacáridos, denominados glicosaminoglicanos, que son una familia de polímeros lineales compuestos por unidades repetitivas de disacáridos, donde uno de los monosacáridos es siempre N-acetilglucosamina o bien N-acetilgalactosamina, y el otro componente es un ácido urónico, generalmente ácido glucurónico (Lehninger *et al.*, 1993).

A su vez, los proteoglicanos como conjunto, se unen a una molécula de ácido hialurónico originando un agregado macromolecular de gran peso molecular. Se debe precisar que el ácido hialurónico sintetizado por los condrocitos no debe ser confundido con el encontrado en el líquido sinovial que es producido por los sinoviocitos (González y Adames, 1990; Lehninger *et al.*, 1993).

En la unión de los condrocitos a la matriz extracelular participan diversas familias de proteínas, que incluyen a ciertas proteínas integrales de membrana (integrinas) que poseen sitios de unión para otra familia de proteínas de adhesión que incluye a la fibronectina y la laminina, las cuales además se unen a los proteoglicanos. Es probable que este complejo sistema de fijación de proteínas no

sirva únicamente para anclar la célula a la matriz extracelular, sino también para dirigir la migración celular en el tejido en desarrollo a lo largo de rutas determinadas por la organización de la matriz (Lehninger *et al.*, 1993).

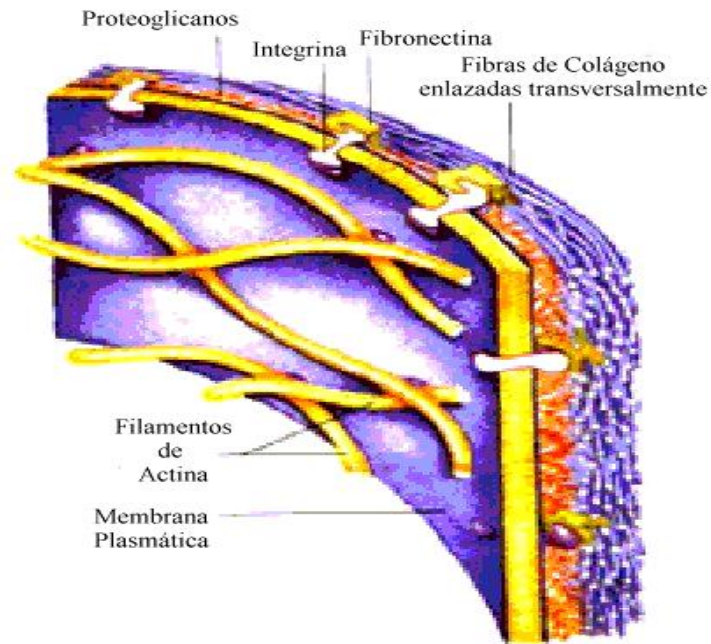


Figura 2. Matriz Extracelular. Interacción entre la MEC y una célula a través de las integrinas (Lehninger *et al.*, 1993).

Como se ve en la figura 2, la asociación entre las células y el proteoglicano de la matriz se encuentra mediada por una proteína de membrana (integrina) y una proteína extracelular (fibronectina u otra) que contiene sitios de unión tanto para la integrina como para el proteoglicano (Lehninger *et al.*, 1993).

Sobre la base de peso seco, el cartílago articular presenta aproximadamente un 50% de colágeno, 35% de minerales, 1% de lípidos y entre un 1% a un 12% de condrocitos (Todhunter, 1996). El colágeno tipo II es el más importante cuantitativamente, representando desde un 85 a un 90% de colágeno, siendo su principal función la de dar firmeza al cartílago articular. El recambio

normal del colágeno está dado por colagenasas secretadas por los condrocitos (Palmer y Bertone, 1994).

Los condrocitos mantienen, recambian y perciben los cambios estructurales de la matriz resultante de procesos catabólicos. Además estas células sintetizan, organizan y regulan la composición de la MEC. El condrocito obtiene sus nutrientes por difusión desde el líquido sinovial, el cual también es un medio para eliminar los desechos metabólicos. Los estímulos químicos y paracrinos provenientes del sinoviocito llegan al condrocito por medio del líquido sinovial. (Todhunter, 1996). Los nutrientes tales como glucosa, oxígeno y aminoácidos llegan a las células por simple difusión de modo que el metabolismo del cartílago es predominantemente anaeróbico. El tamaño de las partículas que pueden penetrar el cartílago articular está regulado por la concentración de proteoglicanos del cartílago, siendo excluidas de la matriz generalmente moléculas mayores de 69 KDa (Maroudas, 1976). No se conoce con precisión cómo el condrocito dirige el recambio de la matriz, pero se han identificado dos factores que aceleran este recambio: la carga dinámica que se aplica constantemente sobre el cartílago articular y las citoquinas (Todhunter, 1996).

Las proteínas fibrosas como el colágeno y la elastina se encuentran entrelazadas con los proteoglicanos, formando una malla entrecruzada que proporciona resistencia y elasticidad a la totalidad de la matriz extracelular (Lehninger *et al.*, 1993).

En el cartílago articular las propiedades de tensión son proporcionales a la estructura y contenido de colágeno, mientras que las propiedades compresivas son proporcionales al contenido de proteoglicanos (Mc Ilwraith, 1987; Todhunter, 1996).

4.- HUESO SUBCONDRA (HS):

El HS adyacente al CA es también importante dentro del funcionamiento normal de la articulación, ya que es el encargado de la mayor parte de absorción de choques. Como el aumento o disminución en la elasticidad del HS afecta al cartílago que tiene encima, se ha establecido la hipótesis que la rigidez del hueso subcondral por la cicatrización de microfracturas y la remodelación adaptativa es la lesión inicial en la enfermedad degenerativa articular u osteoartritis y que el deterioro del cartílago articular es secundario a las consecuencias mecánicas de estos cambios óseos (Richardson, 1998).

5.- OSTEOARTRITIS

La enfermedad degenerativa articular (EDA) u osteoartritis (OA) es una enfermedad irreversible, de desarrollo progresivo caracterizado por una pérdida gradual del cartílago articular, que afecta a articulaciones móviles, acompañada por cambios en el hueso y tejidos blandos de la articulación. Clínicamente esta enfermedad se manifiesta por dolor y disfunción articular, los principales hallazgos patológicos incluyen grados variables de ruptura y fragmentación o una completa erosión y pérdida del cartílago articular (Brandt y Mankin, 1986).

Una teoría aceptada de la osteoartritis es que la ruptura de la matriz del cartílago articular ocurre primariamente por una degradación enzimática (Brandt y Mankin, 1986).

Esta patología se caracteriza por degeneración del CA, esclerosis del HS, formación de osteofitos, variados grados de inflamación sinovial y fibrosis de tejido periarticular (Kidd *et al.*, 2001), resultando en algunos casos en la pérdida del espacio articular, y cambios reactivos en el borde articular y en su cápsula (Pool y Meagher, 1995).

La OA puede dividirse en primaria y secundaria. La primaria se refiere a una enfermedad idiopática de las articulaciones relacionada con la edad, de comienzo

insidioso, en la que existe un deterioro crónico de la estructura articular normal y pérdida gradual de la función. A este proceso obedecen muchas de las lesiones degenerativas en apariencia asintomáticas encontradas durante la necropsia que a menudo afectan pares de articulaciones de equinos de ciertas edades (Pool y Meagher, 1995).

Por el contrario, la OA secundaria se desarrolla en articulaciones previamente normales a continuación de su lesión. Esta puede ocurrir a cualquier edad, de forma que las causas de OA secundarias incluirían osteocondrosis, una mala conformación que ejerza fuerzas anormales sobre articulaciones normales, cualquier trastorno de crecimiento que provoque deformidad angular de los miembros y traiga aparejado signos clínicos de enfermedad articular, traumatismo súbito o reiterado en las superficies articulares o en los puntos de inserción, infecciones articulares y medicaciones tales como corticoides si son usados en forma incorrecta. En este tipo de OA, el comienzo de los cambios estructurales y de los signos clínicos puede comenzar a cualquier edad luego de la agresión primaria. El ritmo de progresión puede ser lento o rápido, de acuerdo con la naturaleza y gravedad del trastorno primario (Pool y Meagher, 1995).

Los tipos de cambios morfológicos producidos por ambas formas de OA son similares, y las dos formas sólo pueden distinguirse mediante el hallazgo de evidencia de lesión primaria o teniendo una historia de trastorno predisponente (McIlwraith, 1996).

La OA es una causa común de cojeras y disminución del rendimiento en los equinos. Se ha estimado que del total de días al año perdidos en una población de caballos de carrera jóvenes un 68% está relacionado con las cojeras. Además en un hospital veterinario del total de cojeras, un 54% corresponde a OA lo que indica la alta prevalencia de esta patología (Kidd *et al.*, 2001).

Las sinovitis y capsulitis son cambios iniciales comunes en la articulación de equinos atletas asociados al trauma. Ambas pueden afectar la difusión a través de la membrana sinovial, inclusive pueden además afectar directamente el metabolismo del sinoviocito. Este daño provoca la liberación de enzimas y citoquinas que alteran el ambiente intra-articular afectando el cartílago articular el

cual responde incrementando la producción celular de prostaglandinas E2, citoquinas, metaloproteinasas (MMP) y radicales libres (McIlwraith, 1996).

