



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Detección de la actividad de la catepsina B en condrocitos cultivados y en el cartílago articular equino después de una prueba de impacto.

Tesis presentada por:

M.V.Z ROCÍO SALGADO TRONCOSO

Como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Veterinarias.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Detección de la actividad de la catepsina B en condrocitos cultivados y en el cartílago articular equino después de una prueba de impacto.

Tesis presentada por:

M.V.Z ROCÍO SALGADO TRONCOSO

Aprobación de la Tesis:

Gustavo Hernández Vidal. Ph.D.
Asesor principal

Luis Edgar Rodríguez Tovar. Ph.D
Co-asesor

Francisco A. Mora Valdez. MVZ.
Asesor externo

Jorge Kawas Garza. Ph.D.
Co-asesor

Rafael Ramírez Romero. Ph.D.
Co-asesor

Jose Antonio Salinas Melendez. Dr.
Co-asesor

Rafael Ramírez Romero. Ph.D.
Subdirector de Posgrado

Victor Manuel Riojas. Ph.D.
Co-asesor

DEDICATORIA

A mi familia,
por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo este proceso he contraído deudas de gratitud .Un trabajo como el que aquí se presenta, siempre es el resultado sinérgico de esfuerzos individuales, institucionales y comunitarios. Una página no alcanzaría para citar a todos los que directa o indirectamente contribuyeron para obtener los resultados que a continuación se presentan.

Sin embargo, deseo expresar muy particularmente mi agradecimiento a mi asesor y amigo Dr. Gustavo Hernández Vidal quien nunca dejó de impulsarme y apoyarme.

Tambien quiero agradecer a mi familia y amigos todo el amor, apoyo y comprensión que me han brindado.

A mis padres muy especialmente....

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue investigar la expresión de la catepsina B en condrocitos cultivados y en cartílago articular equino después de una prueba de impacto.

Análisis inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos tanto en cartílago articular y condrocitos aislados, demostraron una distribución heterogénea de la expresión enzimática de la catepsina B.

En el cartílago articular normal equino en un rango de 4 a 24 meses de edad, se identificó que la expresión de la catepsina B, enzima encargada de la degradación del proteoglicano (PG) fue en niveles muy bajos en la zona articular y en la zona media aunque la enzima se presentó en la mayoría de los condrocitos (50-70%) de la zona profunda. La expresión enzimática de la catepsina B fue baja localizándose en el 10% de condrocitos sanos aislados.

La catepsina B no se localizó en el cartílago articular equino en un rango de 157 días a 1 mes de edad, lo que sugiere que la regulación de esta enzima es directamente proporcional al desarrollo del animal.

La discondroplasia es una enfermedad de desarrollo ortopédico que se presenta en caballos jóvenes, se caracteriza por cambios en el cartílago articular en crecimiento. La distribución de la catepsina B en el cartílago discondroplásico fue variable debido a una desorganización de las diferentes zonas del cartílago articular.

Las colonias de condrocitos, las cuales son características de la discondroplasia, presentaron una fuerte tinción para la catepsina B. A diferencia de los condrocitos aislados primeramente, las células discondroplásicas mostraron una mayor expresión de la catepsina B. La actividad de esta enzima se demostró *in situ* en células discondroplásicas mediante el uso de un substrato fluorescente específico para la catepsina B.

La regulación *in vitro* de la expresión de la catepsina B fue investigada. Elevados niveles de expresión, secreción y actividad de la enzima fue inducida mediante (i) la modulación fenotípica por subcultivo (ii) co-cultivo con tejido sinovial y (iii) la aplicación de estrés biomecánico (prueba de impacto) aplicado a muestras de cartílago articular.

ÍNDICE

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	v
Indice	vii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tablas	..xvi
Abreviaturas.....	xvii

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción general	1
1.1.1 Desarrollo del cartílago y osteocondrosis	1
1.2 Estructura y función articular	13
1.2.1 Hueso subcondral	15
1.2.1.1 Composición del hueso subcondral	15
1.2.1.2 Enzimas presentes en el hueso subcondral	17
1.2.1.3 Composición celular	18
1.3 Arquitectura ósea	19

1.4 Sinovia	19
1.5 Membrana sinovial	20
1.6 Fluido sinovial	20
1.7 Cartílago articular	22
1.7.1 Metabolismo de los condrocitos	27
1.7.2 Homeostasis del cartílago articular	30
1.7.3 Homeostasis del cartílago bajo condiciones fisiológicas	31
1.7.4 Actividad enzimática del cartílago articular	32
1.7.5 Disturbio de la homeostasis en el cartílago articular bajo condiciones patológicas.	34
1.8 Componentes de la matriz extracelular	35
1.8.1 Colágenos	35
1.8.2 Proteoglicanos y glucosaminoglucanos	36
1.8.3 Proteoglicanos pequeños	37
1.8.4 Proteínas no colágenas de la matriz extracelular	39
1.8.5 Cambios de la matriz extracelular	40
1.9 Enzimas Capaces de degradar cartílago	41
1.9.1 Metaloproteinasas de la matriz (MMP's)	41
1.9.2 Proteinasas cisteínicas	42
1.10 Síntesis de la catepsina B	44
1.10.1 Modulación fenotípica y expresión de la catepsina B	46
1.11 Efectos del tejido sinovial, cobre y zinc en la función de los condrocitos y degradación de la matriz.	49

1.12 Distribución de la carga en el cartílago articular	51
---	----

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales	54
2.1.1 Antisuero	54
2.1.2 Anticuerpos secundarios	54
2.1.3 Sustancias y agentes químicos	55
2.1.4 Materiales de cultivo de tejidos	56
2.1.5 Soluciones amortiguadoras	58
2.1.5.1 Soluciones amortiguadoras para inmunolocalización	58
2.1.5.2 Tinción para inmunolocalización	60
2.1.6 Tinción histológica	60
2.1.7 Soluciones para histología	61
2.1.7.1 Paraformaldehído 4% pH 7.4 (PFA)	61
2.1.7.2 Poly – L – lisina.....	61
2.1.8 Solución de tripsina para separación celular	62
2.1.9 Medios	62
2.1.9.1 Medio modificado Dulbecco's-Eagle's (DMEM)	62
2.1.9.2 Medio de actividad enzimática	62
2.1.9.3 Solución inhibidora (concentración 50X)	63

2.2 Métodos

2.2.1 Medio de cultivo de tejidos	63
2.2.2 Condiciones de cultivo	64
2.2.3 Tejidos	64
2.2.3.1 Muestras de cartílago y hueso subcondral	64
2.2.4 Células	66
2.2.4.1 Aislamiento y propagación de los condrocitos articulares.	66
2.2.4.1.1 Digestión pronasa/colagenasa	66
2.2.4.1.2 Propagación condrocítica	67
2.2.5 Preparación del tejido sinovial femorotibial	68
2.2.5.1 Co-cultivo del cartílago articular sinovial	68
2.2.6 Métodos inmunocitoquímicos	72
2.2.6.1 Preparación portaobjetos	72
2.2.6.2 Preparación de las secciones de cartílago y hueso subcondral.	72
2.2.6.3 Preparación de las células	73
2.2.6.4 Tinción inmunofluorescente	73
2.2.6.5 Tinción biotina/estreptavidina-peroxidasa de rábano.	75
2.2.7 Tinciones histológicas	75
2.2.7.1 Azul de toluidina	75
2.2.7.2 Localización de la actividad enzimática <i>in situ</i>	76

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Localización de la catepsina B en el cartílago articular del caballo	78
3.2 Expresión del la catepsina B en cartílago discondroplásico y en condrocitos aislados de cartílago discondroplásico.	85
3.2.1 Distribución de la catepsina B en discondroplasia equina	85
3.3 Efectos del impacto mecánico en la expresión y distribución de la catepsina B en el cartílago articular.	95
3.3.1 Expresión y distribución de la catepsina B en cartílago articular impactado.	96
3.3.2 Expresión y distribución de la catepsina B en el cartílago articular sometido a bajo impacto durante largos periodos en cultivo.	99
3.4 Estudios de la actividad enzimática de la catepsina B	102
3.4.1 Localización histoquímica de la actividad enzimática de la catepsina B en muestras normales y discondroplásicas.	103
3.4.2 Localización citoquímica de la actividad enzimática de la catepsina B en condrocitos modulados fenotípicamente.	105
3.4.3 Monitoreo de la actividad enzimática de la catepsina B en condrocitos durante la incubación.	109
3.4.4 Efectos del cobre y zinc en la actividad enzimática de la catepsina B.	111

3.5 Resumen

120

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

121

BIBLIOGRAFÍA

131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Lesión típica de discondroplasia presente en la cresta lateral de tróclea del fémur de un caballo de 3 años.	4
Figura 1.2 Miembro posterior del caballo en donde se indican en orden de importancia los sitios más comúnmente afectados por discondroplasia y osteocondrosis.	7
Figura 1.3 Miembro anterior del caballo en donde se indican en orden de importancia los sitios más comúnmente afectados por la discondroplasia y osteocondrosis.	8
Figura 1.4 Radiografía de un equino con osteocondrosis donde se aprecia una evidente irregularidad de la parte caudal de la cabeza del humero	10
Figura 1.5 Sección teñida con azul de toluidina (x40) en donde se observa la desorganización de los condrocitos en la zona profunda	12
Figura 1.6 Diagrama esquemático de una articulación sinovial.	14
Figura 1.7 Diagrama que muestra la organización de los condrocitos en las diferentes zonas del cartílago articular del equino joven.	24
Figura 1.8 Diagrama que muestra la organización de los condrocitos en las diferentes zonas del cartílago articular del equino adulto.	25
Figura 1.9 Diagrama esquemático representando un segmento de ácido hialurónico con cadenas a los lados de proteoglicanos (A), y una subunidad de proteoglicano (agregan) en detalle (B).	38
Figura 1.10 Síntesis de catepsina B	48
Figura 2.1 Preparación de tejido sinovial obtenido de la articulación femorotibial bajo condiciones estériles.	70
Figura 2.2 Co-cultivo de cartílago articular con sinovia	71
Figura 3.1 Localización inmunocitoquímica de catepsina B en condrocitos del cartílago articular equino	79
Figura 3.2 Localización inmunocitoquímica de catepsina B en condrocitos	80

del cartílago articular equino

- Figura 3.3** Histología y localización inmunocitoquímica de catepsina B en cartílago equino. 81
- Figura 3.4** Sección teñida con azul de toluidina (x40) en donde se observa la desorganización de los condrocitos en la zona profunda. 88
- Figura 3.5** Inmunolocalización de catepsina B e histología de cartílago discondroplásico tomado de la cresta lateral de la tróclea del fémur de un equino. 89
- Figura 3. 6** Histología e inmunolocalización de catepsina B en cartílago discondroplásico 90
- Figura 3.7** Inmunolocalización de catepsina B en caballo tratado con hormona del crecimiento. Sección incubada con suero de ovino anti-humano (α h, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con FITC diluida 1:200. Células de la zona profunda (x40). 92
- Figura 3.8** Localización inmunocitoquímica de catepsina B en cultivo de monocapa de condrocitos discondroplásicos. 94
- Figura 3.9** Localización inmunocitoquímica de catepsina B en cartílago articular equino después de una prueba de impacto. 98
- Figura 3.10** Actividad enzimática de la catepsina B en condrocito discondroplásico. Monocapa de condrocitos incubados con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4M β NA y 5-nitrosalicilaldehído. Actividad después de 20 minutos de incubación. 106
- Figura 3. 11** Actividad de catepsina B en condrocitos fenotípicamente modulados (x100). Monocapa de condrocitos incubados con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4M β NA y 5-nitrosalicilaldehído. 108
- Figura 3.12** Monitoreo de la actividad enzimática de la catepsina B condrocitos durante incubación con el medio para actividad enzimática con Ala-Arg-Arg-4M β NA y 5- nitrosalicilaldehído. 110
- Figura 3. 13** Actividad de la catepsina B en cartílago articular normal de equino co cultivado con tejido sinovial por 48 h. 112

