



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

**Evaluación de la actividad de la metaloproteinasa-2 y detección del
inhibidor tisular TIMP-1 en líquido sinovial de la articulación
metacarpofalángica equina macroscópicamente normal con diferentes
recuentos celulares.**

Gladys Fernanda Flores Debia

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

PROFESOR GUÍA: MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2016



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

Evaluación de la actividad de la metaloproteinasa-2 y detección del inhibidor tisular TIMP-1 en líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina macroscópicamente normal con diferentes recuentos celulares.

Gladys Fernanda Flores Debia

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: DR. MARCO GALLEGUILLOS C.
PROFESOR CONSEJERO	: DR. HÉCTOR ADARMES A.
PROFESOR CONSEJERO	: DR. GUSTAVO FARÍAS R.

SANTIAGO, CHILE
2016

ÍNDICE

Resumen	iii
Summary	iv
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	
Componentes de la articulación metacarpofalángica equina: Cápsula articular	3
Componentes de la articulación metacarpofalángica equina: Cartílago articular	5
Componentes de la articulación metacarpofalángica equina: Líquido Sinovial	8
Osteoartritis Equina	8
Metaloproteinasas	10
Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas	11
Objetivos	
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Material y Métodos	
Material biológico	14
Recuento de células nucleadas en líquido sinovial	14
Determinación de proteínas totales en líquido sinovial	15
Determinación de la actividad de la MMP-2	15
Análisis de cartílago articular	15
Detección de TIMP-1 en el líquido sinovial	16
Control del segundo anticuerpo en el líquido sinovial	17
Análisis estadístico	17
Resultados	
Análisis del líquido sinovial	18
Determinación de la actividad de la MMP-2	18
Análisis Histológico	20
Prueba de control del segundo anticuerpo	21
Western Blot del líquido sinovial	22

Discusión	23
Conclusiones	26
Bibliografía	27
Tablas y figuras	
Tabla 1	7
Tabla 2	18
Tabla 3	19
Tabla 4	19
Figura 1	19
Figura 2	21
Figura 3	22

RESUMEN

La osteoartritis (OA) es la enfermedad articular de mayor frecuencia de presentación en los equinos. Independiente de la causa de origen, uno de sus componentes más importantes es el cuadro inflamatorio, que puede comprometer al cartílago, membrana sinovial, cápsula articular o hueso subcondral. Esto genera la liberación de mediadores inflamatorios alterándose el metabolismo articular e inhibiéndose la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (MEC) del cartílago y de la membrana sinovial. Este desbalance en el recambio de la matriz, provocado por la pérdida de regulación de la síntesis y de la actividad de las metaloproteinasas y de sus inhibidores, provoca la pérdida gradual de componentes de la MEC del cartílago, lo que conduce finalmente al desarrollo de la OA.

En esta memoria de título se estudió la actividad de la metaloproteinasa-2 (MMP-2) y la presencia del inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1), con el fin de establecer las posibles relaciones con los indicios prematuros de daño o alteración articular.

Para este estudio se utilizaron 20 articulaciones metacarpofalángicas de equinos mestizos, beneficiados en el matadero “La Pintana”. Se obtuvo líquido sinovial mediante artrocéntesis aséptica en el cual se midió el recuento total de células nucleadas (RCN) y la cantidad de proteínas totales con el fin de seleccionar muestras que tuvieran rangos fisiológicos o levemente aumentados. Se formaron dos grupos: A (n=10) articulaciones macroscópicamente normales con RCN < 1000 por μL y B (n=10) articulaciones macroscópicamente normales con RCN > 1000 por μL . Se realizó una artrotomía y se extrajo muestras de cartílago articular para análisis histológico en cada muestra.

El grupo B presentó un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de grupos isógenos. Este resultado permitió establecer que existe un inicio de OA temprana. En ambos grupos se detectó la pro-MMP-2 no existiendo diferencias en su cantidad. La presencia del TIMP-1 no se pudo evidenciar a través de la técnica de “Western Blot”, debido a la interferencia que presentaba el segundo anticuerpo y no pudo ser repetida por la ausencia de anticuerpos específicos TIMP-1 para la especie equina y los altos costos del mismo.

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease in horses. Regardless of the root cause, one of its most important components is an inflammatory condition, either in cartilage, synovial membrane, articular capsule or subchondral bone. This generates the release of inflammatory mediators and articular metabolism altering inhibited the synthesis of extracellular matrix components of cartilage and synovium. This imbalance in matrix turnover, caused by the loss of regulation of the synthesis and activity of metalloproteinases and their inhibitors, causes gradual loss of components of the extracellular matrix (ECM) of the cartilage, which ultimately leads to the development of OA.

Memory title was studied the activity of metalloproteinase-2 (MMP -2) and the presence of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP -1) was studied in order to establish possible relations with premature signs of damage or alteration articular.

For this study, were used 20 metacarpophalangeal joints of crossbred equines, benefited in the slaughterhouse "La Pintana". Synovial fluid was obtained by aseptic needle aspiration in which the total nucleated cell count (NCC) and total protein amount in order to select samples that have physiological or slightly increased was measured ranges. Two groups were formed: A (n = 10) macroscopically normal joints with $NCC < 1000 \mu L$ and B (n = 10) macroscopically normal joints with $NCC > 1000 \mu L$. Was performed joint arthrotomy and articular cartilage samples extracted for histological analysis, group B had a higher amount of isogenic groups being statistically significant difference for counting the isogenic groups. This result established that there is an early onset of OA. In both groups, the pro-MMP-2 was detected no differences in quantity. The presence of TIMP-1 could not be evidenced through the technique of Western blotting, due to the interference presented by the second antibody and could not be repeated by the absence of antibodies TIMP-1 for equine species and high costs thereof.

INTRODUCCIÓN

El caballo es un atleta extraordinario, característica que resulta de la evolución de los caballos como animales de pastoreo en las antiguas praderas de América del Norte. Su supervivencia en estas tierras abiertas potenció su velocidad al escapar de los depredadores y su resistencia al tener que viajar largas distancias en busca de agua y alimento. Estas dos grandes características de los equinos (velocidad y resistencia), fueron posteriormente modificadas y reforzadas por la cría selectiva realizada por los seres humanos.

El equino es reconocido como uno de los animales domésticos con mayor importancia a lo largo de la historia del hombre. No sólo se le ha incluido en labores de trabajo, sino también en actividades de recreación, terapia y compañía. Su imponente estructura ósea y gran desarrollo muscular, le han permitido desarrollar actividades que requieren grandes exigencias.

El óptimo desarrollo de las actividades del equino depende esencialmente del buen funcionamiento de su sistema locomotor. Es en éste sistema en donde el equino presenta el mayor desarrollo de patologías que finalmente se traducen en una disminución de su rendimiento y grandes pérdidas económicas en el rubro deportivo equino.

Entre las patologías relacionadas con el sistema locomotor, aquellas que afectan a las articulaciones sinoviales constituyen la principal causa de claudicación.

La articulación metacarpofalángica es particularmente susceptible a lesiones que finalmente concluyen en osteoartritis, ya que es una articulación con mucho movimiento que recibe altas cargas durante el ejercicio.