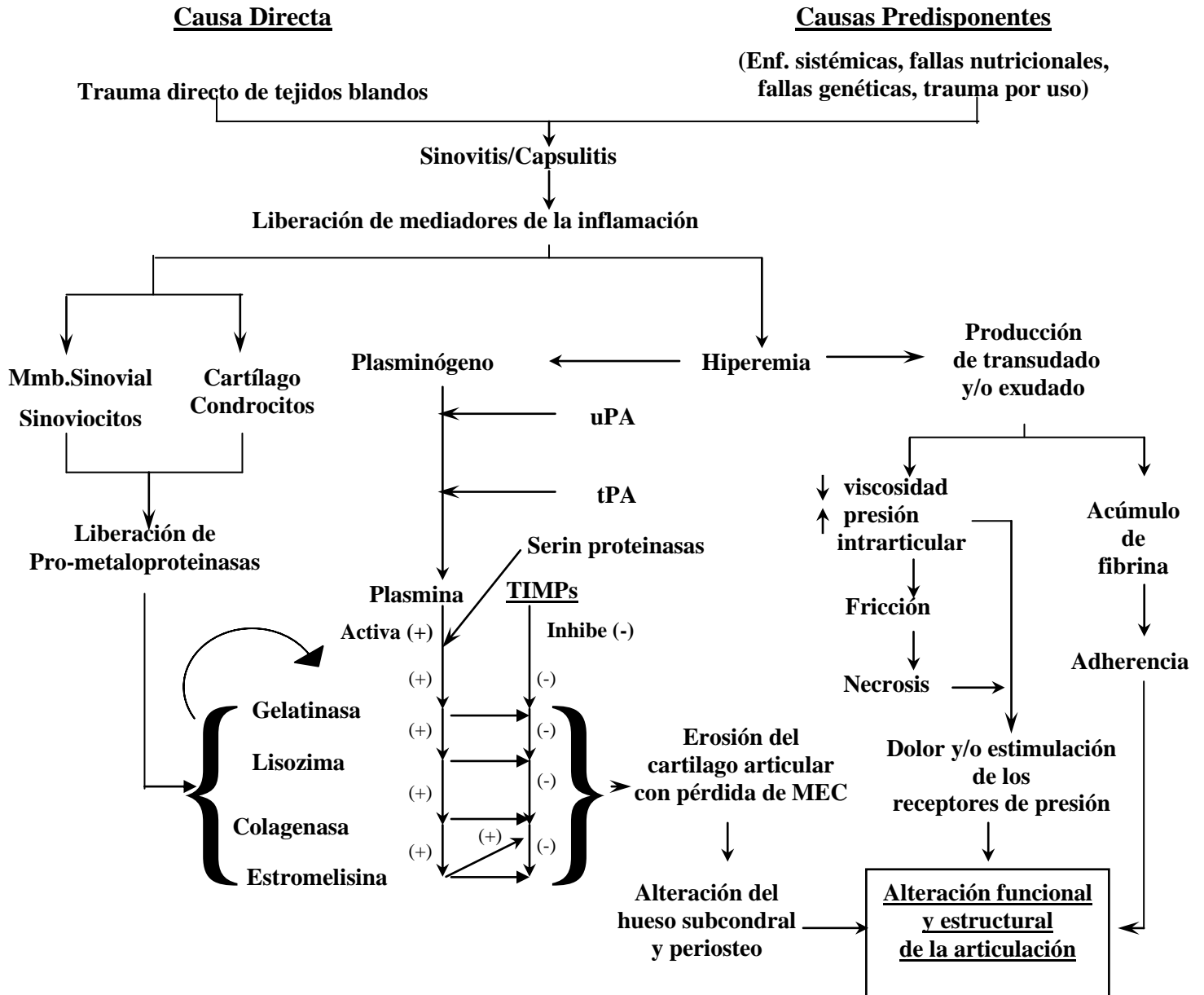
Las citoquinas son reguladores bioquímicos liberados por macrófagos, sinoviocitos y células de tejido conectivo, el cual puede estimular a condrocitos y sinoviocitos a producir y liberar enzimas degradativas (Kidd *et al.*, 2001).

Interleukina 1- β y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) son proteínas proinflamatorias, que participan y son de gran importancia en la degradación del cartílago articular. La IL-1 β estimula la degradación de las proteínas de matriz y estimula la acumulación de tejidos de degradación. El TNF- α parece conducir el proceso inflamatorio. Ambas sustancias inducen en células sinoviales y condrocitos a producir otras citoquinas y aumentar su propia producción, así como también estimular la producción de proteinasas y prostaglandina E2 (PGE-2). La PGE-2 puede actuar localmente en condrocitos para aumentar la producción de proteoglicanos, también puede activar y aumentar la síntesis o secreción de metaloproteinasas. Los condrocitos aumentan la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), y fosfolípasa A-2, cuando son estimulados por IL-1 α y TNF- α . Ambas, IL-1 α y TNF- α , parecen actuar a través de receptores específicos de superficie celular. Receptores de IL-1 α están concentrados en condrocitos y fibroblastos sinoviales, en cambio los receptores de TNF- α aparecen en las membranas de la mayoría de las células, excepto en células rojas sanguíneas (Pelletier *et al.*, 2001; Roush *et al.*, 2002).

En la patología articular, la pérdida de la MEC del CA es central para la patogénesis de la OA. La pérdida de los proteoglicanos y colágeno desde la matriz del cartílago articular ocurre primariamente por la actividad degradativa de las MMPs (Brandt y Mankin, 1986), como se puede apreciar en el esquema N° 1.

FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO ARTICULAR

(modificado de Palmer y Bertone, 1994)



6.- METALOPROTEINASAS

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} que pueden ser secretadas por diferentes células y tienen la capacidad de degradar todo tipo de proteínas extracelulares presentes en la matriz extracelular (MEC). Además pueden degradar otras proteínas de la superficie celular que no forman parte de la MEC. Su función es regular el comportamiento celular de distintas maneras, siendo parte de procesos fisiológicos y patológicos, abarcando aspectos tales como el desarrollo embrionario, reparación tisular, morfogénesis, enfermedades inflamatorias y el cáncer (Sternlicht y Werb, 2001).

Las MMPs presentan varias características en común, de acuerdo a lo descrito por Woessner (1994), Grez *et al.* (1997), Parsons *et al.* (1997), Gomez *et al.* (1997); Nagase y Woessner (1999) y Sternlicht y Werb (2001):

- Las MMPs son secretadas en forma de zimógeno (proenzima).
- La actividad catabólica de estas enzimas es dependiente de Zn^{+2} como cofactor en su centro activo y de Ca^{+2} como estabilizador de éste.
- Las MMPs se activan por cambios conformacionales o proteolíticos, provocados por proteinasas o por compuestos organomercuriales (APMA).
- La activación es acompañada por una pérdida de masa molecular aproximada de 10 KDa.
- Son inactivadas por una familia de TIMPs específicos que se unen fuertemente al sitio activo a través de uniones no covalentes.
- Las secuencias de ADNc muestran total homología con las de la colagenasa.
- Las enzimas activas degradan uno o más componentes de la MEC.
- Tienen residuos de ácido aspártico e histidina, esenciales en la actividad hidrolítica de las MMPs.
- Son regulados a distintos niveles en la transcripción y también por activación de las metaloproteinasas latentes (zimógenos) a su forma activa por acción proteolítica (plasmina, MMPs unidas a membrana).

Actualmente se conocen 25 MMPs, cuya función es la de degradar o procesar numerosos sustratos pericelulares (Sternlicht y Werb, 2001). De este conjunto solo se conoce la estructura génica de ocho y la localización cromosomal de siete de ellas (Woessner, 1994). Las MMPs se han clasificado en distintos grupos de acuerdo al sustrato específico sobre el cual actúan (Sternlicht y Werb, 2001). Las colagenasas (MMP 1, MMP 8 y MMP13) que son responsables de degradar la estructura de triple hélice de las fibras de colágeno I, II, III, VII, VIII y X. Las gelatinasas (MMP 2 y MMP 9) que degradan el colágeno denaturado o gelatina y también pueden degradar a los colágenos nativos tipos IV, V y VII. Las estromelisininas (MMP 3, MMP 10 y MMP 11) que degradan una variedad de sustratos de la matriz como son proteoglicanos, laminina y fibronectina, además activan las formas de las MMP 1,3,8,9 y 13. Las metaloproteinas unidas a membrana plasmática conocidas como MT-MMPs (MT-MMP 14, 15, 16 y 17), que poseen una secuencia transmembrana, las MT-MMP 14 y 15 además activan a las formas latentes (zimógeno o pro-enzima) de MMP 2 y MMP 13 (Uchida *et al.*, 2000). Por último, forman parte de un quinto grupo las MMPs 7,12,18,20,21,22,23,24,25,26,27 y 28 (Sternlicht y Werb, 2001).

Las colagenasas, gelatinasas y estromelisininas corresponden a las MMPs más representativas en el cartílago articular (Von Rechenberg *et al.*, 2000).

En el equino la MMP-2 o gelatinasa A es una proteína de 64 KDa en su forma de zimógeno y 59 KDa en su forma de enzima activa. Esta gelatinasa es secretada por condrocitos y células de membrana sinovial. La MMP-9 o gelatinasa B es una proteína de 94 KDa en forma de zimógeno y 85 KDa en forma de enzima activa (ambos como monómeros), además puede adoptar una forma de dímero con una masa molecular de 225 KDa, cuando MMP-9 está en exceso. Esta gelatinasa es producida por células inflamatorias, monocitos, polimorfos nucleares y también condrocitos. Estas enzimas degradan el colágeno del cartílago articular, gelatinasa, elastina, fibronectina, proteoglicanos como agregán y proteínas de unión del cartílago articular (Clegg *et al.*, 1997).