- Figura 3.14** Actividad de la catepsina B en cartílago articular normal de equino co cultivado con tejido sinovial y sulfato de cobre (0.01m M) por 48 h. 114
- Figura 3.15** Actividad de la catepsina B en la zona media del cartílago articular incubado por 30 min con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4MBNA y 5- nitrosalicilaldehido 115
- Figura 3. 16** Actividad de la catepsina B en cartílago articular normal equino cultivado por 48 h sin tejido sinovial (control). 116
- Figura 3.17** Actividad extracelular de la catepsina B en cartílago articular normal equino co-cultivado con tejido sinovial y E-64. 118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Distribución zonal de la catepsina B en cartílago articular equino (tróclea latera).	83
Tabla 3.2 Distribucion zonal de la catepsina B en cartílago articular equino. Rango de edad 157d-1 mes de edad.	84
Tabla 3.3 Distribucion de catepsina B en cartílago articular equino con discondroplasia.	86
Tabla 3.4 Distribucion zonal de la catepsina B en cartílago articular después de una prueba de impacto.	97
Tabla 3.5 Distribucion zonal de la catepsina B en cartílago articular durante diferentes periodos de tiempo.	101
Tabla 3.6 Efectos del tejido sinovial, cobre y zinc en la actividad de la catepsina B en el cartílago articular equino.	119

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micras
μPa	Micropascal
α	Alfa
Ac	Anticuerpo
Ag	Agregan
AH	Ácido hialurónico
ATPasas	Adenosin Trifosfatasas
β	Beta
BSA	Bovine serum albumin
Ca	Calcio
Cat. B	Catepsina B
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
CuSO ₄ 5H ₂ O	Sulfato de cobre

DAB	Diamino benzedin tetrahidroclorato
DCP	Discondroplasia
DMEM	Medio modificado Dulbecco's-Eagle's
DTT	Ditiotreitol
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidinio) butano.
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FCS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FNT- α	Factor de necrosis tumoral alfa
g	Gramos
GAG	Glicosaminglucano
h	Horas
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
IGF	Insulina como factor de crecimiento
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferón gamma
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Ortofosfato de potasio dihidrogenado

KS	Keratan sulfato
LP	Proteína de enlace
Lt	Litro
M	Molar
mg	Miligramos
Mg	Magnesio
min.	Minutos
ml	Mililitro
mm ³	Milimetro cúbico
Mm	Milímetros
mM	Milimol
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Di-sodio hidrógeno ortofosfato
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Ortofosfato di-sódico dihidrogenado
NSS	Del inglés Normal Sheep Serum
O.C.T	Medio de montaje
OA	Osteoartritis
OC	Osteocondrosis
p/v	Peso sobre volumen
PBS	Solución salina fosfato-buferada

PFA	Paraformaldehído
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Índice de acidez o alcalinidad
Po	Potasio
Pu	Proteína de unión
PUMP-1	Metaloproteinasa putativa
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
Sch	Sheep anti-human
TGF-β	Factor de crecimiento de transformación beta
TIMP	Tejido inhibidor de las metaloproteinasas
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Tris-HCl	Trizma hidrocioruro
UI	Unidades internaiconales
v/v	Volumen sobre volumen
Z-Ala-Arg-Arg-4MβNA	N-carbobenzoxi-fenilalanil-arginil-4-metoxi- beta-naftilamida.
Za	Zona articular o superficial
Zc	Zona calcificada
Zh	Zona hipertrófica o profunda
Zn	Zinc
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Zinc
Zp	Zona proliferativa o media

INTRODUCCIÓN

1

1.1 Introducción General

El potencial de un caballo para desempeñarse exitosamente depende de su condición atlética y de la capacidad de mantenerse libre de enfermedades y otras condiciones que interfieren con su salud. No es por demás que los problemas de desarrollo ortopédico sean de las causas más importantes de pérdidas en poblaciones de caballos. Dentro de ésta clase de desórdenes la Osteoartritis (OA) y la Osteocondrosis (OC) son los dos problemas más importantes, siendo el primero de orden degenerativo y el segundo una enfermedad ortopédica (Rossdale *et al.* 1985, Todhunter y Lust 1990, Olivier *et al.* 1997).

1.1.1 Desarrollo del cartílago y osteocondrosis

En el embrión en desarrollo, las estructuras cartilaginosas sirven como el principio a partir de donde los huesos largos son formados durante el proceso de formación de hueso endocondral. Las células mesodermales precursoras de extremidades proliferan y se diferencian en condrocitos los cuales producen la matriz extracelular. Después, se

empieza a osificar el cartílago lo que da origen a la formación del hueso. Después del nacimiento el crecimiento del hueso depende del cartílago en crecimiento, de los núcleos del crecimiento metafisiales y a una mucho menor extensión del cartílago del complejo articular/epifiseal, los cuales son la cubierta de los lados del hueso. El progreso de los condrocitos a través del proceso de liberación condrocítica se inicia como condrocitos proliferativos y termina como condrocitos hipertróficos. En la zona hipertrófica baja, la calcificación comienza en el septo longitudinal debido a la deposición del mineral hidroxiapatita, un compuesto de calcio y fosfato, (Boskey 1981; Brighton 1978). Después, los condrocitos hipertróficos son eliminados cuando el septo longitudinal calcificado de la zona hipertrófica baja sirve como soporte para invadir capilares y osteoblastos (Hunziker, E.B. 1994; Kuettner y Pauli 1983). Estos osteoblastos transforman el cartílago calcificado en hueso para una próxima mineralización, el rompimiento de la matriz extracelular del cartílago (colágeno Tipo II y proteoglicanos específicos del cartílago) y la síntesis de un hueso específico de la matriz extracelular (colágeno Tipo I).

La osteocondrosis es una enfermedad en la cual el proceso de osificación endocondral es interrumpida (Olsson y Reiland 1978; Stromberg 1976). El núcleo o placa de crecimiento metafiseal y el cartílago articular pueden ser afectados. Una falla en una de las etapas de osificación endocondral conlleva a la retención y engrosamiento del cartílago y defectos en la composición del hueso subcondral implícito; ambos resultando en la formación de defectos biomecánicos débiles. El estrés físico puede inducir ruptura de la parte inferior del cartílago, el cual conduce a la pérdida de cuerpos en la cavidad articular, lo que irrita el cartílago debido al disturbio de la congruencia de la articulación. Este estado de la

enfermedad se conoce como osteocondrosis disecante y generalmente causa dolor y laminitas (Figura 1.1).

Las lesiones osteocondróticas tempranas se caracterizan histológicamente por una falla en la maduración de los condrocitos en células hipertróficas (Farnun *et al.* 1984) y por una pequeña o nula calcificación de la matriz extracelular. Además, se encuentran áreas de condronecrosis adyacentes a vasos sanguíneos degenerados (Carlson *et al.* 1989).

El controlar el proceso de osificación endocondral es muy difícil. Este involucra una gran variedad de factores endógenos y sistémicos estimuladores de la proliferación condrocítica y diferenciación. Además, las alteraciones en la matriz extracelular deben de ocurrir para permitir la mineralización e invasión del cartílago por los vasos sanguíneos. Se ha sugerido como causa patológica en el proceso de osificación endocondral a los eventos moleculares como: disfunción endocrina (Glade 1986), alteraciones vasculares (Kincaid *et al.* 1985; Carlson *et al.* 1986; Woodard *et al.* 1987), disturbios en el proceso de maduración de condrocitos (Farnum *et al.* 1984), alteraciones en las moléculas de la matriz (Eknam *et al.* 1990; Chen *et al.* 1993; Henson *et al.* 1997), y una mala función de

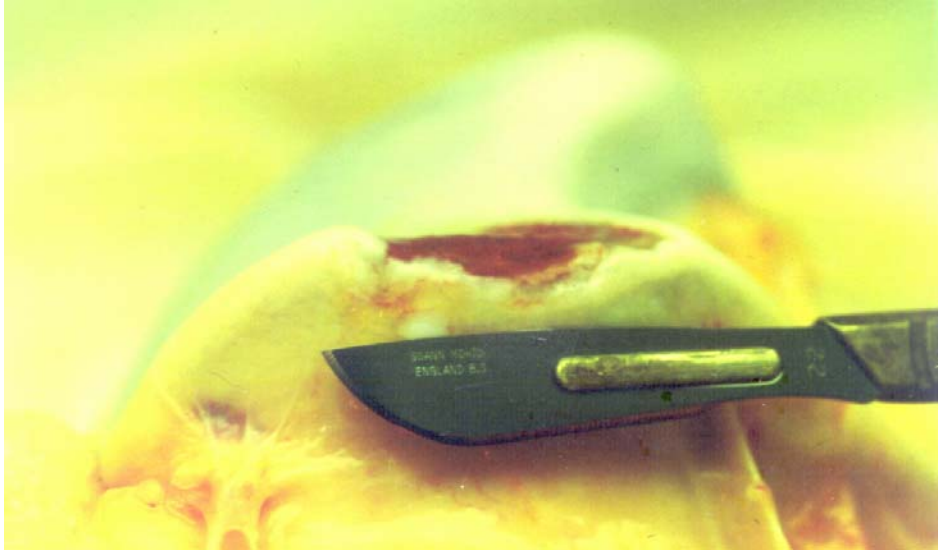


Figura 1.1 Lesión típica de discondroplasia presente en la cresta lateral de tróclea del fémur de un caballo de 3 años.

varias enzimas involucradas en la transición de la matriz del cartílago en matriz ósea (Gal *et al.* 1985; Ekman y Ridderstrale 1992; Farquharson *et al.* 1992).