La enfermedad articular metacarpofalángica en equinos pura sangre de carrera es una de las principales causas de cojera, pérdida de días de entrenamiento y de ingresos.

Una patología articular, independiente de su etiología, siempre cursará con un cuadro inflamatorio inicial, que puede progresar a un cuadro crónico con alteración de los componentes anatómicos articulares, produciendo daños irreversibles que llevan a una pérdida de la función biomecánica del cartílago articular, comprometiendo en forma permanente el correcto funcionamiento de la articulación.

Esta memoria de título se centró en evaluar la presencia de la metaloproteinasa-2 y del inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 como posibles marcadores moleculares de una osteoartritis en etapa inicial.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las articulaciones diartrodiales permiten el movimiento y la transferencia del peso del animal a través de los músculos y huesos. Ella se compone de la superficie articular (delgada capa de cartílago hialino), la capsula articular y los ligamentos que en su conjunto rodean y estabilizan la articulación (Todhunter, 1996).

Un movimiento articular normal debe ser: (1) libre de dolor y generarse dentro de un rango de movimiento determinado, (2) controlado por músculos y tendones asociados, y (3) repetible con el mínimo o nada de fricción (Todhunter, 1996).

Es importante considerar que en la especie equina, los miembros delanteros soportan aproximadamente el 60% de su peso y transportando un jinete este peso podría incrementarse hasta en un 70%. De este modo, se conoce que el 75% de las cojeras se encuentran en la extremidad anterior y que además en el 95% de estos casos la ubicación de la lesión es distal al carpo (Malikides, 2007).

Dentro de las articulaciones sinoviales de la extremidad anterior del equino, las articulaciones del carpo y metacarpofalángica son las que cursan con mayor frecuencia procesos inflamatorios y degenerativos, debido a que soportan grandes fuerzas de compresión y poseen gran movilidad (McIlwraith, 1996).

La articulación metacarpofalángica está anatómicamente formada por la cara distal del III metacarpiano, la extremidad proximal de la primera falange y los dos huesos sesamoideos proximales. Todo lo anterior, se encuentra rodeado por la cápsula articular, que delimita un espacio denominado cavidad articular (Richardson *et al.*, 2011).

1. Componentes de la articulación metacarpofalángica equina

a. Cápsula Articular

Se compone de una gruesa porción fibrosa externa (cápsula fibrosa), seguida por una porción más delgada denominada membrana sinovial (McIlwraith, 1996).

La cápsula articular fibrosa se compone principalmente de tejido conectivo denso y posee escaso contenido celular. En ésta estructura se encuentra una gran cantidad de vasos sanguíneos que continúan su ramificación a través de la membrana sinovial y también hacia los ligamentos de la articulación. Los vasos sanguíneos van acompañados en su recorrido por nervios y vasos linfáticos (McIlwraith, 1996).

La membrana sinovial es un tejido conectivo laxo, que recubre todo el interior de la articulación, exceptuando los cartílagos articulares (en condiciones normales) (Palmer y Bertone, 1996). 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).

Está compuesta por dos tipos celulares que por su morfología, expresión de marcadores de superficie, patrón de síntesis de proteínas y función se han denominado tipo-macrófagos (sinoviocitos A) y tipo-fibroblastos (sinoviocitos B) (Tarner *et al.*, 2005). Existe un tercer tipo celular que correspondería a un tipo de sinoviocito con propiedades intermedias de los otros dos (Todhunter, 1996).

Los sinoviocitos B sintetizan componentes de la matriz amorfa, tales como: fibronectina, laminina, colágeno tipo I, III, IV y V, entactina, condroitin y heparán sulfato (Tarner *et al.*, 2005). También sintetizan ácido hialurónico a nivel de la membrana plasmática gracias a la actividad de la enzima hialuronato sintasa (Palmer y Bertone, 1996).

La membrana sinovial posee dos capas, la externa o de revestimiento que se encuentra formada por sinoviocitos tipo A y tipo B de manera intercalada, pero predominan los sinoviocitos B por sobre los sinoviocitos A (Tarner *et al.*, 2005). Se observa un aspecto de membrana celular continua, sin embargo existen espacios entre los sinoviocitos, lo que, junto con la ausencia de membrana basal, permite el flujo del exudado capilar hacia la cavidad articular (Palmer y Bertone, 1996). La capa sinovial interna es un tejido conectivo blando, que se dispone sobre una red de fibras elásticas (fibronectina, laminina y proteoglicanos) con diferentes tipos de colágenos (I, III, IV, V y VI). Además contiene vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas y numerosas células intercaladas incluyendo tipo-macrófagos, tipo-fibroblastos y adipocitos (Tarner *et al.*, 2005).

También es responsable de la síntesis de mediadores inflamatorios (citokinas-IL1, eicosanoides-PGE₂, proteinasas, entre otros), que pueden incitar y perpetuar el deterioro articular si la causa primaria de la patología no se controla. También genera líquido sinovial y permite el intercambio de nutrientes y desechos articulares (Tarner *et al.*, 2005).

b. Cartílago Articular

Es un tipo de cartílago hialino y se compone células denominadas condrocitos que representan entre el 1% al 12% del volumen total del cartílago articular y se encuentran dispersos en una matriz extracelular (Frisbie, 2006). A pesar de su baja proporción como componente del cartílago articular, los condrocitos son capaces de mantener la homeostasis de la matriz extracelular (Goldring y Marcu, 2009).

La matriz extracelular (MEC) a su vez se divide en tres principales componentes: colágeno, proteoglicanos y agua. El agua es la molécula más abundante y en base al peso húmedo representa un 70% de la matriz en estado adulto y un 80% de la matriz en animales jóvenes. Sobre la base de peso seco, la matriz extracelular se compone de un 50% de colágeno, un 35% de proteoglicano, 10% glicoproteína, 3% de minerales, 1% de lípidos y 1% de sustancias misceláneas (Frisbie, 2006).

El cartílago articular es un tejido avascular y carente de vasos linfáticos. Razón por la cual los nutrientes son obtenidos desde el líquido sinovial y a través del mismo realiza la eliminación de sus desechos (Frisbie, 2006).

El cartílago articular se encuentra desprovisto de inervación sensorial, una característica que se asocia a su deterioro silencioso pues no se revela signología clínica en etapas iniciales de una enfermedad articular (de Grauw, 2011).

Basado en la apariencia microscópica de los condrocitos y la orientación de las fibras de colágeno, el cartílago articular se divide en cuatro zonas contiguas: 1) La zona superficial, que tiene la mayor densidad de condrocitos, se observan aplanados y están orientados con su eje mayor paralelo con la superficie articular. El colágeno aquí se encuentra densamente poblado y la orientación de sus fibras también es paralela a la superficie articular. 2) La zona intermedia, se caracteriza por tener condrocitos de mayor tamaño, más redondeados.

3) La zona profunda, tiene los condrocitos más grandes dispuestos en columnas perpendiculares a la superficie articular. 4) La zona calcificada, que se compone de células y matriz mineralizada (Frisbie, 2006).