Es esencial que el control de la proteólisis por parte de las MMPs activas, pueda ser regulado para prevenir una destrucción incontrolable de la MEC (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

El control de las MMPs ocurre a 3 niveles distintos: 1) Síntesis y secreción; 2) Activación y 3) Inhibición (Birkedal-Hansen *et al.* 1993).

La síntesis y secreción es controlada por citoquinas (IL-1 y TNF- α), a medida que aumentan las citoquinas hay un aumento de las MMPs (Clegg y Carter, 1999).

Las MMPs al ser secretadas como zimógenos, en todos los casos de activación se requiere de la ruptura de la interacción Cys-Zn⁺² ("switch" de cisteína) y la remoción del propéptido, que constituye un paso clave en la activación. *In vivo*, la mayoría de las pro-matrixinas se activan posiblemente por proteinasas tisulares o plasmáticas o bien por proteinasas bacterianas oportunistas (Ogata y *et al.*, 1995; Nagase y Woessner, 1999).

La inhibición de la actividad puede ocurrir a nivel local por unas proteínas conocidas como inhibidores tisulares de las metaloproteinasa (TIMPs) (Clegg *et al.*, 1998). A nivel sistémico son controladas por la α -2 macroglobulina que inhibe todas las MMPs que están presentes en altas concentraciones en plasma y en baja concentración en fluido sinovial (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

7.- INHIBIDORES TISULARES DE METALOPROTEINASAS

Los TIMPs son inhibidores naturales de MMPs encontrados en muchos tejidos y fluidos corporales. Como reguladores de la actividad de las MMPs ellos participan en remodelación de tejidos de la matriz extra celular (MEC). El balance entre la actividad de MMPs y TIMPs esta envuelto en eventos normales y patológicos entre los cuales se encuentran procesos como la cicatrización, remodelación de tejidos, angiogénesis, tumorigénesis y metástasis (Petitfrère *et al.*, 2004).

Se ha demostrado en el líquido sinovial la presencia de inhibidores de metaloproteinasas, TIMP-1 y TIMP-2 (Clegg *et al.*, 1998; Richardson y Dodge, 1998). En 1987 en humanos se describió que los niveles de TIMPs siempre son más altos en el líquido sinovial que en el suero, indicando así la existencia de una síntesis local de los TIMPs dentro de la articulación (Cawston *et al.*, 1987).

La inhibición local está dada por los TIMPs que se producirían por una gran variedad de tipos de células y tejidos, tales como el cartílago articular y condrocitos, fibroblastos sinoviales reumatoides, fibroblastos de piel, leucocitos polimorfos nucleares, macrófagos alveolares, hueso y varias líneas de células tumorales. Se han identificado cuatro TIMPs (1, 2, 3 y 4), que tienen la capacidad del unirse a las MMPs activas formando un complejo no covalente en relación 1:1, causando una inhibición reversible de su actividad proteolítica (Clegg *et al.*, 1998; Visse y Nagase, 2003). Todos ellos tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de las MMPs, presentando diferencia entre ellos en aspectos como solubilidad, interacción con las proenzimas (pro-MMPs) y regulación de su expresión. TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-4 están presentes en forma soluble mientras que TIMP-3 esta sujeto fuertemente a la matriz. Los TIMPs tienen la capacidad de unirse a las pro-MMPs y por lo tanto regular el proceso de activación de las MMPs. Es así como TIM-1 forma un complejo de preferencia con pro-MMP-9, así como TIMP-2 se asocia con pro-MMP-2, TIMP-3 con pro-MMP-2 y pro-MM9, y TIMP-4 con pro-MMP-2, a través de su C-terminal. TIMP-2 y TIMP-3, a diferencia de TIMP-1, son también efectivos inhibidores de las metaloproteinasas de membrana (MT-MMPs) que contienen un dominio C-terminal transmembrana anclando las enzimas a la superficie celular. TIMP-3 también puede inhibir algunos miembros de la familia de proteasa con dominio metaloproteasa y desentigrina (ADAM), como son la enzima convertidora de factor de necrosis tumoral- α (ADAM 17) y agrecanasa (ADAMTS-4 y 5). Además, TIMP-3 y TIMP-1 pueden inhibir *in vitro* la actividad proteolítica de ADAM 10. La expresión de TIMP-1 es inducida por estímulos externos, mientras que la expresión de TIMP-2 es constitutiva (Visse y Nagase, 2003; Petitfrère *et al.*, 2004).

El TIMP-1 puede inhibir tanto a la MMP 9 como a la MMP 2, pero con una mayor preferencia hacia la MMP 9. Al igual que el TIMP-1, el TIMP-2 inhibe ambas MMPs, pero principalmente la MMP-2 (Clegg *et al.*, 1998).

Así como inhiben la forma activa, los TIMPs también pueden retardar la activación del zimógeno de las MMPs. El complejo MMP-2/ TIMP-2 puede ser separado por una enzima competente por el sitio activo, esto indicaría que el TIMP no está fijo al sitio activo. La MMP-9 se ha encontrado como homodímero, aunque en ausencia de TIMPs puede formar un heterodímero con MMP-1. El complejo MMP-9/ TIMP-1 también tendría un rol en la inhibición de MMP-3 (Clegg *et al.*, 1998).

Se ha mostrado que el complejo MMP-2/ TIMP-2 es una estructura protegida de la autodegradación enzimática. Por lo tanto los TIMPs tendrían un papel en el control de la proteólisis extracelular más amplio que la simple inhibición de las MMPs (Clegg *et al.*, 1998).

Los TIMPs son proteínas de 21-34 KDa los cuales poseen 12 residuos conservados de cisteína formando 6 puentes disulfuro (figura 3) que contribuyen a un plegamiento de la proteína formando dos dominios: uno C-terminal y el otro N-terminal (figura 4). El TIMP-1 y el TIMP-2 tienen una secuencia aminoacídica que presenta un 40% de homología entre ellos, especialmente en el dominio N-terminal. Esta región incluye la secuencia VIRAK (aminoácidos 18-22) conservada en todos los TIMPs (mostrado en amarillo en figura 4). La estructura cristalográfica tanto para TIMP-1 como para TIMP-2 muestra una apariencia de tipo esfenoïdal.

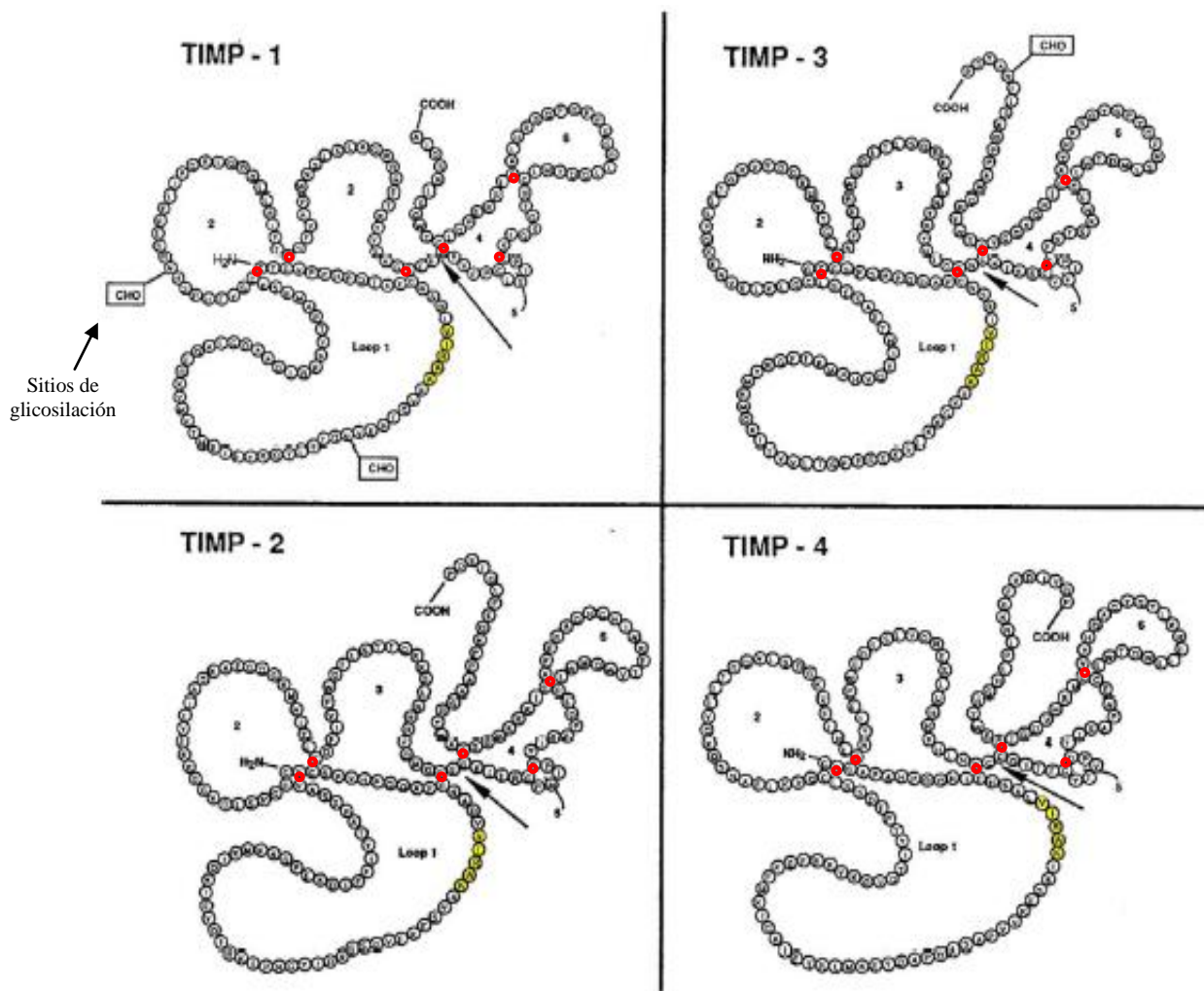


Figura 3. Estructura primaria de los TIMPs. Las cisteínas están unidas formando los puentes disulfuro (puntos rojos). La flecha indica la unión entre los dominios N- y C-terminal de las proteínas. En color amarillo se indica la secuencia VIRAK (Petitfrère *et al.*, 2004).