La osteocondrosis es uno de los padecimientos ortopédicos que se presentan durante el desarrollo de los equinos. En su fase inicial también puede manifestarse como discondroplasia (DCP) (Lillich *et al.* 1997). Según McIlwraith 1986, el término Osteocondrosis fue descrito por primera vez en el caballo por Nilsson en 1947, sin embargo, llegó a ser de interés clínico hasta los años 70. Ésta enfermedad consiste en una falla en el proceso normal de osificación endocondral en animales jóvenes en crecimiento, en los cuales pudieran no ocurrir nuevas lesiones en su etapa madura o sean inaparentes, y donde las lesiones pre-existentes pueden llegar a manifestarse clínicamente en la edad madura.

La osificación endocondral se desarrolla en dos lugares del hueso en crecimiento: en las placas de crecimiento y en el cartílago articular epifisial. La osificación endocondral es mayor en la superficie articular epifisial y hay un decremento considerable del grosor del cartílago, el cual ocurre durante el desarrollo de potro a adulto (Firth y Greydanus 1987). En la OC existen áreas donde este proceso se retrasa originando la formación de los llamados tapones de cartílago. Los primeros signos histológicos, junto con una depresión en la osificación, son la pérdida de la organización columnar de los condrocitos en la zona profunda del cartílago articular y la formación de colonias de condrocitos, también llamados condrones.

Así mismo, la mala nutrición del cartílago engrosado puede ocasionar necrosis y fisuras en las áreas débiles al momento del impacto biomecánico provocando finalmente que los

fragmentos formados se puedan desprender. Los defectos osteocondríticos graves pueden eventualmente causar osteoartritis, sin embargo, esta es en la mayoría de los casos un evento secundario (Wagner *et al.* 1995).

La OC se observa más frecuentemente en las articulaciones tarsocrurales y femoropatelares, pero también es común en las articulaciones metacarpofalángicas y metatarsofalángicas. De manera menos frecuente, se ha observado OC en casi todas las articulaciones sinoviales del caballo, incluyendo las articulaciones de las facetas intervertebrales, lo cual se ha relacionado con el síndrome de Wobbler (Wagner *et al.* 1995) (Figura 1.2 y Figura 1.3).

La patogénesis de la Ostecondrosis todavía no es clara, pero se ha acordado que ésta enfermedad es de origen multifactorial (Hurtig y Pool 1996). Las causas pueden ser entre otras el grado de crecimiento, nutrición, desbalance mineral, fallas endocrinas, actividad física, así como factores genéticos. Los factores de nutrición y ejercicio han recibido una mayor atención (Jeffcott 1991).

Se ha observado que la alimentación alta en energía y en carbohidratos digeribles tiene una importante influencia en el metabolismo y en la función de la insulina como factor de crecimiento (IGF-1) en el proceso de mineralización del cartílago

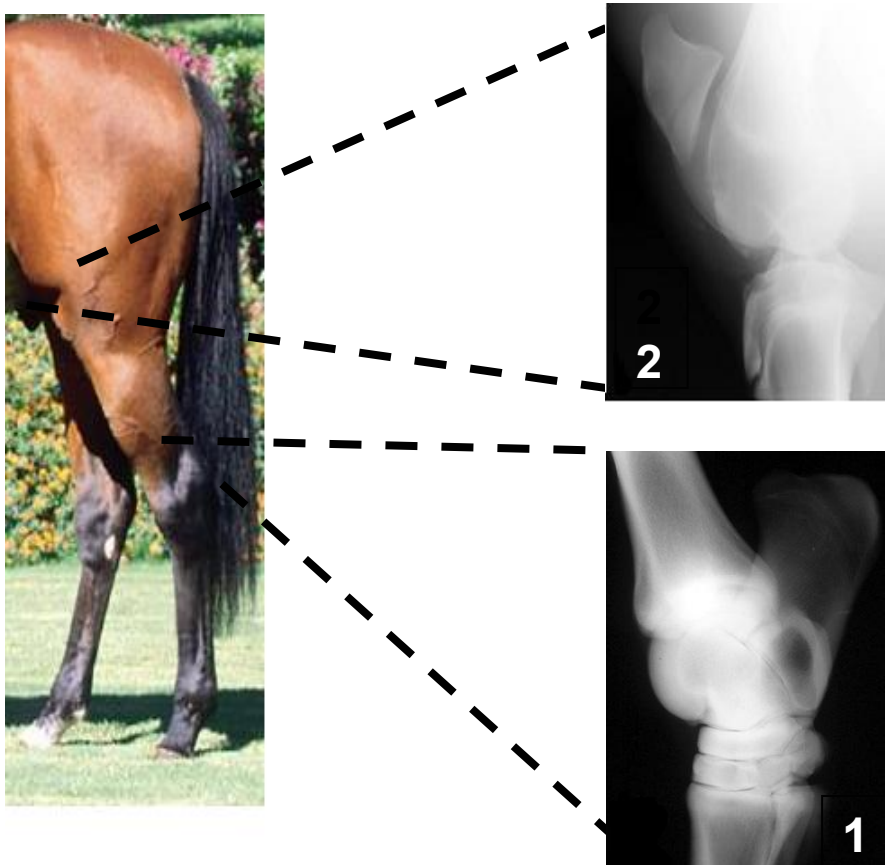


Figura 1.2 Miembro posterior del caballo en donde se indican en orden de importancia los sitios más comúnmente afectados por discondroplasia y osteocondrosis.

- (1)** Corvejón (Articulaciones, Intertarsiana proximal, Intertarsiana distal y Tarsometatarsiana).
- (2)** Babilla (Articulaciones Femorotibial y Femoropatelar).

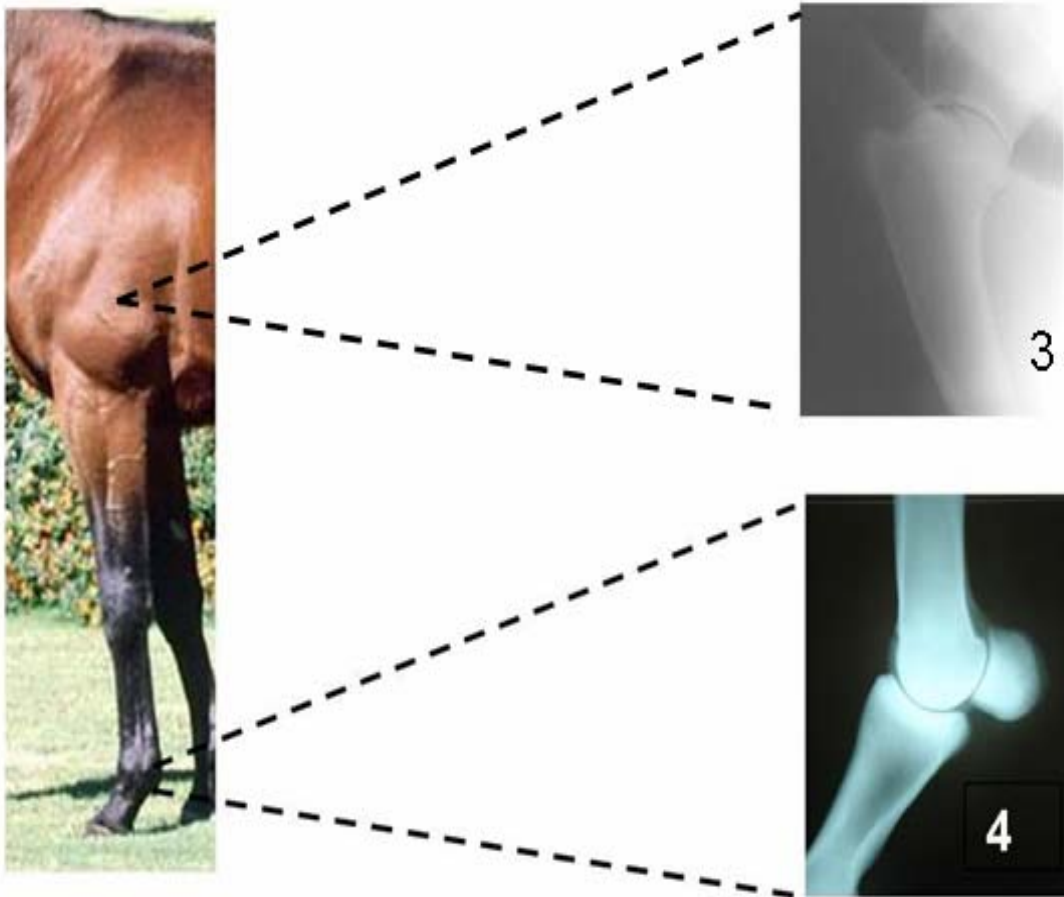


Figura 1.3 Miembro anterior del caballo en donde se indican en orden importancia los sitios más comúnmente afectados por la discondroplasia y osteocondrosis.

(3) Hombro (Articulación Escápulo-humeral).

(4) Menudillo (Articulación Metacarpo-falángica).

(Glade y Belling 1986, Ralston 1996). El cobre es otro elemento nutricional que se ha involucrado en la patogénesis de OC. Este elemento es un componente esencial de la enzima lisil oxidasa, la cual es fundamental para la formación de los enlaces cruzados de piridina. Sin embargo, aunque la deficiencia de cobre puede producir lesiones como las de OC, éstas no se asemejan a las que ocurren normalmente. Además, la alimentación con cobre en potros jóvenes y yeguas en gestación tardía, llevan a resultados contradictorios (Knight *et al.* 1990. Pearce *et al.* 1998). Se ha hecho mucho esfuerzo en querer descifrar el mecanismo molecular de la OC. Según Lillich *et al.* (1997) y Van de Lest *et al.* (1999) existen varias diferencias en cuanto a las características moleculares entre el cartílago normal y el osteocondrótico.

Se ha demostrado que la osteocondrosis es un proceso más dinámico que lo que antes se pensaba. Un estudio radiográfico longitudinal demostró que las lesiones pueden ser recurrentes en potros jóvenes. Los potros de 5 meses de edad tienen significativamente más lesiones que los potros de 11 meses (Dik *et al.* 1999) (Figura 1.4). Después de cierto tiempo, y dependiendo del tipo de articulación, las lesiones que aún existan se mantendrán permanentemente, lo que eventualmente puede causar el desarrollo de lesiones clínicas. Estas observaciones indican solamente las irregularidades en el proceso de osificación endocondral debido a una variación biológica representativa de un proceso fisiológico. El desarrollo de lesiones clínicas se presenta cuando estas alteraciones son lo suficientemente grandes como para no poder corregirse con el tiempo.