El cartílago se compone de diversos tipos de colágenos, predominantemente el de tipo II, cuya función principal es otorgar fuerza al cartílago. Otro componente importante del cartílago articular son los proteoglicanos (agrecán y decorin), cuya principal función es otorgar al cartílago la resistencia a la compresión y modular el crecimiento del mismo. Los proteoglicanos están formados por una proteína central a la que se le unen covalentemente uno o más glicosaminoglicanos (GAGs). Existen dos tipos de GAGs los de tipo sulfatado (condroitin y queratan) y no sulfatado (ácido hialurónico) (Clutterbuck *et al.*, 2010). El más abundante lo constituye el agrecán con un 85% del total de los proteoglicanos presentes en el cartílago articular (Frisbie, 2006).

El grado de daño del cartílago articular se puede clasificar según su descripción histológica. McIlwraith *et al* (2010) estableció criterios de clasificación histopatológica, basándose en lo descrito anteriormente por Mankin *et al* (1971). Esta clasificación se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación histopatológica del cartílago articular equino, basándose en: a) necrosis de condrocitos representados por lagunas vacías en la muestra; b) grupos isógenos que representan proliferación y regeneración del cartílago; c) fibrilación superficial que da cuenta de daño en la capa más superficial del cartílago y d) pérdida focal de células. (McIlwraith *et al.*, 2010).

Grado	Necrosis condrocitos	Grupos isógenos	Fibrilación superficial	Pérdida focal de células
Grado 0	Sección sin necrosis	Sección sin grupos isógenos	Sin fibrilación en la superficie del cartílago articular	Normalidad de población celular en sección
Grado 1	Máximo una célula necrótica cercana a la superficie articular en campo de 20x	Dos condrocitos en la misma laguna en aspecto superficial de cartílago articular	Fibrilación del cartílago restringida a la superficie y capa superficial	10 a 20% de área sin células en campo de 20x
Grado 2	Una a dos células necróticas cercanas a la superficie articular en campo de 20x	Dos a tres condrocitos en una misma laguna en aspecto superficial de cartílago articular	Fibrilación que se extiende hasta la zona media del cartílago articular	20 a 30% de área sin células en campo de 20x
Grado 3	Dos a tres células necróticas cercanas a la superficie articular en campo de 20x	Tres a cuatro condrocitos en una misma laguna en aspecto superficial de cartílago articular	Fibrilación que se extiende hasta el comienzo de la zona profunda del cartílago articular	40 a 50% de área sin células en campo de 20x
Grado 4	Tres a cuatro células necróticas cercanas a la superficie articular en campo de 20x	Más de cuatro condrocitos en una misma laguna en aspecto superficial de cartílago articular	Fibrilación que involucra la zona profunda del cartílago articular	Área mayor al 50% sin células en un campo de 20x

c. Líquido Sinovial

El líquido sinovial es un dializado de plasma que se realiza a nivel de la membrana sinovial. Contiene proteínas, electrolitos, lubricina y ácido hialurónico (producido por los sinoviocitos) (Basile *et al.*, 2013). Sus principales funciones son lubricar, amortiguar y nutrir al cartílago articular (van Pelt, 1974).

El líquido sinovial normal se describe como amarillo claro, transparente y altamente viscoso (condición atribuible a la concentración y grado de polimerización del ácido hialurónico) (Steel, 2008). El ácido hialurónico y la lubricina ayudan a proteger y mantener la integridad de la superficie articular, de este modo, el líquido sinovial funciona como un lubricante biológico de la articulación (Scanzello y Goldring, 2012).

La concentración de proteína en el líquido sinovial es de aproximadamente un 25% a un 35% de la proteína que se encuentra presente en el plasma de un mismo animal. La concentración normal de proteína en el líquido sinovial de equinos es de 18 +/- 3 g/L, y en forma general se considera normal cuando el valor es menor a 20 g/L (Steel, 2008).

Los eritrocitos no son considerados constituyentes normales del líquido sinovial. Su presencia en pequeñas cantidades se atribuye generalmente a contaminación de la muestra en el momento de la artrocentesis (Steel, 2008).

2. Osteoartritis Equina

Una de las enfermedades articulares más importante en el equino es la osteoartritis (OA), debido a su alta prevalencia y gran impacto económico en la industria equina (Bertone *et al.*, 2014).

La osteoartritis o también conocida como enfermedad degenerativa articular (EDA) (McIlwraith, 1996) es considerada como un grupo de desórdenes caracterizados por un final común: el deterioro progresivo del cartílago articular, acompañado por cambios en el hueso y los tejidos blandos de la articulación (McIlwraith *et al.*, 2012).

La osteoartritis es considerada como un desorden no inflamatorio y se describen tres tipos de mecanismos a través de los cuales se llega a desarrollar la enfermedad (Caron, 2011).

El primero consiste en una incorrecta composición de la matriz del cartílago, convirtiéndolo en un cartílago biomecánicamente defectuoso para enfrentar la carga normal de un animal (Caron, 2011).

La segunda ruta implica cambios físicos en el hueso subcondral, que se generan por presentar un cartílago articular muy delgado e incapaz de realizar una adecuada amortiguación frente a la carga física, de este modo, el impacto es atenuado por los tejidos periarticulares blandos, el músculo y el hueso subcondral. Esta compensación frente a la carga genera la aparición de microfracturas en el hueso subcondral. Si este sobreesfuerzo frente a una carga se realiza de manera frecuente, el mecanismo normal de cicatrización y reparación del hueso subcondral se alterará y con ello aumentará la densidad de la placa subcondral. Finalmente esto llevará a una reducción en la capacidad de absorber las cargas fisiológicas repetitivas (Caron, 2011).

La tercera explicación de la patogénesis de la osteoartritis es la más conocida y avalada por estudios en el equino y se produciría cuando un animal con articulaciones sanas se somete a un trauma de baja intensidad sostenido en el tiempo o impactos únicos de alta intensidad (Caron, 2011).

Producto del proceso inflamatorio que involucra el desarrollo de la OA, se describe un aumento del recuento de células nucleadas (RCN) en el líquido sinovial (Caron, 2011). Existen diversos estudios que establecen rangos normales de RCN en líquido sinovial de equino, al respecto van Pelt (1974), considera que un líquido sinovial normal no debe superar 167 +/- 21 células por μL . Todhunter (1996), establece un valor inferior a 500 células por μL , mientras que Stell (2008), considera el valor normal cuando es inferior a 1000 células por μL . En esta memoria de título se considerará normal un líquido sinovial cuando el RCN sea menor a 1000 células por μL .

Los cambios en la articulación se comienzan a generar por una pérdida del equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos del cartílago (Goldring y Marcu, 2009).

Cuando se altera el metabolismo articular se produce la degradación del cartílago articular y disminución de ácido hialurónico del líquido sinovial. Además, se inhibe la síntesis de los componentes de la MEC del cartílago y de la membrana sinovial. Este desbalance en el

recambio de la matriz, provocado por la pérdida de regulación de la síntesis y de la actividad de las metaloproteinasas, provoca la pérdida gradual de componentes de la MEC del cartílago, lo que conduce finalmente al desarrollo de la OA (Howard y McIlwraith, 1996).

3. Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas (MMPs) han demostrado tener un rol crucial en la degradación del colágeno tipo II y del agregán, lo que las convierte en un elemento muy importante en el estudio de la OA (Clegg *et al.*, 1997).

Las MMPs son un grupo de proteinasas extracelulares capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular (Cawston y Wilson, 2006).

Las MMPs (también llamadas matrixinas) son enzimas que estructuralmente se caracterizan por la presencia de un átomo de zinc en su sitio catalítico activo (Gomis-Rüth, 2009).

Estas enzimas son sintetizadas como zimógenos, con una señal péptidica que les lleva a la vía secretora. Su actividad catalítica se confina al espacio celular o a la superficie celular (Fanjul-Fernández *et al.*, 2010).

Las MMPs pueden agruparse según la especificidad a su sustrato de la siguiente manera (Visse y Nagase, 2003):

- Colagenasas: MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18
- Gelatinasas: MMP-2, MMP-9
- Estromelisinias: MMP-3, MMP-10, MMP-11
- Matrilisinias: MMP-7, MMP-26
- MMPs de Membrana (MT-MMPs): MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25 también conocidas como MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP y MT6-MMP respectivamente.
- Otras: MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 y MMP-28.

La regulación de las MMPs puede ocurrir de tres maneras; en primer lugar, a través de la síntesis y secreción de pro-MMP, en segundo lugar a través de la activación de la pro-MMPs, y en tercer lugar a través de los TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteinasas) (Clutterbuck *et al.*, 2010).

Las MMPs y los TIMPs están presentes en concentraciones variables dependiendo de la condición de cada individuo. En cartílago humano normal se ha observado un ligero exceso de TIMPs sobre las MMPs, y esta proporción sería la adecuada para mantener un recambio normal de la MEC. Sin embargo, en cartílago con artrosis, esta proporción se invierte y el exceso presente de MMPs provocaría el deterioro del cartílago articular (Clutterbuck *et al.*, 2010).

Las MMPs se consideran fundamentales en la patogénesis de las enfermedades articulares, se cree que la ruptura excesiva de la matriz del cartílago ocurre principalmente por la desregulación de su actividad y consecuentemente se va generando la enfermedad articular (Clegg *et al.*, 1997).

Se ha demostrado la presencia de la MMP-2 en líquido sinovial de articulaciones normales y anormales de equinos. La MMP-9 sólo ha sido detectada en líquido sinovial anormal de equino (Clegg *et al.*, 1997).

En el equino, la MMP-2 es secretada por los fibroblastos sinoviales y condrocitos, mientras que MMP-9 es secretada por los condrocitos, monocitos en sangre y polimorfoneutrófilos (PMNs) asociado a procesos inflamatorios (Clegg *et al.*, 1997).

La MMP-2, también llamada gelatinasa A o colagenasa tipo IV, es una proteinasa de 72-kDa, que degrada principalmente colágeno tipo II denaturado y colágeno tipo IV, aunque también tiene actividad significativa sobre fibronectina, elastina, y los colágenos tipo V, VII, X y XI (McIlwraith, 1996; Clegg *et al.*, 1997).

4. Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas

Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) son inhibidores naturales de las MMPs y se encuentran en la mayoría de los tejidos y fluidos del cuerpo (Lambert *et al.*, 2004).

El equilibrio entre las MMPs y los TIMPs está involucrado en eventos patológicos y normales, tales como la cicatrización de heridas, remodelación de tejidos, angiogénesis, tumorigénesis y metástasis (Lambert *et al.*, 2004).

Se conocen cuatro tipos de TIMPs (1, 2, 3 y 4). Los TIMPs tienen 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 (Visse y Nagase, 2003). Los TIMPs se unen a las MMPs inhibiéndolas y también son capaces de formar complejos con las pro-MMPs, regulando así los procesos de activación de las MMP (Lambert *et al.*, 2004).

El TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-4 están presentes en forma soluble mientras que TIMP-3 se encuentra sujeto fuertemente a la matriz (Lambert *et al.*, 2004).

Se ha comprobado la presencia de TIMP-1 y TIMP-2 en líquido sinovial de equinos (Clegg *et al.*, 1998). La expresión del TIMP-1 es inducida por estímulos externos, mientras que la expresión del TIMP-2 es constitutiva (Lambert *et al.*, 2004).

El TIMP-1 puede inhibir tanto a la MMP 9 como a la MMP 2, pero principalmente a la MMP 9. El TIMP-2 inhibe MMP-9 y MMP-2, pero principalmente la MMP-2 (Clegg *et al.*, 1998).

En esta memoria de título se estudiará la actividad de la MMP-2 y la presencia del TIMP-1, con el fin de establecer posibles relaciones con indicios prematuros de daño o alteración articular.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de la MMP-2 y la presencia de TIMP-1 en líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina macroscópicamente normal con diferentes recuentos celulares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la actividad de la MMP-2 y la presencia de TIMP-1 en líquido sinovial de articulaciones metacarpofalángica equina macroscópicamente normales con diferentes recuentos celulares.
2. Evaluar histológicamente el cartílago de articulaciones metacarpofalángica equina macroscópicamente normales con diferentes recuentos celulares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se utilizaron articulaciones metacarpofalángicas de equinos mestizos, beneficiados en el matadero “La Pintana”.

Se seleccionaron solo articulaciones macroscópicamente normales. Para considerar normal la muestra se debió observar un cartílago articular liso, brillante, sin líneas de roce y de coloración blanco nacarado. La membrana sinovial no debía presentar grados de congestión. El líquido sinovial se consideró normal cuando su coloración era amarilla clara, transparente y sin flóculos o trazas de sangre.

El número de muestras que se consideraron para éste estudio fue de 10 articulaciones macroscópicamente normales con RCN $< 1000/\mu\text{L}$ y 10 articulaciones macroscópicamente normales con RCN $> 1000/\mu\text{L}$.

Se obtuvo líquido sinovial mediante artrocéntesis aséptica. A la articulación metacarpofalángica se le extrajo la piel de la zona, luego se desinfectó con alcohol yodado y se realizó la punción con una jeringa de 5 mL y de 21G, obteniendo así la muestra de líquido sinovial que se mantuvo en hielo hasta su análisis.

Se realizó una artrotomía de la articulación, luego con una hoja de bisturí estéril se obtuvieron láminas superficiales de cartílago de ambos cóndilos de la epífisis distal del gran metacarpiano, sin incluir cartílago calcificado. Las muestras fueron almacenadas inmediatamente en frascos individuales, rotulados y fijados con formalina al 10%.

Recuento de células nucleadas en líquido sinovial

Se extrajo una alícuota de 200 μL de líquido sinovial para realizar RCN. Se preparó una dilución de 1:10, de líquido sinovial con NaCl al 0,9% para realizar su recuento directo en cámara de Neubauer.

De acuerdo al resultado obtenido de RCN totales, las muestras se clasificaron en dos grupos: A) RCN totales inferior a 1000 células nucleadas por μL (n=10) y B) RCN totales mayor a 1000 células nucleadas por μL (n=10).