La molécula de TIMP contiene principalmente estructura de tipo β en ambos dominios y una región α -helicoidal central representando la interfase entre los dos dominios (Figura 4). El dominio N-terminal es fundamental en la interacción entre los TIMPs y MMPs. Se ha determinado que los residuos de aminoácidos que están alrededor del puente disulfuro cys1-cys70, son cruciales para la actividad inhibitoria, confirmando que el dominio N-terminal de los TIMPs contienen la actividad inhibitoria de las MMPs. El dominio C-terminal parece estar

probablemente involucrado en la formación de complejos con las proenzimas (Petitfrère *et al.*, 2004).

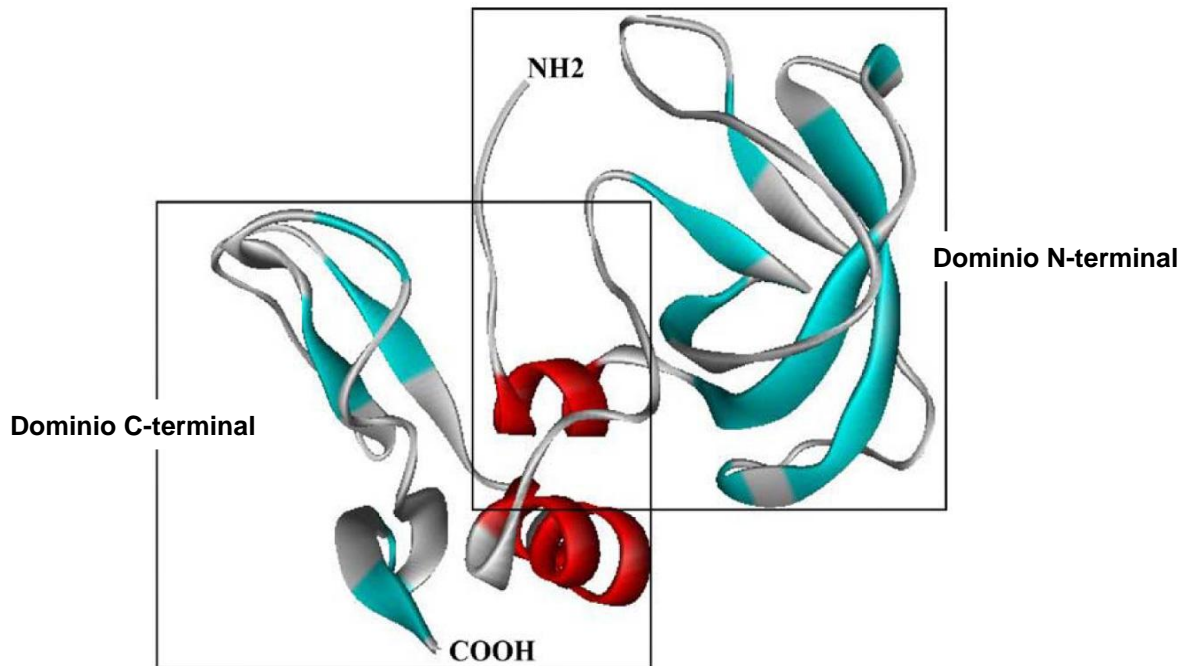


Figura 4. Estructura tridimensional del TIMP1. Puentes disulfuros y helices son mostradas en celeste y rojo respectivamente. Dominios N- y C- terminal de las proteínas (Petitfrère *et al.*, 2004).

El TIMP-1 ha sido aislado de diferentes especies, con una masa molecular que va de 28.5 a 34 KDa. La masa molecular varía debido a que esta proteína presenta sitios de N-glicosilación con oligosacáridos constituidos de ácido siálico, manosa, galactosa y N- acetilglucosamina. La glicosilación de todos los sitios disponibles no son siempre necesarios para la función del TIMP-1, jugando un rol en varias funciones tales como, el correcto plegamiento de la proteína naciente, el transporte de la molécula a la superficie celular y el aumento de su estabilidad (Petitfrère *et al.*, 2004).

III.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comparar los cambios en la cantidad relativa de TIMP-1 en líquido sinovial proveniente de articulación metacarpo falángica equina en condición normal y alterada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Estandarizar las mejores condiciones de detección de TIMP-1 en líquido sinovial normal de equino, empleando la técnica de “dot blot”.

2) Determinar la cantidad de TIMP-1 en las condiciones estandarizadas, presentes en líquido sinovial proveniente de articulación metacarpofalángica normal y alterada.

3) Comparar mediante densitometría la cantidad de TIMP-1 del líquido sinovial de las articulaciones metacarpofalángicas normales y alteradas, determinadas en el objetivo 2.

IV.- MATERIAL Y MÉTODO

Con la finalidad de establecer la técnica de “dot blot” para la detección del TIMP-1, se requirió estandarizar las condiciones de trabajo. Para esto, en una primera etapa se realizó la verificación del anticuerpo monoclonal anti TIMP-1 bovino con su control positivo (TIMP-1 bovino) preparado como se describe más adelante.

En esta etapa de estandarización de la técnica se observó una inespecificidad del anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) al utilizar líquido sinovial equino. Por esto, se optó por emplear una metodología más adecuada, el análisis de “western blot”.

1.- Material biológico:

Se utilizaron articulaciones metacarpofalángicas de equinos mestizos de edades de 2 a 12 años, beneficiados en el matadero Municipal de La Pintana. Las edades se estimaron mediante cronometría dentaria.

Las muestras articulares fueron trasladadas al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, a temperatura ambiente, en bolsas de polietileno. Posteriormente, fueron sometidas a artrocentesis, obteniendo LS de cada una de ellas. Esta extracción de líquido sinovial se realizó a nivel de los sacos volares, en condiciones asépticas (figura 6). Luego se realizó la disección de las articulaciones para su clasificación.

Las articulaciones se agruparon de acuerdo a la observación macroscópica, tanto de la membrana sinovial como del cartílago articular. En el primer grupo se consideraron aquellas que presentaron un cartílago articular de aspecto normal (de superficie lisa, brillante, de color blanco-nacarado) y su membrana sinovial sin signos de congestión (NN). En el segundo grupo se incluyeron aquellas articulaciones que presentaron un cartílago articular de aspecto normal y la membrana sinovial congestiva (NA). El tercer grupo fue constituido por aquellas articulaciones que presentaron el cartílago articular alterado (con líneas de roce

y/o focos de erosión o necrosis, y cambio en su coloración), mientras que la membrana sinovial tenía aspecto normal (AN). El cuarto grupo incluyó aquellas articulaciones que presentaron tanto el cartílago articular como la membrana sinovial alterados (AA) (figura 5). Cada uno de los grupos evaluados contó con un número de 10 muestras y cada una correspondió a una articulación. Se descartaron aquellas articulaciones que presentaron LS sanguinolento o presencia de hematomas.



Cartílago articular normal



Cartílago articular alterado



Membrana sinovial normal



Membrana sinovial alterada

Figura 5. Articulaciones metacarpofalángicas y su clasificación. Se puede apreciar las características del cartílago articular y de la membrana sinovial, normales y alteradas.



Figura 6. Punto de artrocentesis en la articulación metacarpofalángica. Indicado por la flecha.

2.- Procesamiento del líquido sinovial

El LS obtenido fue centrifugado a $1000 \times g$ por 20 minutos, para eliminar células, después fue alicuotado, rotulado y conservado a -20°C , para realizar la posterior medición de los TIMPs.

3.- Determinación de proteína:

Se determinó la concentración de proteínas totales de cada muestra de líquido sinovial utilizando el método espectrofotométrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Para realizar la curva de calibración de concentración de proteína se utilizó, como estándar, albúmina sérica bovina (BSA 1mg/ml), en el rango de $5 \mu\text{g}$ a $50 \mu\text{g}$ de proteína.

La absorbancia de las muestras de LS fueron leídas a 750 nm., en un espectrofotómetro UNICAM UV/Vis Spectrometer.

4.- Control positivo: TIMP-1 de pulpa de diente bovino

Dado que el anticuerpo monoclonal anti-TIMP-1 utilizado en este estudio, fue obtenido a partir de un antígeno de bovino, se procedió a preparar un control positivo de TIMP-1 mediante su extracción desde pulpa dentaria obtenida de un molar de bovino, faenado en el Matadero Municipal de la Pintana.