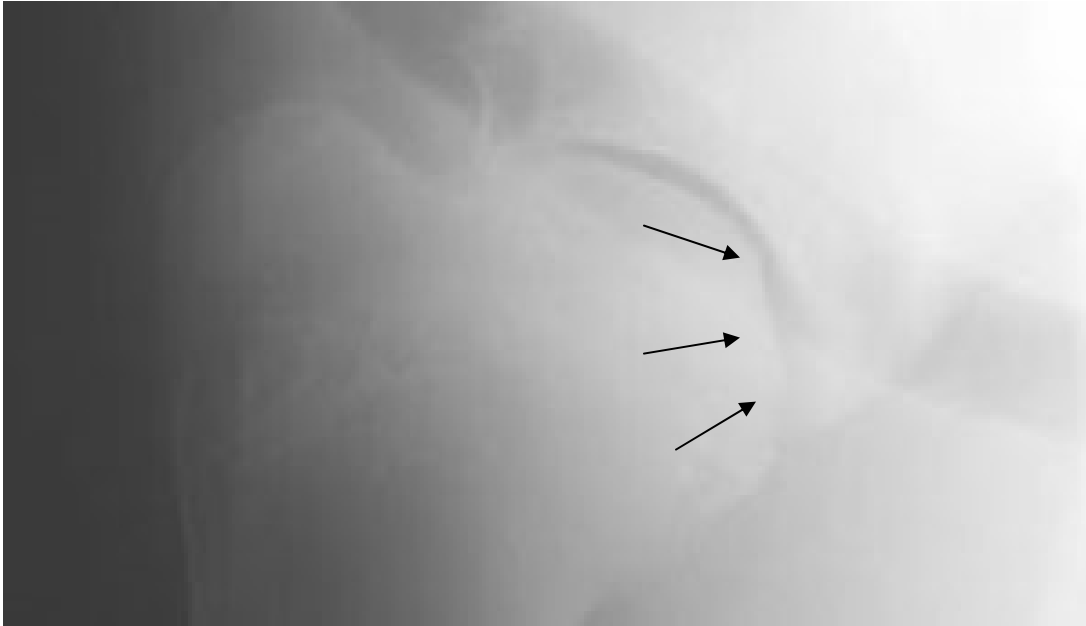


Figura 1.4 Radiografía de un equino con osteocondrosis donde se aprecia una evidente irregularidad de la parte caudal de la cabeza del humero (flechas).

En este caso, el metabolismo y la velocidad de remodelamiento del cartílago articular disminuyen tanto que no permite su reparación. Estudios han demostrado que la concentración de cobre en el hígado de un potro al nacimiento no está relacionado con la ocurrencia de lesiones, pero si en la reparación de las lesiones ya existentes, por lo tanto se ha sugerido que el cobre no está involucrado en el origen de las irregularidades de la osificación endocondral, pero podría ser parte importante de la fase de reparación del mismo (Van Weeren *et al.* 2002).

Se ha observado que los condrocitos producen una gran variedad de enzimas degradativas, tales como las metaloproteinasas (Sires *et al.* 1995), las proteínas cisteínicas, aspárticas y las adenosin trifosfatasa (ATPasas) (Sasaki y Ueno-Matsuda, 1993), las cuales tienen la capacidad de degradar el colágeno y los proteoglicanos, componentes esenciales de la matriz extracelular del cartílago articular. Es por esto que una producción o secreción excesiva de estas enzimas ocasionaría ya sea la degradación del cartílago de modo irreversible, o bien, una secreción inadecuada de las mismas lo que causaría la retención de cartílago no degradado durante el proceso de osificación endocondral (Morris y Treadwell, 1994; Roughley *et al.* 1993; Koolwijk *et al.* 1995) (Figura 1.5). Hernández-Vidal *et al.* (1998) demostraron además, que existen diferencias en varias enzimas proteolíticas, especialmente en la catepsina B.

La presencia de la proteínasa cisteínica Catepsina B en condrocitos se ha demostrado tanto en el caballo como en otras especies (Hernández-Vidal, *et al.*

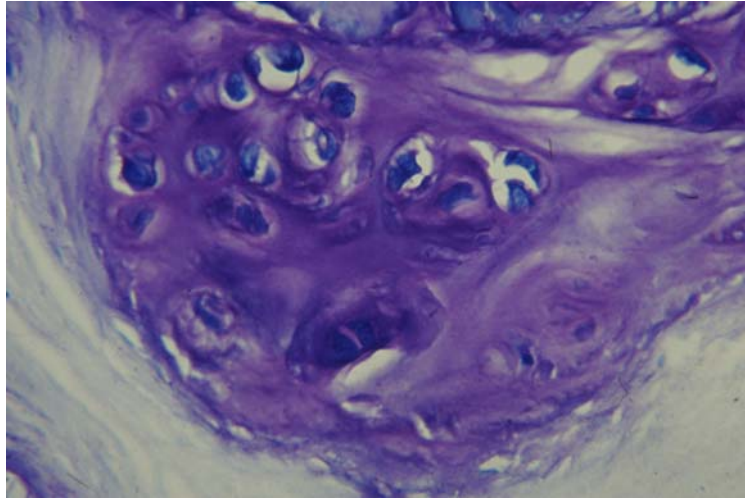


Figura 1.5 Sección teñida con azul de toluidina (x40) en donde se observa la desorganización de los condrocitos en la zona profunda.

1996). Esta enzima se ha localizado incluso en el cartílago humano y es capaz de degradar el proteoglicano, componente principal de la matriz extracelular (Roughley *et al.* 1993; Baici *et al.* 1995).

1.2 Estructura y función articular

Las articulaciones sinoviales o diartroidales están formadas por: 1) las extremidades articulares de al menos dos huesos cubiertos con cartílago hialino; 2) la cápsula articular rodeando la cavidad articular; 3) el fluido sinovial en la cavidad articular, y 4) ligamentos extra e intra articulares (Figura 1.6). La cápsula articular consiste en una porción gruesa y fibrosa, la cual está en la parte más íntima de la membrana sinovial. El fluido sinovial es un ultrafiltrado del plasma altamente viscoso que contiene altas concentraciones de ácido hialurónico, el cual es producido por las células sinoviales (Gamble 1988).

La función del fluido sinovial es la de distribuir el impacto en la articulación así como lubricarla. Además, debido a que el cartílago articular es avascular, las células del cartílago dependen del suplemento de nutrientes y de la eliminación del deshecho de los productos metabólicos mediante la difusión del fluido sinovial a través del cartílago. La circulación y, especialmente, el transporte de las moléculas grandes en el fluido sinovial, son estimuladas por la acción de bombeo producida por la compresión y relajación alterna del cartílago durante el movimiento articular (Gamble 1988)

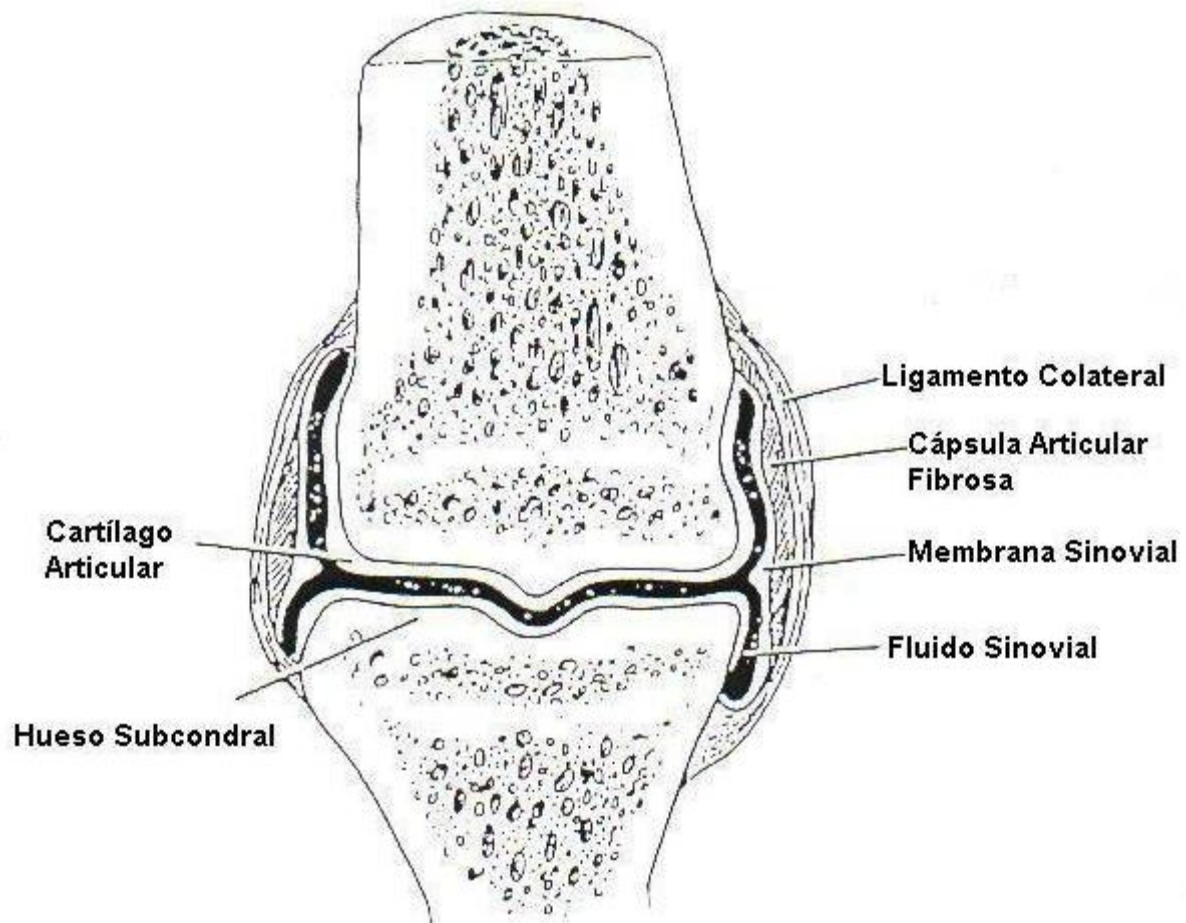


Figura 1.6 Diagrama esquemático de una articulación sinovial.

De: Adams Lameness in horses (1987). Ed: Febiger. Philadelphia.p. 339.

Una articulación consiste en dos o más estructuras óseas congruentemente opuestas las cuales están cubiertas por una capa de cartílago articular hialino. La articulación está rodeada por una cápsula articular y ligamentos y contiene fluido sinovial. La principal función de muchas articulaciones es la de amortiguar además de proveer menos fricción durante el movimiento. Ésta función es realizada por la interacción del fluido sinovial, membrana sinovial, hueso subcondral y cartílago articular (Gamble 1988). Las propiedades únicas de éstos tejidos es la de ser capaces de producir un suave movimiento de la extremidad con una adecuada absorción y disipación del impacto aplicado, las cuales tal vez pueden producir impacto alto durante ciertos pasos o acciones atléticas (Palmer y Bertone 1996).

1.2.1 Hueso subcondral

El hueso subcondral provee de soporte estructural al cartílago articular. La rigidez del hueso hace posible el que haya un soporte relativamente alto hacia los impactos sin que haya deformación sustancial (Boskey 1981, Radin y Rose 1986).