Determinación de proteínas totales en líquido sinovial

Las muestras de líquidos sinoviales fueron diluidas con NaCl al 0,9% y se determinó la concentración de proteínas por el método espectrofotométrico de Lowry *et al* (1951), utilizando un estándar de albúmina sérica bovina fracción IV. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

Determinación de la actividad de la MMP-2

Se determinó la actividad gelatinásica de la MMP-2 en líquido sinovial mediante zimografía, de acuerdo al método descrito por Valenzuela *et al* (1999). Éste método consistió en someter las muestras a electroforesis en gel de poliacrilamida copolimerizada con gelatina al 1%. Previamente cada muestra de líquido sinovial se diluyó en una proporción de 1:4 en una solución que contenía Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,01%. Posteriormente se cargaron las muestras de líquido sinovial con contenido de proteína constante (40 µg) en gel de poliacrilamida. Luego el gel se sometió a una electroforesis (gel separador al 8%) a un voltaje constante de 100 volts durante una hora. Una vez concluida la electroforesis, el gel fue sometido a una incubación con Tritón al 1% por 30 minutos, con el propósito de extraer el SDS y así poder re-naturalizar la enzima. Luego el gel fue incubado a 37°C por 18 horas en una solución que contenía Tris-HCl 100 mM pH 8 y CaCl₂ 5 mM. El gel se tiñó durante 1 hora con azul de Coomassie y luego fue secado en papel celofán.

La presencia de la enzima se evaluó a través de una estimación cuantitativa mediante densitometría. Para este efecto, cada gel obtenido fue digitalizado y analizado por el programa computacional UNI-SCAN-IT, que determinó los pixeles de la banda que la representa en cada muestra.

Análisis del cartílago articular

Las muestras de cartílago almacenadas en formalina al 10%, fueron deshidratadas progresivamente en alcohol a diferentes concentraciones e impregnadas en parafina con un procesador automático de tejidos. Una vez terminado este proceso, se incluyeron los tejidos en cubos de parafina para poder seccionarlos con un micrótopo a 7 µm, y se prepararon

tres placas histológicas para cada muestra de cartílago, las que se tiñeron con hematoxilina-eosina, a fin de evaluar las características histológicas y el daño en el cartílago articular. Las tinciones se realizaron según el protocolo descrito por López *et al* (1982).

La evaluación histopatológica se realizó según lo descrito por An y Martin (2003), Lemaitre (2010) y Pease (2012). De cada muestra se describió el recuento de condrocitos, grupos isógenos y de lagunas.

Detección de TIMP-1 en el líquido sinovial

Se realizó mediante “Western Blot”, con los dos grupos de muestras, 10 articulaciones macroscópicamente normales con RCN < 1000/ μ L y 10 articulaciones macroscópicamente normales con RCN > 1000/ μ L.

Cada muestra de líquido sinovial se diluyó en una proporción de 1:3 en una solución tampón que contenía Tris-HCl 33 mM pH 6,8, SDS al 10%, glicerol al 1%, azul de bromofenol al 0,005% y β -Mercaptoetanol 700 mM, ésta solución se calentó en agua en ebullición por 5 minutos. Posteriormente se cargaron las muestras de líquido sinovial con contenido de proteína constante (40 μ g) en el gel de poliacrilamida al 12%. Posteriormente el gel se sometió a una electroforesis en condiciones reductoras y desnaturizantes a un voltaje constante de 150 volt durante 90 minutos.

A continuación, las proteínas presentes en los geles, fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) por medio de una electrotransferencia (0,35 A por 2 horas). Posteriormente las membranas fueron bloqueadas por una hora, en una solución TBS-leche-tween 20 (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, leche descremada 6% y Tween 20 0,05%) con el fin de evitar una interacción inespecífica de anticuerpos.

Los geles fueron sometidos a tres lavados consecutivos en agitación, cada uno de 10 minutos de duración en una solución TBS-Tween 20, para luego ser incubados durante toda la noche con anticuerpo anti-TIMP-1 (anticuerpo monoclonal contra TIMP-1 humano obtenido en ratón, TIMP-1 (102D1): sc-58435 de Santa Cruz Biotechnology), en una solución de TBS-leche-Tween 20. La dilución del anticuerpo monoclonal que se utilizó fue de 1:1000.

Posteriormente se realizó una segunda etapa de lavado con las mismas características del anterior y se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en cabra, *goat anti-mouse* IgG-HRP: sc-2005 de Santa Cruz Biotechnology), en solución TBS-leche-Tween 20. La dilución utilizada fue de 1:10.000. Se debió realizar una última etapa de lavado con TBS-Tween 20, para luego revelar con el sustrato (*SuperSignal® West Dura de Thermo Scientific*) que genera quimioluminiscencia. La reacción positiva se evidenció con la aparición de bandas luminosas, cuya intensidad de luz está en directa relación a la cantidad de antígeno. Luego, las membranas fueron expuestas a películas fotosensibles donde quedaron registradas las diferencias de emisión de luz de cada muestra.

La presencia del TIMP-1 se evaluó a través de una estimación cuantitativa. Para este efecto, la película fotosensible fue escaneada y analizada por el programa computacional UNISCAN-IT, que determinó los píxeles de la banda que la representa en cada muestra (densitometría).

Control del segundo anticuerpo en el líquido sinovial

Con el fin de evaluar la especificidad del segundo anticuerpo se realizó en una primera etapa un “Western Blot” para el control del segundo anticuerpo con 4 muestras de líquido sinovial (2 muestras de articulación macroscópicamente normales y 2 muestras con membrana sinovial congestiva) de forma simultánea. La cantidad de proteína utilizada fue de 25 µg. El control del anticuerpo contempla el desarrollo del “Western Blot” completo, pero sólo se incubó con el segundo anticuerpo la membrana de PVDF.

Análisis Estadístico

La significancia de las variables cuantitativas (presencia de TIMP-1 y la actividad de MMP-2) se estableció mediante la prueba estadística de “t de Student”.

RESULTADOS

Se utilizaron muestras de líquido sinovial y cartílago articular de articulaciones metacarpofalángicas de equinos mestizos, beneficiados en el matadero “La Pintana”.

Análisis del líquido sinovial

Del total de articulaciones analizadas se consideraron para éste estudio 20 articulaciones macroscópicamente normales y se distribuyeron en dos grupos según el RCN. En la tabla 2 se observan los promedios del RCN y de la concentración de proteínas del líquido sinovial de cada grupo, junto a su desviación estándar.

Tabla 2: Promedio y desviación estándar de RCN y concentración de proteínas de líquido sinovial en cada grupo de estudio

Grupo	Recuento células nucleadas	[Proteína] mg/ml
Grupo A (n=10)	603 ± 203	8 ± 2
Grupo B (n=10)	3930 ± 3752	9 ± 5

Determinación de la actividad de la MMP-2

En ambos grupos se determinó la actividad de la MMP-2 midiendo la actividad gelatinolítica en el líquido sinovial de cada muestra de ambos grupos mediante una zimografía.

Para determinar que la banda encontrada era la representativa de la MMP-2 (72-kDa), se utilizó el estudio previo de Lemaitre (2010). En la Figura 1, se observa la actividad gelatinásica, como bandas claras formadas en el gel.