Se pesó 0,5 a 1 g de pulpa dentaria de bovino y se le adicionó, en una proporción 1:4, una solución amortiguadora, que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, ditioneitol (DTT) 0,5 mM, inhibidores de proteasas (leupeptin 2 mM, pepstatin 1mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM) y 2-β-Mercaptoetanol 12 mM. La preparación fue homogenizada utilizando un Ultraturrax a 13.000 r.p.m. 3 veces durante 15 segundos y luego fue centrifugada a 1000 x g por 20 minutos. Finalmente la fracción sobrenadante se alicuotó y almacenó a una temperatura de -20°C, para su uso posterior como TIMP-1 positivo.

5.- Detección de TIMP-1 mediante “dot blot”:

En cada celda de la cámara de “dot blot” (bio-dot®, numero de serie 84BR 27338) se colocó 30 µg de proteína por muestra de LS en membranas de PVDF (Inmun-Blot®, número de catálogo 162-0177, Bio-Rad®). Una vez cargadas las muestras, las membranas fueron bloqueadas por toda la noche a 4°C, en una solución de TBS-leche-tween 20 (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137mM, leche

descremada 6% y Tween 20® 0,05%), con el fin de evitar una interacción inespecífica de anticuerpos con proteínas contaminantes. A continuación las membranas fueron sometidas a 3 lavados con agitación, en una solución de TBS-tween 20 durante 10 minutos cada uno. Las membranas fueron incubadas durante 2 horas con un anticuerpo monoclonal anti-TIMP-1 (anticuerpo monoclonal, generado para TIMP-1 de bovino obtenido en ratón, número de catálogo IM32T, Oncogene®), en una solución TBS-leche-tween 20; cuya dilución fue de 1:1000. Posteriormente se realizó una segunda etapa de lavado con agitación como se describe en la etapa anterior. Luego se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación con un segundo anticuerpo anti-IgG de Ratón (Anticuerpo InmunoPure®, número de catálogo 31430, Pierce®), conjugado con peroxidasa HRP (Peroxidasa de Rabanito), en solución de TBS-leche-tween 20, cuya dilución fue de 1:10000. Finalmente se realizó una última etapa de lavado, para luego revelar con un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal®, número de catálogo 34080, Pierce®). La reacción positiva se evidenció por la presencia de puntos luminosos, cuya intensidad de luz estuvo en directa relación con la cantidad de TIMP-1 presente en la muestra. Luego, las membranas fueron expuestas durante 10 minutos a películas fotosensibles (CL-X Posure®, Pierce®), con el fin de registrar las diferencias de intensidad de luz de cada muestra. Posteriormente se realizó la determinación cuantitativa de la intensidad de los puntos, mediante un análisis densitométrico.

6.- Control del segundo anticuerpo por análisis de “dot blot”

Con el objetivo de verificar que el segundo anticuerpo sólo reconociera al anticuerpo anti-TIMP-1, se cargó 30 µg de proteína totales de cuatro muestras, tres de LS y una de homogeneizado de diente de bovino (control positivo), en membranas de PVDF utilizando una cámara de “dot blot”. Se aplicó la metodología descrita en el párrafo anterior, excepto la etapa de reacción del primer anticuerpo (anti TIMP-1).

7.- Detección de TIMP-1 mediante “western blot”

Con el propósito de detectar el TIMP-1 en el LS de equino por la metodología de “western blot”, se utilizó anticuerpo monoclonal anti-TIMP-1 de bovino y se determinó la masa molecular del TIMP-1 detectado.

Las muestras de líquido sinovial fueron sometidas a una electroforesis en condiciones reductoras y desnaturantes. Para esto se mezcló LS con una solución tampón logrando una concentración final de Tris-HCl 33 mM pH 6,8, SDS al 10%, glicerol al 1%, azul de bromofenol al 0,005% y β -Mercaptoetanol 700 mM. Esta mezcla se sometió a ebullición por 5 min a baño maría. Se agregó 50 μ g de proteína total de cada muestra de líquido sinovial. La electroforesis se realizó utilizando un gel separador de poliacrilamida al 12% y un gel concentrador al 5 %, a un voltaje constante de 150 volt durante 90 minutos. En cada gel se usó una mezcla de marcadores de masa molecular comercial, desde 20,7 a 103 KDa (Estándar de bajo rango, número de catálogo 161-0305, Bio-Rad®).

A continuación, las proteínas separadas en los geles, fueron transferidas a membranas PVDF, por medio de una electrotransferencia, que se realizó a 0.4 A constante por 2 horas. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas por una hora, en una solución TBS-leche-tween 20. Luego fueron sometidas a tres lavados consecutivos en agitación, cada uno de 10 minutos de duración en una solución TBS-tween 20, para luego ser incubadas durante toda la noche con el anticuerpo anti-TIMP-1 en una dilución entre 1:250 a 1:1000 en una solución de TBS-leche-tween 20. Posteriormente se realizó una segunda etapa de lavado de las mismas características del anterior y se incubaron las membranas durante 2 horas en agitación con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa de rabanita, en solución TBS-leche-Tween 20, cuya dilución es de 1:10000. Finalmente se realizó una última etapa de lavado, para luego revelar con un sustrato tal como se describió en materiales y métodos (sección 5).

8.- Control del segundo anticuerpo por análisis de “western blot”

Con la finalidad de determinar el grado de interferencia de las proteínas de equino se realizó una prueba de segundo anticuerpo ocupando la técnica de “western blot”.

Al igual que en el ensayo de determinación de TIMP-1 por “western blot”, se realizó la misma metodología, siguiendo los mismos pasos y ocupando las mismas soluciones, pero a diferencia, en este ensayo solo se incubó con el segundo anticuerpo.

9.-Determinación de masa molecular de TIMP-1

Se estimó la masa molecular del TIMP-1 a través de la comparación de su movilidad relativa (R_f) con las movilidades relativas de una mezcla de proteínas estándar de masa molecular conocida, utilizando el método de “western blot”.

10.- Densitometría

La densitometría permitió realizar una estimación cuantitativa del TIMP-1 presente en el líquido sinovial de los cuatro grupos. Para ello cada film fotosensible fue escaneado y analizado mediante el programa computacional UNISCAN-IT gel versión 4.1 (Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile), el cual cuantificó el número de pixeles (unidades densitométricas) de cada banda o punto correspondiente a cada muestra.

11.- Análisis de los datos:

El número de píxeles obtenido para cada grupo fue expresado como un promedio más su desviación estándar.

Para determinar diferencias en los promedios de los grupos estudiados, se aplicó primero un “Análisis de Varianza” para determinar la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) y posteriormente se aplicó la prueba de “Student-Newman-Keuls” para saber que media de los grupos difiere de las otras.

V.- RESULTADOS

Con el objeto de detectar la presencia del TIMP-1 en el líquido sinovial se realizó un “dot blot” utilizando anticuerpos monoclonales anti-TIMP-1, extraído de pulpa de diente bovino.

Estos anticuerpos comerciales fueron preparados en ratón contra un epitopo del TIMP-1 bovino.

En una primera etapa se determinó la dilución óptima del primer anticuerpo (anti-TIMP-1). Las muestras de líquido sinovial nativo y hervido fueron incubadas con 3 diluciones distintas del anticuerpo anti-TIMP-1, estas diluciones fueron de 1:250, 1:500, 1:1000. Por otra parte, se evaluó si el epitopo reconocido por el anticuerpo anti-TIMP-1 se alteraba al desnaturalizar la muestra aplicando calor. Puesto que ambos tipos de muestras de líquido sinovial no presentan diferencia en su reacción con el anticuerpo anti-TIMP-1, se optó por ocupar la dilución 1:1000 en las otras pruebas de estandarización (figura 7).

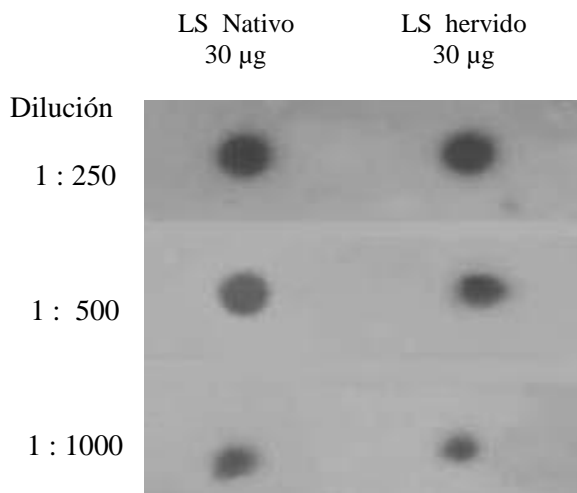


Figura 7. Efecto del calor sobre la reacción de la presencia de TIMP-1 en LS y determinación de la dilución óptima del primer anticuerpo (anti-TIMP-1), usando “dot blot”. Se usó la misma muestra de líquido sinovial normal, la que también fue hervida. Ambas fueron incubadas en 3 diluciones distintas utilizando la misma cantidad de proteína. LS = líquido sinovial; µg = microgramo.

Al variar la concentración del segundo anticuerpo usando dos diluciones, 1:7500 y 1:10000, no se observan cambios de importancia en la intensidad del punto.

Para establecer la cantidad óptima de proteína a cargar por muestra, para el método de “dot blot”, se cargaron 3 muestras tomadas al azar de muestras normales, en cantidades ascendentes de proteínas totales (10, 20, 30, 40, 50 y 60 μg de proteína), con el propósito de determinar la intensidad de los puntos, medidos en pixeles, en el rango de las concentraciones utilizadas (figura 8).