1.2.1.1 Composición del hueso subcondral

El mineral que provee de rigidez al hueso es la hidróxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Este componente inorgánico está presente en la matriz del hueso en aproximadamente 65% de su total, el resto se compone de 25% de agua y el 10% de materia seca donde el 95% es colágeno (predominantemente de tipo I) y el 5% son proteoglicanos y proteínas no-colágenas (Boskey 1981, Todhunter 1996). La matriz extracelular no calcificada es llamada

osteóide. Muchas de las proteínas no colágenas son glicoproteínas que tienen un nivel alto de azúcar/proteína. La sialoproteína I ósea u osteopontina (Fisher *et al.* 1987) funciona *in vitro* para regular la adhesión celular, movilidad y alineamiento. La osteopontina, sialoproteína ósea y la proteína ácida del hueso son glicosadas, las proteínas fosforiladas son producidas por los osteoblastos y son importantes en el proceso de mineralización del hueso (Veis 1993).

Las glicoproteínas ácidas pueden mediar la unión de los osteoclastos a cristales de hidróxiapatita a través de las uniones de ácido aspártico-glicina e integrinas (Teitelbaum 1993). La osteonectina (Fisher *et al.* 1987), es también una glicoproteína fosforilada, rica en residuos de ácido aspártico y glutámico, que une al colágeno y al mineral óseo (Tracy y Mann 1991). La osteocalcina contiene ácido carboxiglutámico gamma, es sintetizada casi exclusivamente por osteoblastos y odontoblastos. Sólo un residuo de prolina en la posición 9 de éste pequeño péptido puede ser hidroxilado por la prolyl hidroxilasa ascórbico dependiente, colocando la osteocalcina en un pequeño grupo de proteínas (colágeno, elastina, proteína complemento C19) que sufren ésta modificación postranslacional (Cole y Hanley 1991). La función precisa de la osteocalcina todavía no se conoce pero sí algunas de sus propiedades, como la inhibición de la precipitación de hidróxiapatita y su acción como efector molecular de la acción de la 1,25-dihidroxitamina D3. Ésta es una herramienta clínica muy útil para el estudio de los cambios óseos y los niveles normales de suero (Hope *et al.* 1993). Otro componente del hueso subcondral es la hexosamina, sin embargo ha sido reportado que no existe una relación de su contenido en el cartílago articular carpal del caballo y las propiedades morfológicas y mecánicas del hueso. (Richardson *et al.* 1993).

El hueso epifisial y el subcondral subyacente se regeneran en respuesta a cambios provocados por el impacto. Las células en el hueso subcondral participan en su propia reparación y en las del cartílago articular después de fracturas osteocondrales. Mucha de la energía generada por el movimiento cargando peso se atenúa por los tejidos blandos pero en caso del impacto esta también se atenúa por el hueso (Richardson *et al.* 1993). La rigidez del hueso lo hace capaz de soportar relativamente altos impactos sin una deformación sustancial y ésta es parcialmente a consecuencia de su contenido mineral (Boskey 1981).

1.2.1.2 Enzimas presentes en el hueso subcondral

Los factores de crecimiento peptídicos y citocinas que están presentes en el cartílago articular también están presentes en el hueso (Hauschka *et al.* 1986; Sporn y Roberts 1988). Estos incluyen factores derivados de la placa de crecimiento tales como el factor de crecimiento de transformación beta (TGF- β) e insulina como factor de crecimiento (IGF), estos péptidos son producidos por células óseas y están presentes en la matriz ósea (Centiella *et al.* 1991). La matriz ósea también contiene las proteínas óseas morfogénicas 2 a 7, las cuales son miembros de la superfamilia de TGF- β . Estos factores de crecimiento juegan un papel importante en la proliferación celular y en el mantenimiento de la expresión fenotípica o diferenciación (Mundy 1993; Reddi y Cunningham 1993; Baylink *et al.* 1993). El hueso contiene también la citocina TGF- α , las interleucinas, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón- γ . Cuando la barrera de cartílago calcificado se rompe, el cartílago articular se expone a estas citocinas. En relación con la acción de éstos factores se han observado desórdenes patológicos como la

osteoartritis, fracturas articulares, esclerosis subcondral así como la habilidad de modular la reparación articular.

Las metaloproteinasas (MMP's) de la matriz son secretadas por osteoblastos, específicamente después de la estimulación de las citocinas óseo-reabsorbentes como la Interleucina 1 (IL-1) y TNF- α . Las gelatinasas de 92 y 72 KDa son producidas por los osteoblastos así como por las células óseas humanas. (Rijas *et al.* 1989 y Lorenzo *et al.* 1992).

1.2.1.3 Composición celular

El plato subcondral y el hueso epifisial forman parte integral de la estructura articular, y estas estructuras son remodeladas por la formación ósea y las células óseo-reabsorbentes. El hueso primario formado por el *osteoblasto* está localizado directamente en la superficie ósea. Tan pronto como el osteoblasto este rodeado por una matriz mineralizada se le llama *osteocito* y se coloca en una laguna con proyecciones que se extienden hasta la canal. Los osteoblastos hacen contacto entre ellos a través de pequeñas protusiones o contacto célula-célula, mientras que osteoblastos y osteocitos son conectados por numerosos procesos osteocíticos que suceden a través de la canal en la matriz ósea (May *et al.* 1992). El tercer tipo de célula ósea es el *osteoclasto*, una célula larga y multinucleada con la clásica "orilla ondulada". Los osteoclastos se encuentran en la superficie óseo-reabsorbente (Hall 1990). Existe una cercana relación entre el osteoclasto y el osteoblasto durante la resorción y formación ósea (Simmons y Grynpas 1990).

1.3 Arquitectura ósea

El hueso subcondral es una mezcla de hueso trabecular y osteónico donde el hueso epifiseal está por debajo del hueso trabecular. La arquitectura del hueso trabecular se caracteriza por una malla de pequeños platos interconectados y bastones de trabeculas individuales con espacios relativamente largos entre ellos. Aunque el hueso cortical es menos del 30% poroso, el hueso trabecular puede ser de 50-90% (Keaveny y Hayes 1993).

1.4 Sinovia

La sinovia es el mesénquima modificado. La íntima se encuentra sobre una barrera de tejido conectivo (subíntima, o lamina propia), siendo esta una barrera incompleta, con un espesor de 1 a 4 sinoviocitos, y sin membrana basal. Los sinoviocitos son células que tienen tanto función fagocítica como de secreción. La pato-biología de las células sinoviales fue revisada por Henderson y Pettipher en 1985. Las células sinoviales que pueden fagocitar y pinocitar son tipo A (macrófagos). Las células sinoviales sintetizan hialuronato, el cual es secretado dentro del fluido sinovial en la membrana plasmática, así como otros componentes de la matriz extracelular del sinovium. La lubricina es una glucoproteína que actúa en la lubricación del cartílago, y es probablemente sintetizada por el sinovium (Henderson y Pettipher 1985).

1.5 Membrana sinovial

La cavidad articular esta cubierta por la membrana sinovial, la cual está compuesta de dos capas de sinoviocitos, la íntima y la subíntima. Ésta última puede ser de consistencia fibrosa, aerolar o adiposa. La membrana sinovial es delgada con una barrera de 1 a 3 líneas de células gruesas en el interior de la superficie de la cavidad articular. La falta de una membrana basal íntima, de aberturas entre los sinoviocitos y la proximidad de los vasos sanguíneos a la superficie íntima (5 a 10 μm) facilitan el flujo del exudado capilar dentro de la cavidad sinovial (Todhunter 1996). La membrana sinovial es capaz de regular el ambiente biomecánico de la articulación pasivamente a través de la difusión de sustancias de los capilares y activamente a través de la secreción de sustancias de los sinoviocitos. Las dos funciones principales de las células sinoviales son la fagocitosis (células tipo A) y la síntesis de hialuronato (células tipo B). Las células sinoviales también sintetizan la matriz extracelular del sinovium (Henderson y Pettipher 1985).

1.6 Fluido sinovial

El fluido sinovial es un ultra-filtrado del plasma, por lo que muchos de sus iones y moléculas están presentes en una concentración similar, excepto el hialuronato, el cual se encuentra en altas concentraciones. Así mismo, el fluido sinovial contiene células mononucleares como células sinoviales interiores, monocitos y linfocitos. Estas células constituyen el 90% del total, mientras que el resto de las células son leucocitos polimorfonucleares. Sin embargo el fluido sinovial normal equino contiene menos de 500 células nucleadas / μl (Todhunter 1996).

El balance del volumen del fluido sinovial depende del flujo linfático y el efecto del ángulo de la articulación en la presión del fluido sinovial (Levick 1987), ya que el intercambio de solutos entre el plasma y fluido sinovial parece estar controlado por las fuerzas de Starling, debido a una diferencia de presión hidráulica o hidrostática y a una diferencia de presión osmótica coloidal entre el plasma y el fluido sinovial (Levick 1984), aunque las articulaciones con ángulos intermedios y con un desbalance en la presión de la malla de la matriz extracelular favorecen la ultra filtración del plasma en la articulación (Knox *et al.* 1988).

La presión intrasinovial normal es subatmosférica (-2 a -6 cm. H₂O) (Simpkin 1993., Knox *et al.* 1988) por lo que contribuye en la estabilización de la articulación y se ha visto en estudios basados en perros que varios factores intervienen en la presión intraarticular en rodillas normales como por ejemplo la talla de la articulación, el volumen del fluido sinovial, la posición de la articulación, flexión o extensión, anatomía del tejido peri articular y de la articulación, la permeabilidad de la membrana, la elasticidad capsular así como el movimiento del fluido dentro y fuera de la articulación (Node y Newbold 1983).

La “barrera de permeabilidad” sinovial de moléculas pequeñas es mantenida por un estrecho espacio entre los sinoviocitos y los componentes de la matriz extracelular. El hialuronato también funciona como una barrera en el intercambio de moléculas pequeñas (Kerr 1985) de menos de 10KDa, que usualmente están entre el plasma y el fluido sinovial y generalmente cruzan la sinovia por difusión simple, el transporte de glucosa en el fluido sinovial es una excepción, ya que entra más fácil y rápidamente como resultado de la

difusión facilitada, preferentemente del transporte activo (Simpkin 1993). Por otro lado, las moléculas lipofílicas, como el oxígeno y el dióxido de carbono, se difunden libremente dentro y fuera del fluido sinovial, debido a que pueden difundirse a través de los sinoviocitos así como entre los mismos (Simpkin y Pizzorno 1974). Por ello, el fluido sinovial es el medio a través del cual los nutrientes se extienden en el cartílago articular, y también se ha demostrado que los ligamentos intraarticulares reciben el nutrimento del fluido sinovial (Amiel y Pizzorno 1974).