Los geles fueron escaneados y las bandas fueron analizadas según su intensidad, determinándose la cantidad de pixeles que cada una contenía.

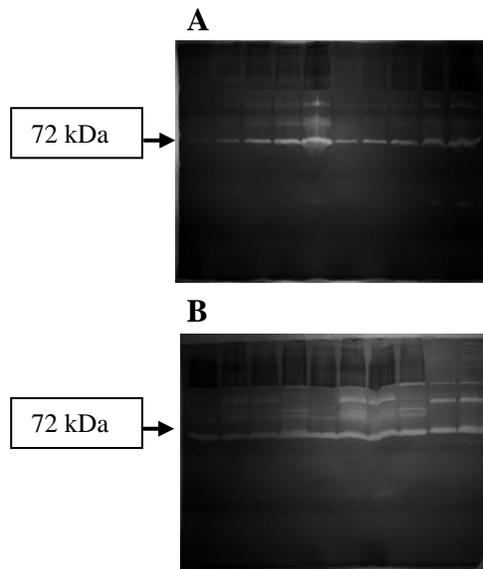


Figura 1. Zimogramas de líquido sinovial de equino. **A)**Grupo RCN > 1000/μL. **B)**Grupo RCN < 1000/μL. En cada carril se cargó 40 μg de proteína de líquido sinovial. La flecha indica las bandas gelatinolíticas correspondientes a la pro-MMP-2.

Los resultados de la zimografía se expresan en la tabla 3:

Tabla 3: Promedio y desviación estándar de pixeles en cada grupo de estudio.

Grupo	Cantidad de Pixeles
Grupo A (n=10)	59134 ± 24918
Grupo B (n=10)	51045 ± 25465

La banda gelatinolítica se evidenció en todas las muestras de ambos grupos, sin tener diferencia significativa en la cantidad de pixeles de las bandas.

Análisis Histológico

Las muestras de cartílago articular se analizaron histológicamente, y se obtuvieron la cantidad de células por mm^2 , lagunas por mm^2 y grupos isógenos por mm^2 . En la tabla 4 se observan los promedios obtenidos para cada grupo.

Entre los grupos solo se encontró diferencia estadísticamente significativa para el recuento de los grupos isógenos por mm^2 .

Tabla 4: Análisis histológico del cartílago articular de los grupos A y B, mostrando diferencias significativas entre los recuentos de los grupos isógenos ($p < 0,05$)

Grupo	Células/mm^2	Lagunas/mm^2	Grupos isógenos/mm^2
Grupo A (n=10)	246 \pm 70	30 \pm 10	26 \pm 22 ^(a)
Grupo B (n=10)	272 \pm 91	36 \pm 18	53 \pm 39 ^(b)

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

Prueba de control del segundo anticuerpo

Se realizó un “Western Blot” para el control del segundo anticuerpo con 4 muestras de líquido sinovial. En la Figura 2, en el gel A, se aprecia un conjunto de bandas que reconoce el primer anticuerpo, coincidiendo con la masa molecular descrita para el TIMP-1 de aproximadamente 30 kDa (Lambert *et al.*, 2004). En el gel B se muestra el control del segundo anticuerpo, aquí se observó una reactividad cruzada del segundo anticuerpo.

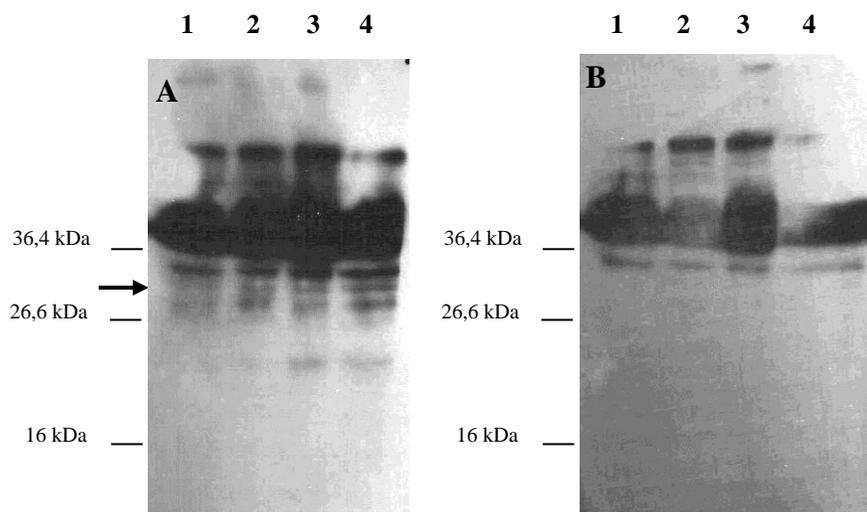


Figura 2. “Western Blot” de líquido sinovial de equino. (A) Detección con anticuerpo anti-TIMP-1. (B) Control del segundo anticuerpo. En cada carril se cargó 25 μ g de proteína de líquido sinovial de articulaciones macroscópicamente normales (3 y 4) y con membrana sinovial congestiva (1 y 2). La dilución del primer anticuerpo fue 1:200 y del segundo anticuerpo de 1:20.000. La flecha indica la banda que correspondería al TIMP-1 (aproximadamente de 30 kDa). El gel usado fue al 12%. Los pesos moleculares que se observan corresponden a un estándar comercial.

“Western Blot” del líquido sinovial

Se realizó un “Western Blot” para cada grupo, evidenciando un resultado similar al obtenido en la prueba de control del segundo anticuerpo. En la Figura 3, se observa una fuerte señal en la parte superior de ambos grupos que abarca hasta la zona donde se debería encontrar la banda representativa del TIMP-1.