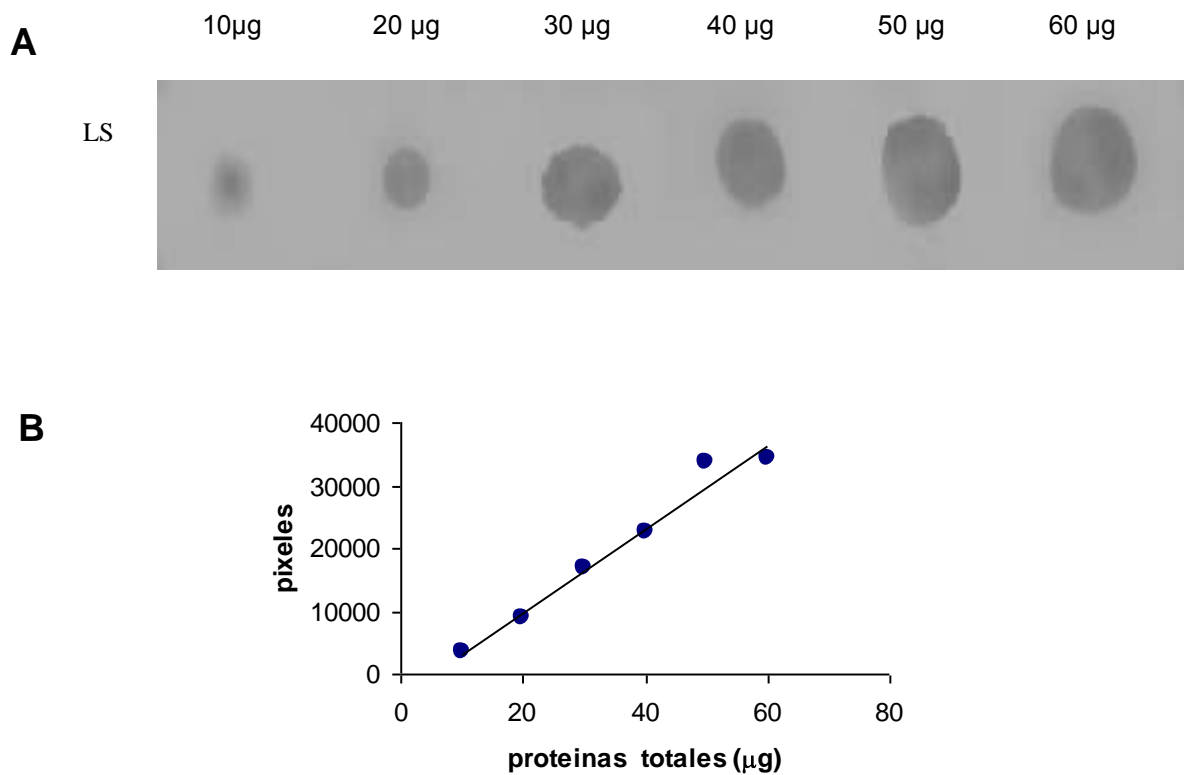


Figura 8. Efecto del uso de cantidades crecientes de proteínas de LS para la detección de TIMP-1, por “dot blot”. (A) “dot blot” de TIMP-1, con una dilución del primer anticuerpo de 1:1000. LS = líquido sinovial; μg = microgramos. (B) Relación entre cantidad de proteínas totales y la intensidad de la fluorescencia expresada como pixeles.

En la figura 8A se observa la señal positiva al cargar distintas concentraciones de proteínas del líquido sinovial con una dilución de 1:1000 del primer anticuerpo. En la figura 8B se concluye que el rango lineal de señal positiva (píxeles) está entre 10 y 40 μg de proteína del líquido sinovial, determinando que 30 μg es la cantidad de proteína por muestra más apropiada para determinar la presencia de TIMP-1.

Al probar el anticuerpo anti TIMP-1 con su antígeno, obtenido de pulpa de diente de bovino (PB), en paralelo con una muestra de LS, se observó reacción positiva en ambos casos (figura 9A). En otra preparación las mismas muestras se sometieron a la prueba de segundo anticuerpo. Se demostró que las muestras de líquido sinovial presentaban una reacción inespecífica, ya que se pudo observar que la reacción positiva al control se evidencia en la primera etapa y que al probar con el segundo anticuerpo sólo reacciona con el líquido sinovial (figura 9B).

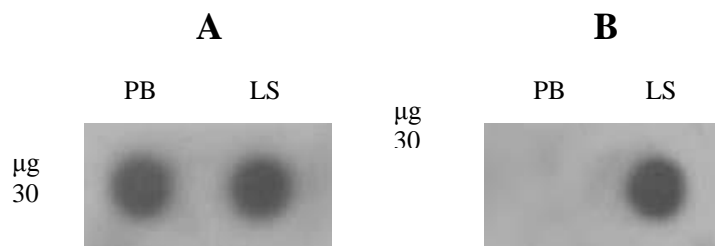


Figura 9. Control de segundo anticuerpo por “dot blot”. Se cargaron 30 μg de pulpa de diente bovino (PB) y líquido sinovial equino (LS) normal. En “A” se muestra un “dot blot” incubado secuencialmente con el primer y segundo anticuerpo que dió positivo tanto para LS como para PB. En “B” se cargaron las mismas muestras que en “A”, pero se incubaron sólo con el segundo anticuerpo, dando positivo para LS.

Esto indica que el segundo anticuerpo reconoce proteínas del LS, lo cual constituye una interferencia al método de detección del TIMP-1 equino.

En una primera etapa se consideró realizar la detección de TIMP-1 mediante la técnica de “dot blot” por su rapidez y menor costo. Sin embargo, en el curso de los experimentos en la adaptación de la técnica, al realizar el control del segundo anticuerpo se determinó que el líquido sinovial presentaba una o más proteínas interferentes (figura 9). A fin de evitar la interferencia se optó por separar a las proteínas respecto a su masa molecular, a través de la técnica de “western blot” para poder detectar el TIMP-1 independiente de las proteínas interferentes.

Las variables consideradas en los experimentos de montaje y optimización del “dot blot”, en cuanto a la condición de revelado de la señal positiva (tiempo de incubación y diluciones adecuadas de anticuerpos), se utilizaron para el “western blot”.

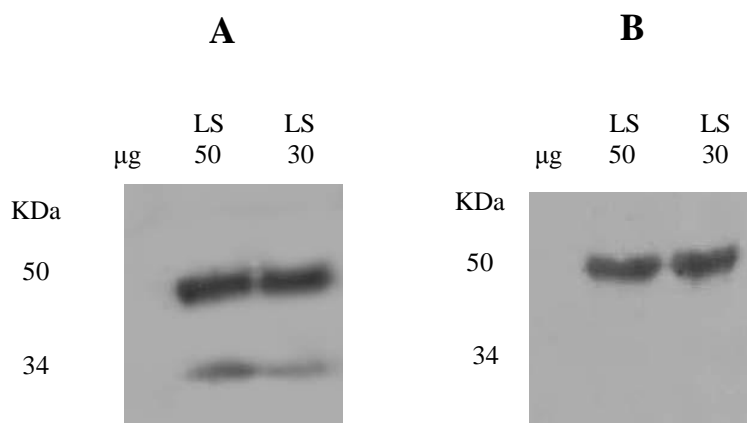


Figura 10. Control de segundo anticuerpo por “western blot”. En “A” se muestra un “inmuno “western blot”” incubado secuencialmente con el primer y segundo anticuerpo. En “B” se cargaron las mismas muestras que en “A”, pero se incubaron sólo con el segundo anticuerpo. En ambas se cargaron dos concentraciones de la misma muestra de líquido sinovial (LS).

En la figura 10 se muestra una banda con un peso aproximado de 34 KDa, que correspondería al TIMP-1. Sin embargo, el segundo anticuerpo reconoce a una proteína con un peso aproximado de 50 KDa que correspondería a la que

interfiere en la técnica de “dot blot”. Por esta razón fue necesario analizar las muestras de LS mediante la técnica de “western blot” para analizar sólo la banda de 34 KDa.

Se requirió determinar la mejor condición en relación al tiempo de electrotransferencia, la que fue de 0,4 A constantes por 2 horas, con el objetivo de asegurarse de no perder la molécula de TIMP-1 equino.

En el análisis de “western blot” se observaron dos bandas en todas las muestras estudiadas, una de un peso molecular aproximado de 50 KDa correspondiente a una proteína inespecífica que reaccionaba con el segundo anticuerpo y otra banda de 34 KDa (figura 11). Para la comparación entre los distintos grupos de muestras se realizó la densitometría a las bandas de 34 KDa, que corresponderían al TIMP-1.

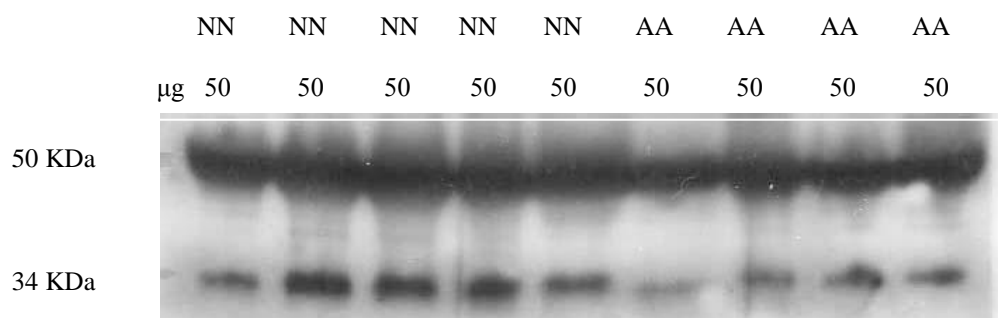


Figura 11. Determinación de TIMP-1 por medio del ensayo de “western blot”, representativo de las 40 muestras analizadas. La banda de 34 KDa. correspondería al TIMP-1. Se usó 50 µg de proteína por cada muestra. NN : CA y MS normales, AA : CA y MS alteradas.