1.7 Cartílago articular

El cartílago articular es un tejido aneural y avascular que cubre los huesos de las articulaciones diartroïdiales, cuya principal función es la de proveer elasticidad y distribuir las fuerzas compresivas, resistir el estrés y, proveer una baja fricción entre las superficies articulares. Sólo un tipo de célula está presente en el cartílago articular, el condrocito, el cual ocupa cerca del 2% del volumen. El metabolismo de esta célula es anaeróbico por la falta de vascularización, siendo además responsables de la producción de la matriz extracelular, compuesta principalmente de colágenos tipo II y proteoglicanos. Las fibras de colágeno proveen fuerza tensil y rigidez permitiéndole resistir fuerzas divididas, mientras que los proteoglicanos por ser altamente hidrofílicos juegan un papel importante en la resistencia de las fuerzas compresivas, ya que hace que el cartílago este compuesto de gran parte de agua (70-80% de peso húmedo) y debido a la alta presión osmótica, el tejido se hincha contribuyendo así a las propiedades elásticas del cartílago. La expansión de proteoglicanos está restringida por la red de colágeno que lo rodea causando una tensión intrínseca en la matriz extracelular (Palmer y Bertone, 1996).

El cartílago hialino que cubre las superficies articulares de las articulaciones diartrodiales es un tejido conectivo altamente especializado con características biomecánicas, que lo hacen particularmente adecuado para absorber los impactos (Palmer y Bertone, 1996). Las propiedades físicas del tejido dependen de la estructura y organización de las macromoléculas en la matriz extracelular (Kempson 1980; Jurvelin *et al.* 1988), por lo que las moléculas de colágeno se encuentran organizadas en una densa red fibrilar que está llena de una alta concentración de proteoglicanos, los cuales están cargados negativamente como resultado de sus cadenas poli-aniónicas de glicosaminoglicanos.

El cartílago articular está organizado en diferentes zonas con base en la organización de las fibras de colágeno, la composición de los proteoglicanos y la morfología de los condrocitos. Mientras que la composición y arquitectura de la matriz orgánica varía entre las diferentes regiones de una misma articulación, entre las diferentes articulaciones de un animal, entre especies, y la edad (McDevitt, 1973; Bjelle, 1975; Bullough *et al.* 1985; Vachon *et al.* 1990) (Figura 1.7 y Figura 1.8).

Histológicamente, el cartílago articular se divide en cuatro zonas: superficial o articular, media o proliferativa, profunda o hipertrófica y calcificante. La zona articular del cartílago adulto contiene el mayor número de condrocitos organizados de modo paralelo a la superficie y cuentan con una morfología alargada y plana

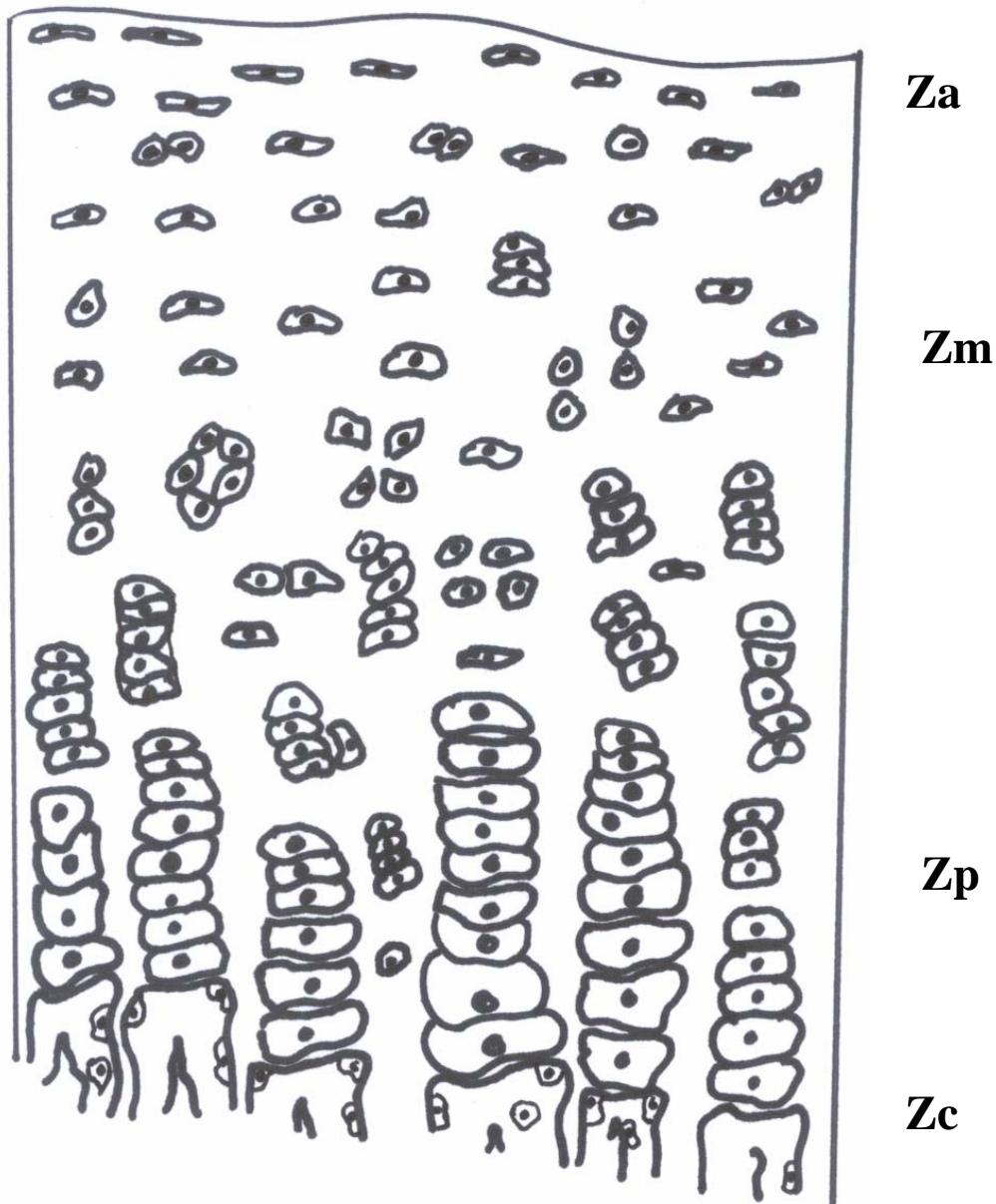


Figura 1.7 Diagrama que muestra la organización de los condrocitos en las diferentes zonas del cartílago articular del equino joven. Za. Zona articular o superficial, Zm. Zona media o proliferativa, Zp. Zona profunda o hipertrófica, Zc. Zona calcificada.

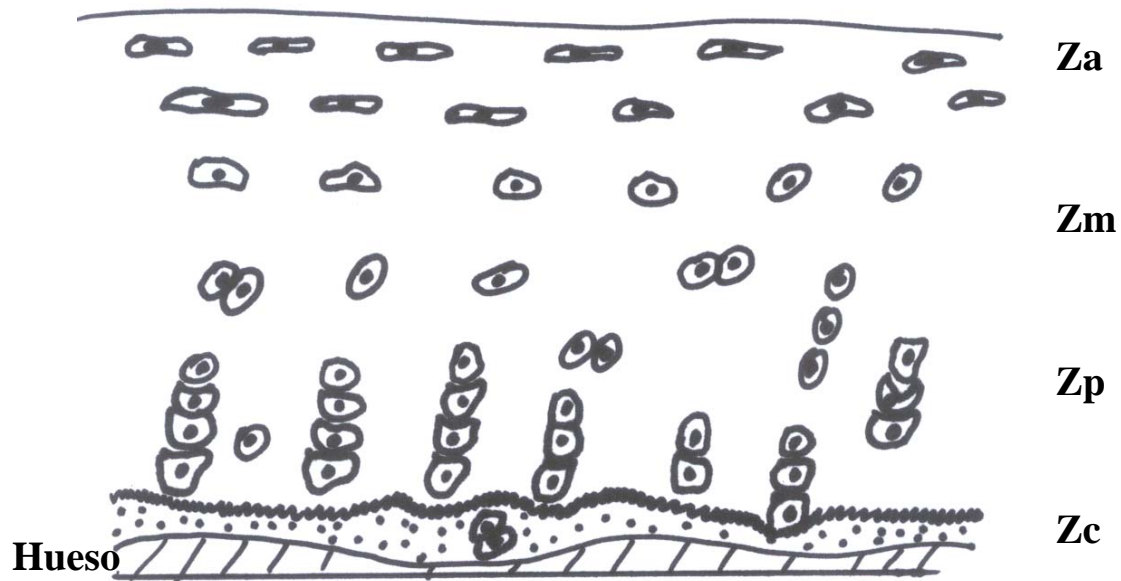


Figura 1.8 Diagrama que muestra la organización de los condrocitos en las diferentes zonas del cartílago articular del equino adulto. Za. Zona articular o superficial, Zm. Zona media o proliferativa, Zp. Zona profunda o hipertrófica, Zc. Zona calcificada.

con el eje mayor también paralelo a las fibrillas de colágeno y con menor contenido de proteoglicano. (Palmer y Bertone, 1994).

Por otro lado, la zona media o proliferativa (también llamada zona de transición) contiene condrocitos de mayor tamaño que en la zona articular, los cuales se encuentran ya sea solos o en pares con un contorno redondeado. En ésta zona, las fibras de colágeno son de mayor diámetro y menor organización, ya que se encuentran dispersas de modo aleatorio (Weiss *et al.* 1968) y entrelazadas de manera tridimensional, mientras que las fibras más largas están perpendiculares a la superficie y dan origen a fibras más cortas que se observan como ramas de árbol (Todhunter, 1996).

En la zona profunda los condrocitos son de mayor tamaño, esféricos y normalmente se encuentran organizados en columnas perpendiculares a la superficie articular. Las fibras de colágeno son de mayor diámetro y se disponen verticalmente a la superficie articular. La composición del proteoglicano de la zona articular y media del cartílago es más alto en cadenas de sulfato de condrotina que en cadenas de sulfato de queratan, ya que la concentración de este último es mayor en la zona profunda. Esto es debido a que hay una mayor permeabilidad en la matriz, siendo importante para la difusión de nutrientes hacia la barrera más profunda del cartílago (Poole 1993). La densidad celular es muy alta en la superficie articular y se va reduciendo progresivamente de la mitad hasta un tercio en las zonas media y profunda de la zona articular (Stockwell y Meachim 1979; Mitrovic *et al.* 1983) (Figura 1.8).

La zona de cartílago calcificado separa el cartílago hialino del hueso subcondral y se caracteriza por la presencia de pequeñas células picnóticas embebidas en la matriz cartilaginosa mediante sales de apatita. Como en la mayoría de los tejidos blandos, el peso del cartílago hialino consta de un 65-80% de agua, pero a diferencia de ellos, este tejido no puede considerarse como blando, sino que al contrario, presenta una elevada resistencia al estar presurizado a 2 atmósferas por acción de la presión osmótica e hidrostática de su contenido en proteoglicanos, siendo dicha presión la que le confiere sus propiedades mecánicas (Todhunter 1996).