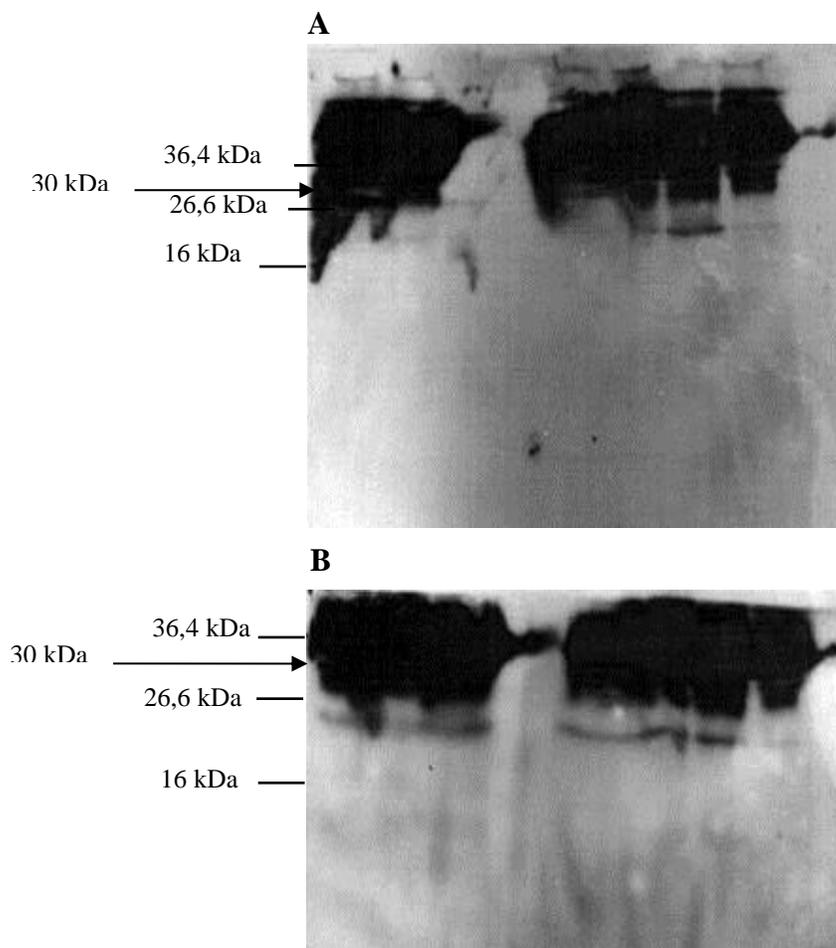


Figura 3. “Western Blot” de líquido sinovial de equino. **A)** Grupo RCN < 1000 por μL . **B)** Grupo RCN > 1000 por μL . En cada carril se cargó 40 μg de proteína de líquido sinovial. La dilución del primer anticuerpo fue 1:200 y del segundo anticuerpo de 1:20.000. El gel usado fue al 15%. Los pesos moleculares que se observan corresponden a un estándar comercial. La flecha indica el lugar en donde se debería haber identificado la banda de 30 kDa correspondiente al TIMP-1.

DISCUSIÓN

Una de las mayores pérdidas económicas en la industria equina es producida por la alta prevalencia de cojeras asociadas con la osteoartritis, que es una enfermedad en cuyo desarrollo intervienen múltiples factores, no existiendo un orden específico del daño producido en las diferentes estructuras articulares. De este modo, cualquier investigación que aporte al desarrollo de nuevas formas de diagnóstico precoz y de prevención de la aparición de OA sería de gran ayuda para poder disminuir los daños que se genera a la industria (McIlwraith, 2005).

Para este estudio se utilizaron 20 articulaciones metacarpofalángicas macroscópicamente normales. A cada articulación se le extrajo una muestra de líquido sinovial que fue sometida a recuento celular. Muchas de las muestras clasificadas como normales a la inspección macroscópica, contenían recuentos celulares bastante elevados respecto a lo descrito por van Pelt (1974), Todhunter (1996) y Steel (2008).

Como ha sido descrito por Steel (2008), una articulación normal no debería tener más de 1000 células nucleadas por μL de líquido sinovial, basándose en este dato se formaron dos grupos uno con RCN totales inferior a 1000 células nucleadas/ μL ($n=10$) y otro con RCN totales mayor a 1000 células nucleadas/ μL ($n=10$). Se consideró además descartar muestras con RCN superior a 10.000 células nucleadas/ μL , que indicarían un proceso inflamatorio agudo (Steel, 2008).

Frente al desarrollo de un proceso inflamatorio en la articulación, lo primero que sucede es un aumento en la infiltración de células nucleadas en el líquido sinovial. Este es un factor importante en el desarrollo de la OA (Frisbie, 2006).

Ambos grupos se formaron con el fin de evaluar si la diferencia en el contenido celular entre ellos se traducía en alguna alteración no apreciable a simple vista, tanto a nivel histológico como en la actividad de la MMP-2 y la presencia del TIMP-1.

Otro criterio de selección de las muestras fue la utilización de articulaciones cuya concentración de proteínas totales en el líquido sinovial fuese igual o menor a $18 \pm 3 \text{ g/L}$ (Steel, 2008). En condiciones de inflamación aguda la concentración de proteínas totales

podría llegar hasta 40 g/L, en condiciones de una infección crónica puede llegar hasta 60 g/L (Steel, 2008).

Los recuentos celulares y las concentraciones proteicas de ambos grupos se seleccionaron para que estuviesen dentro de rangos fisiológicos o levemente aumentados, de este modo, si existe algún proceso de desarrollo de OA, ésta se encontraría en una fase muy temprana.

En los zimogramas de ambos grupos se evidenció actividad gelatinolítica, en cada muestra, correspondiente a una banda proteica de aproximadamente 72 kDa, que sería la forma latente de la MMP-2 (pro-MMP-2), coincidiendo con lo descrito por McIlwraith, (1996) y Clegg *et al* (1997). Trumble *et al* (2001), también observó en el 100% de las muestras de líquido sinovial de articulaciones normales de equinos una banda de actividad gelatinolítica de 66 kDa identificandola como la pro MMP-2, sugiriendo que su rol es constitutivo y homeostático para la remoción del colágeno anormal de la matriz extracelular recientemente sintetizada.

La MMP-2, degrada principalmente colágeno tipo II desnaturalizado y colágeno tipo IV, aunque también tiene actividad significativa sobre fibronectina, elastina, y los colágenos tipo V, VII, X y XI (McIlwraith, 1996).

La actividad de la MMP-2 en líquido sinovial no presentó diferencias significativas entre los grupos, lo que indicaría nuevamente que si existe un proceso inicial de OA, éste no se evidenciaría con un aumento de la actividad de la pro-MMP-2 (Tabla 3).

La presencia de actividad de la MMP-2 en la totalidad de las muestras se condice con lo descrito por Trumble *et al* (2001), en donde describe que la pro-MMP-2 se encuentra en todas las articulaciones normales,

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

Con respecto a la descripción histológica del cartílago articular, no se encontró diferencias en el recuento de condrocitos y de lagunas vacías entre los grupos. Sí se observó una diferencia estadísticamente significativa en el recuento de grupos isógenos o “clusters” entre los grupos. Estos grupos isógenos representan condrocitos en proliferación, lo que

podría estar indicando que las articulaciones clasificadas en el grupo B podrían representar una prematura respuesta del cartílago, sufriendo cambios patológicos que podrían concluir en una OA (Tabla 4).

Al realizar la prueba control del segundo anticuerpo, se produjo una reacción inespecífica, observándose una banda de gran intensidad de masa molecular mayor a 36 kDa y otra de menor intensidad de masa molecular aproximada 30 kDa. Sin embargo, se pudo observar una banda de menor intensidad de una masa molecular de alrededor 28 kDa, que podría corresponder al TIMP-1.

A pesar del resultado obtenido en la prueba de control del segundo anticuerpo se decidió realizar el “Western Blot” con las muestras de ambos grupos. Se incrementó la concentración de proteína a utilizar a 40 µg, tratando de asegurar la detección de la banda del TIMP-1 en una mayor cantidad, suponiendo que el segundo anticuerpo disminuiría su unión al elemento interferente. También se decidió aumentar la concentración del gel de un 12% a un 15%, para asegurar que la proteína interferente quedara retenida en la parte superior del gel, sin ocupar el lugar donde se evidenciaría la banda que representaría al TIMP-1. Hay que considerar que la concentración proteica del líquido sinovial corresponde al 25-35% de las proteínas plasmáticas de un mismo animal, de las cuales aproximadamente al 60% de las proteínas presentes en el líquido sinovial corresponden a albúmina. No es posible cargar mayor cantidad de proteínas en el gel para poder aumentar la posibilidad de detección del TIMP-1.