Como resultado se obtuvo que los niveles de TIMP-1 en las muestras que tenían el cartílago articular normal y la membrana sinovial normal (NN) eran superiores (estadísticamente significativas), a los niveles de TIMP-1 en las muestras que presentaban el cartílago alterado y la membrana sinovial normal

(AN), el cartílago articular normal y la membrana sinovial alterada (NA) y las muestras que presentaban el cartílago articular alterado y la membrana sinovial alterada (AA). No se encontró una diferencia significativa entre los grupos NA, AN y AA (tabla 1).

En la tabla 1 se muestran estos resultados y en la figura 12 se representan gráficamente.

Tabla 1.

Medición del TIMP-1 en LS de articulaciones metacarpo falángica normales y alteradas de equinos

Clasificación de muestras	Nº de muestras	Píxeles promedio	Desviación estandar
NN	10	23017 a	9978
NA	10	13216 b	5159
AN	10	13564 b	7286
AA	10	11317 b	3340

Se expresan los resultados en píxeles, con su desviación estandar para cada grupo en estudio. Diferencias estadísticamente significativas, se representan por letras diferentes (a y b). NN = cartílago Articular normal y la membrana sinovial normal; NA = cartílago normal y la membrana sinovial alterada; AN = cartílago alterado y la membrana sinovial normal; AA = cartílago alterado y la membrana sinovial alterada.

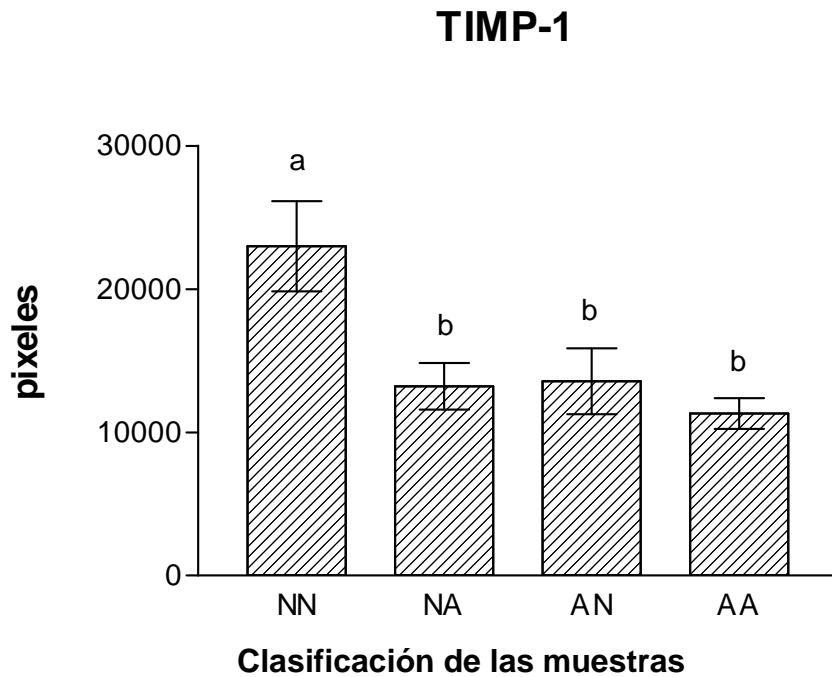


Figura 12. Cantidad relativa de TIMP-1 en L.S. de articulaciones normales y alteradas de equino, con su desviación estándar. NN = cartílago Articular normal y la membrana sinovial normal; NA = cartílago normal y la membrana sinovial alterada; AN = cartílago alterado y la membrana sinovial normal; AA = cartílago alterado y la membrana sinovial alterada. Las letras a y b representan diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

En este estudio, como primera etapa, se establecieron las mejores condiciones de trabajo para la detección de TIMP-1 en líquido sinovial al usar la técnica de “dot blot”, considerando distintas variables. Una de las variables evaluadas fue la concentración del primer anticuerpo a utilizar, de modo que permitiera observar una señal positiva con la mínima concentración posible del anticuerpo. Esto es debido al costo relativamente alto que involucra este tipo de experimentos. La dilución adecuada del primer anticuerpo para el objetivo deseado fue de 1: 1000. Al mismo tiempo se evaluó si el epitopo del TIMP-1 reconocido por el primer anticuerpo, se pierde al desnaturalizar la proteína con la aplicación de calor. Como se muestra en la figura 8, no se alteró la señal positiva si se hierva la muestra de LS durante 5 minutos. Esto sugiere que existiría una gran estabilidad en la señal positiva de TIMP-1 en una muestra de LS en las condiciones habituales de manipulación en el laboratorio.

La señal positiva se establece por la presencia de un punto negro en un film fotográfico cuya intensidad debe ser directamente proporcional a la cantidad de TIMP-1 presente en la muestra de LS. Existen al menos dos factores que influyen en la optimización de la intensidad de la señal positiva en esta metodología: a) una intensidad muy alta de la señal fluorescente generada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo, lo que satura el film fotográfico; b) un valor muy alto en intensidad del punto en el film fotográfico, produce una saturación en la lectura de píxeles por parte del programa computacional. Por lo tanto, considerando estos factores se estableció que existe un rango de proteínas totales de LS a cargar en el “dot blot” entre 10 y 60 μg en las condiciones de revelado estandarizadas en el laboratorio.

Para tener un control positivo de TIMP-1, se preparó un extracto de pulpa de diente bovino, especie con la cual se preparó el anticuerpo monoclonal empleado en esta memoria. Cabe mencionar que el anticuerpo anti-TIMP-1 específico para equino no está disponible a nivel comercial. El ensayo de “dot blot” mostrado en la figura 10A muestra que existe una señal positiva tanto del

extracto de pulpa de diente bovino como del LS. Sin embargo, al incubar en paralelo las mismas muestras sólo con el segundo anticuerpo, se observó una señal positiva en el LS. Esto implica que existe una o más proteínas en el LS que interfieren con la detección del TIMP-1 en equino. En otros ensayos en que se realizó este control de segundo anticuerpo, como parte de otros estudios realizados en nuestro laboratorio, empleando el mismo segundo anticuerpo con muestras de tejidos de sistema nervioso de gato (corteza cerebral y cerebelo) y muestras de ovas de salmón, no se observó esta reacción inespecífica que presenta el LS equino (datos no mostrados). En un intento de eliminar la proteína que origina la reacción inespecífica, se optó por desarrollar este estudio utilizando la técnica de “western blot” que permite una separación electroforética de las proteínas del LS, previo a la detección y revelado con los anticuerpos. De esta manera se pudo detectar dos bandas positivas: de 50 KDa y 34 KDa. En un experimento paralelo incubando sólo con el segundo anticuerpo apareció en forma única la banda de 50 KDa. A la luz de estos resultados, es posible emplear la técnica de “western blot” para la detección del TIMP-1 descartando el efecto de la proteína interferente. De acuerdo a la masa molecular la banda de 34 KDa correspondería al TIMP-1 de equino glicosilado (Petitfrère *et al.*, 2004).

La técnica de “western blot” requirió considerar otras variables a optimizar, como son el tiempo y el amperaje de electrotransferencia, los cuales después de algunos experimentos se establecieron como 2 horas y 400 mA respectivamente. En estas condiciones se transfirieron todas las proteínas en el rango de masa molecular bajo (menor que 100 KDa) que incluye al TIMP-1. Esto fue corroborado realizando una electrotransferencia con doble membrana de PVDF, no detectándose señal positiva en la segunda membrana. Además al teñir el gel posterior a la transferencia, con azul de Coomassie (reactivo utilizado para detectar proteínas), no se detectaron bandas correspondientes a péptidos, lo que indica que se transfirieron a la membrana PVDF.

Debido a que la etapa de revelado de la membrana de PVDF con los anticuerpos en la técnica de “dot blot” y “western blot” son similares, se aprovecharon las condiciones de trabajo establecidas con la primera técnica.

En relación a la señal positiva de 34 KDa, si bien muchos autores han descrito TIMP-1 como una proteína de peso molecular de 28 KDa, esta puede corresponder a su forma glicosilada, como lo describen otros autores, con un peso molecular alrededor de 34 KDa (Petitfrère *et al.*, 2004). Como se menciona en la literatura, las glicosilaciones presentes en los TIMPs no afectarían su capacidad inhibitoria sobre las MMPs, por lo cual es válido medir el TIMP-1 en su forma glicosilada (Petitfrère *et al.*, 2004). En esta memoria de título se detectó solo la forma glicosilada y no la presentación del TIMP-1 de 28 KDa ya que esta, se presentó sólo en una de las cuarenta muestras incluidas en el estudio. El hecho que se haya presentado en la casi totalidad de las muestras del estudio sólo la forma glicosilada, se podría atribuir a que el anticuerpo anti-TIMP-1 podría estar dirigido a un epitopo específico ubicado en sitio de glicosilacion del TIMP-1, lo cual podría ser dilucidado con otros estudios, tales como el tratar las muestras con una enzima glicosidasa y luego evaluar si se pierde la señal positiva. El fabricante del anticuerpo no especifica el epitopo que reconoce en la molécula de TIMP-1 bovino.