En animales de huesos largos como el caballo, el cartílago articular del hueso en crecimiento no cuenta con la típica zona calcificada, ya que este se une con el cartílago epifisial localizado entre la superficie articular y la placa de crecimiento (Horton, 1993). Tanto en la zona profunda como en la zona calcificada, las fibras de colágeno son más grandes y se encuentran alineadas perpendicularmente a la superficie articular formando una red con mayor rigidez, la cual se encuentra impregnada por cristales de hidróxiapatita (Todhunter 1996).

1.7.1 Metabolismo de los condrocitos

Los condrocitos son los responsables de mantener la homeostasis del cartílago, controlando la degradación de las moléculas de la matriz. La pérdida de proteoglicanos es mucho mayor que la de colágenos, lo que significa que la actividad principal de los condrocitos es la síntesis de nuevos proteoglicanos. La degradación de la matriz es mediada principalmente por proteinasas, particularmente las metaloproteiniasas (MMP's)

(Woessner y Gunja-Smith 1991), las cuales actúan sobre la matriz extracelular a pH neutro y contienen zinc en sus sitios activos. Las MMP's más importantes en el cartílago son MMP-1, una colagenasa intersticial capaz de dividir o partir la triple hélice del colágeno tipo I y la MMP-3 o estromelina la cual degrada proteoglicanos, la proteína de unión y colágenos tipo II, IX y XI. Los activadores potentes de prostromelina y procólagenasa son la plasmina, una de las proteinasas de serina presentes en el cartílago articular normal y la proteínasa cisteínica Catepsina B (Eckhout y Vaes 1977). Además, la estromelina puede activar a la procólagenasa (Murphy *et al.* 1987). La actividad de las MMP's es inhibida por metaloproteinasas inhibidores de tejido (TIMP-1 y TIMP-2) y macroglobulina α -2. Además, existe la agreganasa la cual está presente en cartílago normal y es capaz de eliminar el agregan (Sandy *et al.* 1992).

Es muy importante mantener la homeostasis del cartílago, ya que sus propiedades bioquímicas dependen de la estructura y la organización de la matriz extracelular, la cual es regulada por los condrocitos que están bajo el control e influencia de citocinas, incluyendo factores de crecimiento y estímulos mecánicos. Las citocinas pueden ser producidas y liberadas en respuesta a una gran variedad de estímulos, entre los cuales se encuentra el efecto físico del impacto articular. Las citocinas pueden ejercer una acción anabólica y catabólica al ser producidas y liberadas por los mismos condrocitos o por otros tejidos articulares, interactuando con la célula blanco a través de receptores de membrana específicos (Sandy *et al.* 1992).

La insulina como factor de crecimiento I (IGF-I) (Tyler 1989; Mcquillan *et al.* 1986; Guenther *et al.* 1982 ; Tesch *et al.* 1992) y el TGF- β (Morales y Roberts 1988; Redini *et*

*al.*1988; Hill y Logan 1992) son factores anabólicos muy importantes que pueden estimular la síntesis de la matriz y la proliferación celular, mientras que la interleucina I (IL-1) (Verschure y Van 1990; Van-de L.A y Van-den B.W 1990; Benton y Tyler 1988; Bendtzen *et al.* 1985) y TNF- α ejercen una influencia catabólica en los condrocitos suprimiendo la producción de proteoglicanos e induciendo a la producción de MMP, con lo cual se estimula la producción de la matriz. La renovación continua de la matriz hace posible la adaptación de la composición de la misma a los requerimientos específicos que presentan las capacidades bioquímicas del cartílago. Esto se ejemplifica por el hecho de que la bioquímica del cartílago articular varía entre las diferentes articulaciones, entre los sitios de una articulación con peso o sin peso, y por la edad (Palmer *et al.* 1995; Esquissatto *et al.* 1997; Platt *et al.* 1998).

La influencia del ejercicio y el impacto en la composición de la matriz extracelular ha demostrado tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro* que los impactos de dinámica normal *in vivo* por ejercicio y los patrones de impacto intermitentes *in vitro* estimulan la síntesis del colágeno tipo II y proteoglicanos (Kiviranta, *et al.* 1988; Salter *et al.* 1980; Korver *et al.* 1992), mientras que la compresión estática como la falta de impacto de la articulación disminuyen la síntesis y mejoran la degradación de la matriz (Akeson *et al.* 1973; Palmoski *et al.* 1980; Gray . *et al.* 1988; Sah *et al.* 1989). Por otra parte, el estrés mecánico es un regulador importante del metabolismo condrocítico, lo que significa que los condrocitos son capaces de sentir el impacto; ya que la deformación de la matriz produce señales mecánicas, eléctricas y físico químicas que influyen las actividades de los condrocitos. La compresión de la superficie articular deforma la matriz, lo que puede alterar directamente a los condrocitos. Además, las integrinas, que son receptores de la

superficie celular de moléculas de la matriz, están involucradas como sensores de tensión en la red de ésta. El flujo del fluido de la matriz inducido mecánicamente puede causar alteraciones en la densidad de carga alrededor de las células y un flujo acelerado de nutrientes y metabolitos a través de la matriz; por lo que las citocinas producidas como reacción al impacto articular pueden mediar estos signos mecánicos a los condrocitos. Sin embargo, el mecanismo por el cual los condrocitos perciben estos signos mecánicos, todavía no es bien comprendido. (Gray *et al.* 1988; Sah *et al.* 1989).

1.7.2 Homeostasis del cartílago articular

Los disturbios de un estado normal conllevan a una variedad de respuestas correctivas, las cuales tienden a restaurar el balance y mantener la integridad del sistema. En el caso de las articulaciones, el impacto puede cambiar abrupta y claramente durante la actividad atlética. (Palmer y Bertone 1996), por lo que los tejidos continuamente se adaptan a esas demandas funcionales para mantener su integridad funcional y estructural. Si los impactos no exceden sus límites funcionales, los tejidos no son afectados, pero si se exceden estos límites hay una reducción en la capacidad de adaptación del tejido, la estructura se expone a esfuerzos potencialmente dañinos (Cornwell 1984, Palmer y Bertone 1996). Esta tensión o esfuerzo inicialmente produce ajustes temporales, los cuales incrementan la capacidad del tejido para resistir las demandas físicas funcionales, y esfuerzos o impactos más severos pueden conducir a daños o cambios irreversibles. Los mecanismos fisiológicos compensatorios apropiados pueden finalmente alcanzar una reparación funcional o una regeneración. Sin embargo, hay un punto en el cual el tejido se daña y pierde la capacidad de reparación o

puede aumentar su resistencia (Cornwell 1984), lo cual ocurre rápidamente en tejidos con una capacidad limitada de regeneración y reparación, como en muchos tejidos que se caracterizan por una gran matriz celular *versus* masa celular y bajo grado de vascularización, así como en los tendones y el cartílago articular (Oloyede y Broom 1996).

1.7.3 Homeostasis del cartílago bajo condiciones fisiológicas

Los condrocitos dentro del cartílago articular sintetizan, organizan y regulan la deposición de la compleja matriz extracelular de una manera altamente eficiente y organizada, y, a pesar de su aislamiento, mantienen una composición óptima de la matriz del cartílago sano. En cada etapa de crecimiento y desarrollo, las velocidades relativas de la síntesis y degradación de la matriz están controladas coordinadamente para alcanzar el crecimiento, remodelación y equilibrio balanceado (Maroudas 1980, Todhunter 1996).

La matriz extracelular está compuesta principalmente de colágeno, proteoglicanos y agua, y se comporta como una esponja. Bajo compresión, el agua es expulsada para reabsorberse otra vez cuando el impacto es discontinuo. El metabolismo condrocítico puede mantenerse gracias al flujo de fluido sinovial a través de la matriz extracelular, el cual depende de una acción de bombeo durante la actividad normal; de ésta forma, las sustancias necesarias para el metabolismo condrocítico son proveídas y los catabolitos son eliminados, por lo que se puede asumir que sin ésta acción de bombeo, la integridad del cartílago articular estaría en peligro. No se conoce precisamente como es que los condrocitos realizan los cambios de la matriz pero como el cartílago articular es aneural, avascular y linfático, este proceso aparentemente se ve afectado por el impacto

biomecánico y por sustancias que se encuentran dentro del fluido sinovial (Mow *et al.* 1984).

1.7.4 Actividad enzimática del cartílago articular

El cartílago articular contiene varias enzimas líticas como las catepsinas, MMP's, sulfatos ácidos y alcalinos y colagenasas (Ehrlich *et al.* 1977, Brown *et al.* 1989, Eyre *et al.* 1991a, Shapiro *et al.* 1991, Platt 1996). Muchas de éstas enzimas son secretadas como proenzimas inactivas y son subsecuentemente activadas y/o controladas por inhibidores específicos. Los inhibidores de enzima específicos existen para cada proteasa. Los inhibidores de las metaloproteinasas titulares (TIMP-1 y TIMP-2) (Lakowski y Kato 1980, Brown *et al.* 1989, Kuettner *et al.* 1991, Martel-pelletier *et al.* 1991, Woessner y Gunja-Smith 1991), macroglobulina α -2, inhibidor de proteinasa α -1 (Franchimont y Bassleer 1991), inhibidores de proteinasas cisteínicas (Martel-Pelletier *et al.* 1990) e inhibidores activadores de plasminógeno I, II y III (Thonar *et al.* 1991, Testa *et al.* 1994) han sido aislados y caracterizados en diversos estudios.

En general las enzimas proteolíticas como las colagenasas y la estromelina son secretadas como proenzimas y en diversos estudios han propuesto su activación por medio de factores como plasmina (Martel-Pelletier *et al.* 1991), tripsina (Franchimont y Bassleer 1991), acidez (Woessner y Gunja-Smith 1991), iones super-óxido (Greenwald y Moak 1986), Cu, Ca, interferón gamma (IFN- γ), catepsina B (Martel-Pelletier *et al.* 1990), y activador del plasminógeno (Treadwell *et al.* 1991). El equilibrio de este complejo sistema

biomecánico, el cual todavía no se comprende del todo, permite la homeostasis del cartílago (Palmer y Bertone 1994, Testa *et al.* 1994).

La capacidad limitada de reparación, la cual es característica del cartílago articular, es bien conocida y fue observada por John Hunter en 1743 mencionando que: *“Desde Hipócrates hasta ahora existe un acuerdo universal de que el cartílago ulcerado es algo molesto que una vez destruido, no es reparado”* Se puede asumir que la capacidad de reparación está limitada por los cambios virtualmente ausentes de la red de colágeno en el adulto (Maroudas 1980, Maroudas *et al.* 1992). Sin embargo, en el crecimiento individual inmaduro, el desarrollo y madurez pueden ser solamente alcanzados con una alta velocidad de degradación y síntesis de la matriz, y se ha observado que el condrocito en cartílago inmaduro es más sensible a cambios que aquellos en el cartílago adulto (Simunek y Muir 1972, Igarashi y Hayashi 1980, Roughly 1986, May *et al.* 1992, Platt 1996). Además, se ha reportado que el cambio de proteoglicanos es elevado en animales jóvenes (Maroudas 1980, Platt 1996). Sin embargo, existen datos opuestos sobre los cambios de la malla de colágeno en animales jóvenes y se ha propuesto que el metabolismo debe ser mucho mayor en el adulto. Por lo tanto, puede considerarse clínicamente que el cartílago articular inmaduro tiene mayor capacidad de reparación que el cartílago adulto (Maroudas 1980).