Los dos cambios realizados en la prueba de “Western Blot”, no fueron suficientes para poder evidenciar la banda de 28 kDa que representa al TIMP-1, según lo descrito por Lambert *et al* (2004). Por la composición proteica del líquido sinovial, se concluye que la proteína interferente es la albúmina, ya que es la proteína de mayor abundancia en el líquido sinovial.

La ausencia de anticuerpos específicos TIMP-1 para la especie equina y los altos costos del mismo hicieron imposible que se repitiera nuevamente la prueba de “Western Blot”.

CONCLUSIONES

- La expresión de la MMP-2 en ambos grupos es de naturaleza constitutiva, por lo que no es un buen marcador de daño articular, en esta etapa que sería inicial.
- En ambos grupos macroscópicamente normales pero con distintos recuentos celulares, se encontró diferencia significativa en el análisis histológico, en donde el grupo con mayor RCN presentaba mayor número de grupos isógenos, por lo que el RCN podría ser utilizado como un parámetro que refleje daño inicial en el cartílago articular de la articulación metacarpofalángica de equino.

BIBLIOGRAFÍA

AN, Y.; MARTIN, K. 2003. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Humana Press. New Jersey, Estados Unidos. 587 p.

BASILE, R, C.; FERRAZ, G, C.; CARVALHO, M. P.; ALBERNAZ, R, M.; ARAUJO, R, A.; FAGLIARI, J. J.; QUEIROZ-NETO, A. 2013. Physiological concentrations of acute-phase proteins and immunoglobulins in equine synovial fluid. *Am. J. Vet. Res.* 33: 201-204.

BERTONE, A.; ISHIHARA, A.; ZEKAS, L.; WELLMAN, M.; LEWIS, K.; SCHWARZE, R.; BARNABA, A.; SCHMALL, M.; KANTER, P.; GENOVESE, R. 2014. Evaluation of a single intra-articular injection of autologous protein solution for treatment of osteoarthritis in horses. *Am. J. Vet.* 75 (2): 141–151.

CARON, P. J. 2011. Osteoarthritis. **In:** Ross, W.M.; Dyson, S.J. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.* 2^a Ed. Elsevier Saunders. Missouri, USA. pp. 655-668.

CAWSTON, E.; WILSON, A. 2006. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 20 (5): 983-1002.

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

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.

CLUTTERBUCK, L. A.; HARRIS, P.; ALLAWAY, D.; MOBASHERI, A. 2010. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *Am. J. Vet.* 183: 27-38.

DE GRAUW, J. C. 2011. Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *Vet. Q.* 31 (2): 77-86.

FANJUL-FERNÁNDEZ, M.; FOLGUERAS, A.; CABRERA, S.; LÓPEZ-OTIN, C. 2010. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta.* 1803: 3–19.

FRISBIE, D. 2006. Synovial Joint Biology and Pathobiology. **In:** Auer, J.; Stick, J. *Equine Surgery*. 3ª ed. Elsevier Saunders. Estados Unidos. pp.1036-1055.

GOLDRING, B.; MARCU, K. 2009. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 11 (3): 224-239.

GOMIS-RÜTH, X. 2009. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 284 (23): 15353–15357.

GONZÁLEZ, E.; ADARMES, H. 1990. Osteoarthritis: una patología de la matriz extracelular. *Av. Cs. Vet.* 5: 7-11.

HOWARD, R. D.; MCILWRAITH C. W. 1996. Hyaluronan and its use in the treatment of equine joint disease. **In:** McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. *Joint disease in the horse*. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. pp. 257-269.

LAMBERT, E.; DASSÉ, E.; HAYE, B.; PETITFRERE, E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49: 187–198.

LEMAITRE, M. 2010. Caracterización histológica del cartílago de la articulación metacarpofalángica equina macroscópicamente sana y su relación con el recuento celular del líquido sinovial y el contenido de MMP-2 y 9. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.

LOPEZ M. L.; LEYTON C.; GRAF M. E. 1982. Técnicas de histología y citología. 2ª Ed. U. de Chile. Santiago, Chile. 242 p.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-675.

MALIKIDES, N. 2007. Equine lameness. **In:** McGowan, C. M.; Stubbs, N.; Goff, L. *Animal physiotherapy: assessment, treatment and rehabilitation of animals*. Blackwell. Oxford, UK. pp. 82.

MANKIN, H.; DORFMAN, H.; LIPPIELLO, L.; ZARINS, A. 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg.* 53A(3):523-537.

McILWRAITH, C.W. 1996. General pathobiology of the joint and response to injury. **In:** McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. *Joint disease in the horse.* W.B. Saunders. Philadelphia, USA. pp. 40-70.

McILWRAITH, C.W. 2005. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet. J.* 37(5): 473-482.

McILWRAITH, C.; FRISBIE, D.; KAWCAK, C.; FULLER, C.; HURTIG, M.; CRUZ, A. 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage* 18: S93-S105.

McILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E. 2012. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res.* 1 (11): 297–309.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L. 1996. Joint biomechanics in the pathogenesis of traumatic arthritis. **In:** McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. *Joint disease in the horse.* W.B. Saunders. Philadelphia, USA. pp. 104-119.

PEASE, A. 2012. Biochemical evaluation of equine articular cartilage through imaging. *Vet. Clin. Equine* 28(3): 637-646.

RICHARDSON, W. D.; DYSON, J. S. 2011. The Metacarpophalangeal Joint. **In:** Ross, W.M.; Dyson, S.J. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.* 2nd Ed. Elsevier Saunders. Missouri, USA. pp. 394-410.

SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. 2012. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51 (2): 249-57.

STEEL, C. M. 2008. Equine synovial fluid analysis. *Vet. Clin. Equine* 24: 437-454.

TARNER, I.; HÄRLE, P.; MÜLLER-LADNER, U.; GAY, RENATE.; GAY, STEFFEN. 2005. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 19(1):19-35.

TODHUNTER, R.J. 1996. Anatomy and Physiology of Synovial Joints. In: McIlwraith, C.W.; Trotter, G.W. Joint Disease in the Horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. pp. 1-28.

TRUMBLE, T. N.; TROTTER, G. W.; THOM, J. R.; MCILWRAITH, C. W.; CAMMARATA, S. GOODNIGHT, J. L.; BILLINGHURST, R. C.; FRISBIE, D. D. 2001. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. Am. J. Vet. Res. 62 (9):1467-1477.

VALENZUELA, M, A.; CARTIER, L.; COLLADOS, L.; KETTHUM, A, M.; ARAYA, F.; CONCHA, C.; FLORES, L.; WOLF, M, E.; MOSNAIM, A, D. 1999. Gelatinase activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of various patient populations. Res. Commun Mol. Pathol. Pharmacol. 104 (1): 42-52.

VAN PELT, R.W. 1974. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. J.A.V.M.A. 165 (1): 91-95.

VISSE, R.; NAGASE, H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors. Circulation Res. 92: 827-839.