Las diferencias encontradas en este estudio son estadísticamente significativas entre las muestras normales y alteradas, lo que nos demuestra que en las articulaciones normales los niveles de TIMP-1 son más altos en comparación con las articulaciones que tienen algún grado de osteoartritis. Dentro de los cuatro grupos de clasificación, aquellas muestras de LS que al menos presentaban una característica alterada o ambas (NA, AN y AA) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre si en cuanto a la cantidad de TIMP-1 presente. Esto nos indicaría que sin importar el tejido alterado dentro de la articulación (CA o MS) los niveles de TIMP-1 presentes serían menores en comparación con articulaciones normales.

Es fundamental recordar que el TIMP tiene la capacidad de unirse a las MMPs activas formando un complejo no covalente en relación 1 : 1 causando una inhibición reversible de su actividad proteolítica (Clegg *et al.*, 1998; Visse y Nagase, 2003). En este estudio no se consideró la determinación de la actividad metaloproteinásica, lo que permitiría establecer un balance del estado degradativo

del cartílago, por lo tanto, por sí solo el TIMP-1 no sería un buen marcador molecular de la osteoartritis, ya que se debe medir en relación a su metaloproteinasa específica para ser más certero.

En un estudio paralelo usando las mismas muestras de LS, se analizó la actividad gelatinasa (MMP-2 y MMP-9). Como resultado se encontró que la principal actividad correspondió a la MMP-2 (pro-enzima) la que no cambio en los grupos estudiados (Urbina, 2005). A la luz de la relación de los niveles de MMPs/TIMPs, pareciera ser que dentro de la patología de la osteoartritis, es fundamental la relación de ellos, ya que si se pierde el balance entre proteasas e inhibidores podríamos estar frente a un cuadro patológico. Sin embargo, no son los únicos participantes en el proceso osteoartítico, siendo de gran importancia también otras proteasas y sus inhibidores.

En futuros estudios, sería de interés poder determinar si existe correlación entre los niveles de TIMP-1, presente en LS, en comparación con los niveles plasmáticos de este, en equinos con daño articular y sin daño articular. Esto permitiría evaluar o estimar el daño articular sin necesidad de invadir la articulación.

Actualmente se están desarrollando estudios sobre el balance entre las MMPs y los TIMPs a nivel mundial, pero en lo que respecta a la especie equina no se ha informado de avances recientes.

CONCLUSIONES

- En el presente estudio se logró detectar la presencia de TIMP-1 en LS de articulaciones normales o alteradas de equinos y probablemente correspondería a su forma glicosilada.
- Existe una diferencia significativa entre cantidad de TIMP-1 presente en líquido sinovial proveniente de articulación metacarpo falángica equina en condición normal y alterada, presentándose en mayor cantidad en articulaciones en condición normal.
- El ensayo de “western blot” es un mejor método para la detección del TIMP-1 en el LS equino que el ensayo de “dot blot”, al menos con los anticuerpos utilizados en este trabajo.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- **BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J.A.** 1993. Matrix metalloproteinases. A review. *Crit. Rev. Oral. Biol. Medicine.* 4: 197-250.
- **BRANDT, K.D.; MANKIN, H.J.** 1986. Workshop on the etiopathogenesis de osteoarthritis. *J.Rheum.* 13: 1126-1160.
- **BYARS, T.D.; BROWN, C.; BEISEL, D.** 1982. Equine Arthrocentesis. *Equine Pract.* 4 (2): 28-32.
- **CAWSTON, T.E.; MCLAUGHLIN, P.; HAZLEMAN, B.L.** 1987. Paired serum and synovial fluid values of alpha 2-macroglobulin and TIMP in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 26: 354-358.
- **CLEGG, P.D.; BURKE, R.M.; COUGHLAN, A.R.; RIGGS, C.M.; CARTER, S.D.** 1997. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joint. *Equine Vet. J.* 29 (5): 335-342.
- **CLEGG, P.D.; COUGHLAN, A.R.; CARTER, S.D.** 1998. Equine TIMP-1 and TIMP-2: Identification, activity and cellular sources. *Equine Vet. J.* 30 (5): 416-423.
- **CLEGG, P.D.; CARTER, S.D.** 1999. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases. *Equine Vet. J.* 31 (4): 324-330.
- **GOMEZ, D.E.; ALONSO, D.F.; YOSHIJI, H.; THORGEIRSSON, U.P.** 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 74 (2):111-122.
- **GONZÁLEZ, E.; ADARMES, H.** 1990. Osteoarthritis: una patología de la matriz extracelular. *Av. Cs. Vet.,* 5: 7-11.
- **GREZ, R.; GUARDA, E.; ACEVEDO, C; IRARRÁZAVAL, M.** 1997. Actividad de metaloproteinasas de arterias y venas y su regulación mediante doxiciclina. *Rev. Méd. Chile.* 125: 7-15.
- **HAM, A.** 1975. Articulaciones. **In:** Tratado de Histología, 7ª Ed. Editorial Interamericana, México. pp.418-433.

- **KIDD JA; FULLER C; BARR ARS.** 2001. Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education*; 13(3): 160-168.
- **LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M.** 1993 *Principios de Bioquímica*. 2ª Ed. Editorial Omega S.A., Barcelona, España. Pp. 312-315.
- **LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- **MAROUDAS, A.** 1976. Transport of solutes through cartilage: Permeability to large molecules. *J. Anat.* 122: 335-347.
- **McILWRAITH, C. V.** 1987. Disease of joint, tendons, ligaments, and related structures. In: Adams, O.; Stashak, T. *Adam's Lameness in Horses*. Eds: Lea & Febiger. Philadelphia, USA. pp. 339-438.
- **McILWRAITH, C. V.** 1996. General pathobiology of the joint and response to injury. In: McIlwraith, C.V.; Trotter, G. W. *Joint disease in the horse*. Eds: W. B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 40-69.
- **NAGASE, H.; WOESSNER, J.F.Jr.** 1999. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 274 (31): 21491-21494.
- **OGATA, Y.; ITOH, Y.; NAGASE, H.** 1995 Steps Involved in Activation of the Pro-matrix Metalloproteinase 9 (Progelatinase B)-Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Complex by 4-Aminophenylmercuric Acetate and Proteinases. *J. Biol. Chem.* 270 (31): 18506-18511.
- **PALMER, J.L. ; BERTONE, A.L.** 1994. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet. J.* 26 (4): 263-277.
- **PARSONS, S.L.; WATSON, S.A.; BROWN, P.D.; COLLINS, H.M.; STEELE, R.J.C.** 1997 Matrix metalloproteinases. *Br. J. Surg.* 84:160-166.
- **PELLETIER J.P.; MARTEL-PELLETIER J.; ABRAMSON S. B.** 2001. Osteoarthritis, an Inflammatory Disease. *Am. Coll. of Rheum.* 44: 1237-1247.
- **PETITFRÈRE E.; HAYE B.; DASSÉ E.; LAMBERT E.** 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Critical reviews in oncology/hematology* 49: 187-198.

- **POOL R.R.; MEAGHER D. M.** 1995. Hallazgos patológicos y patogénesis de las lesiones en las pistas de carrera. **In:** Goodman N.L. Clínicas veterinarias de Norte América, Práctica en las pistas de carrera. Editorial Inter-médica. Buenos Aires, Argentina. pp. 1-39.
- **RICHARDSON, D.W.** 1998. Enfermedad degenerativa articular **In:** Colahan P.; Mayhew I.; Merrit A.; Moore J. Medicina y cirugía equina. 4^{ta} ed. Editorial Inter-médica. Buenos Aires, Argentina. pp. 1118-1122.
- **RICHARDSON, D.W.; DODGE, G.R.** 1998. Molecular characteristics of equine stromelysin and the tissue inhibitor of metalloproteinase 1. Am. J. Vet. Res. 59 (12): 1557-1562.
- **ROUSH J.K.; McLAUGHLIN R.M., RADLINSKI M. A. G.** 2002. Understanding the pathophysiology of osteoarthritis. Vet. Med. Pp: 108-117.
- **SISSON, S.B.; GROSSMAN, J.D.** 1994. Anatomía de los animales domésticos. 5^a Ed. Editorial Salvat. Barcelona, España. p. 952.
- **STERNLICHT, M.D.; WERB, Z.** 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 17: 463-516.
- **TODHUNTER, R.J.** 1996. Anatomy and physiology of sinovial joint. **In:** McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. Joint disease in the horse. Eds: W.B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp 1-28.
- **UCHIDA, M.; SHIMA, M.; SHIMOAKA, I.; FUJIEDA, A.** 2000. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by bone resorptive factors in osteoblastic cells. J.Cell Physiol. 5: 207-214.
- **URBINA, A.** 2005. Comparación de la actividad gelatinasica A y B, MMP-2 y MMP-9 en el líquido sinovial proveniente de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. Tesis de grado para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 53p.
- **VISSE R., NAGASE H.** 2003. Matrix Metaloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Circulation Research. 92(8):827-839.
- **VON RECHENBERG, B.; McILWRAITH, C.W.; AKENS, M.K.; FRISBIE, D.D.; LEUTENEGGER,C.; AUER, J.A.** 2000. Spontaneous production of

nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE₂) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Equine Vet. J.* 32(2): 140-150.

- **WOESSNER, J.F.,Jr.** 1994. The Family of Matrix Metalloproteinases. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 732: 11-21.