1.7.5 Disturbio de la homeostasis en el cartílago articular bajo condiciones patológicas

Las alteraciones en la regulación y control del metabolismo condrocítico pueden dar resultado a procesos patológicos que involucran un deterioro gradual de la matriz extracelular. Si la homeostasis del cartílago articular es inadecuada o falla, ocurrirá un desbalance metabólico en donde la degradación inducida por proteasa prevalece sobre la reparación (Murphy *et al.* 1990, Lohmander *et al.* 1992, Palmer y Bertone 1994, Poole 1990, Poole *et al.* 1995, McIlwraith 1996). Esto puede conducir a que la proteólisis e inflamación se incrementen. Primero, los bioproductos del catabolismo del cartílago pueden causar reacciones mediadas por células, activando linfocitos y monocitos (Woesnerr y Howell 1983, Shapiro *et al.* 1991, Palmer y Bertone 1994), y posteriormente, puede haber inflamación aguda. Varias citocinas, como la IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), pero también prostaglandina-E₂ (PGE₂) así como iones super-óxido son liberadas en el fluido sinovial, incrementando la síntesis y liberación de proteasas (Hardingham y Bayliss 1990, Dean 1991, Palmer y Bertone 1994, Martel-Pelletier *et al.* 1998). En este punto, el mecanismo se encuentra completamente preparado y comienza el mecanismo clásico de cascada inflamatoria llevando a un proceso degenerativo.

En otras palabras, la matriz del cartílago es dañada por un ataque proteolítico, el cual de hecho es una degradación enzimática no compensada del cartílago articular. El daño de los proteoglicanos puede ser reversible. Sin embargo, una vez ocurrido un daño significativo a las fibras de colágeno, la estructura tridimensional de la matriz extracelular se verá deteriorada, presentando así un daño irreversible.

1.8 Componentes de la matriz extracelular

1.8.1. Colágenos

El colágeno, componente fibrilar del cartílago, ocupa aproximadamente 15-20% del peso húmedo y cerca de la mitad del peso seco del cartílago, excepto en la zona articular donde el colágeno abarca la mayoría del peso seco (Muir 1972). Existen diferentes tipos de colágeno y, su función en conjunto es interactuar con los proteoglicanos para formar una estructura o malla que sea capaz de soportar el peso del animal. Los colágenos proporcionan una gran tensión, pero no pueden amortiguar la compresión que ejerce el peso del caballo (Todhunter, 1996). Existen numerosos tipos de colágeno, los cuales están agrupados de acuerdo a su función (Van der Rest y Garrone, 1991). La mayor parte del colágeno del cartílago articular es tipo II (85 a 90% del total), y pequeñas cantidades del tipo VI, IX, XI, XII, y XIV también están presentes (Mayne y Burgerson 1987; Eyre *et al.* 1991a). El colágeno tipo II es sintetizado como un precursor de alto peso molecular y se encuentra casi exclusivamente en el cartílago (Poole, 1993), proporcionándole una fuerza tensil. El colágeno equino tipo II tiene una estructura similar a la de otras especies y tiene una hidroxilación más alta de los residuos de lisina y más glicosilación que el colágeno equino de tipo I. (Todhunter, 1996). El colágeno tipo XI se puede copolimerizar con el colágeno tipo II y por eso es el homólogo del colágeno tipo V en términos de la relación de los tipos V's y el colágeno tipo I (Poole *et al.* 1988).

1.8.2 Proteoglicanos y glucosaminoglucanos

Los proteoglicanos son macromoléculas las cuales consisten en una proteína nuclear (principal), en la cual una o mas cadenas de glucosaminoglucanos están unidas covalentemente. Estos glucosaminglucanos son cadenas dobles lineales de disacáridos que están cargados negativamente por grupos carboxilo y sulfato.

Los glucosaminoglucanos que se encuentran en cartílago incluyen al sulfato de condroitina, sulfato dermatan, sulfato de queratina y ácido hialurónico. Este último es el único glucosaminglucano que no es sulfato y además no se encuentra como cadena lateral de una proteína nuclear de proteoglicano. Además, el ácido hialurónico se encuentra en forma de cadenas largas (más de 1,000 repeticiones disacáridos) que interactúan con las fibras de colágeno de una manera que aún no se comprende. Las unidades de disacáridos de glucosaminglucanos consisten de hexosamina y residuos de ácido urónico, excepto para el sulfato de keratina donde el residuo de ácido urónico es reemplazado por galactosa. Mientras que el ácido hialurónico es sintetizado en la membrana plasmática, todos los glucosaminglucanos son sintetizados y modificados en el aparato de Golgi; la proteína nuclear es sintetizada en el retículo endoplásmico (Hardingham y Muir 1972).

El principal proteoglicano en el cartílago es el agregan , un proteoglicano largo que contiene de 100-200 cadenas laterales de glucosaminoglucanos y recibe ese nombre porque más de 300 de estos proteoglicanos se pueden unir a una cadena de ácido hialurónico, formando largos agregados (Hardingham y Muir 1972). Esta unión es

estabilizada por una glicoproteína llamada proteína de unión (Buckwalter *et al.* 1984; Hardingham 1979). Además del agregan, el cartílago contiene varios proteoglicanos pequeños no agregados como la decorina, biglicano y fibromodulina (Roughley y Lee 1994; Witsch *et al.* 1992) (Figura 1.9). Estas moléculas se unen a otras macromoléculas contribuyendo a la estabilización de la matriz y probablemente influye en la función celular. El arreglo ultra estructural y las interacciones moleculares entre varios componentes de la matriz extracelular contribuyen sustancialmente en las propiedades mecánicas del cartílago y por lo tanto a la resistencia a los daños (Roughley y Lee 1994).

1.8.3 Proteoglicanos pequeños

Los proteoglicanos pequeños no agregados constituyen del 1 al 4% del total de la masa de los proteoglicanos en el cartílago articular, pero sus concentraciones molares son similares a proteoglicanos grandes y agregados. (Hazle *et al.* 1986). Hay macromoléculas multifactoriales que se unen a los colágenos, factores de

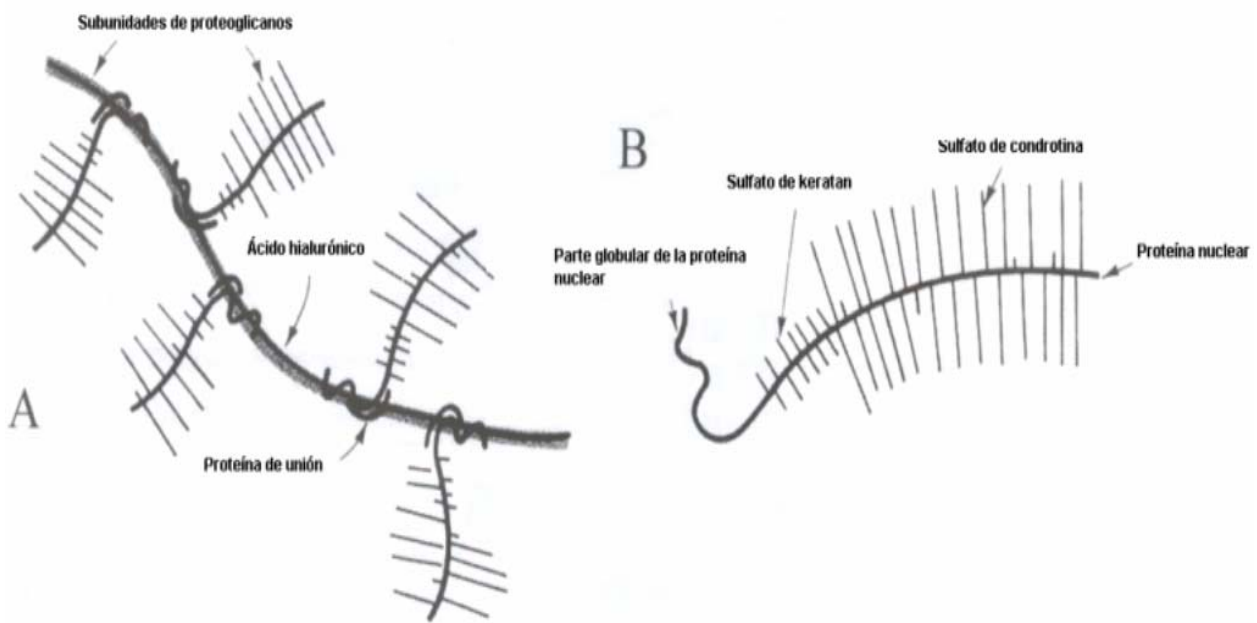


Figura 1.9 Diagrama esquemático representando un segmento de ácido hialurónico con cadenas a los lados de proteoglicanos (A), y una subunidad de proteoglicano (agregan) en detalle (B).

crecimiento, heparina y una gran variedad de diversas moléculas (Rosenberg 1992). Se reconocen 3 proteoglicanos pequeños en el cartílago articular y todos son miembros de la familia de glicoproteínas ricas en leucina (Oldberg *et al* 1989; Plaas *et al.* 1989, Rosenberg *et al.* 1985). Las proteínas nucleares de estos proteoglicanos están separadas pero muestran aproximadamente un 55% de homología, con un peso molecular de aproximadamente 38 kDa. Los proteoglicanos pequeños que se han reconocido en el cartílago articular son la decorita, los biglicanos y fibromodulina.

1.8.4 Proteínas no colágenas de la matriz extracelular

Las glicoproteínas no colágenas y no proteoglicanos constituyen una porción pequeña pero significativa del cartílago articular (Fife y Brandt 1993). La función de muchas de estas proteínas no se conoce aún, con la excepción de las proteínas de enlace. Tres proteínas de enlace, con masas moleculares aparentes de 48, 44 y 41 kDa, han sido identificadas en el bovino normal y en el cartílago humano. Estas comparten un aminoácido común de la espina dorsal, sugiriendo que se originan a partir de un gen individual, pero difieren en el grado de glicosilación. La proteína de enlace más pequeña al parecer se deriva de la mayor como resultado de degradación proteolítica (Campbell y Roughley *et al.* 1986). La proteína de enlace se adhiere de forma no covalente a un sitio específico cerca de la porción N de la proteína nuclear del agregan y el hialuronato (Franzen *et al.* 1981; Perin *et al.* 1987). De ésta manera se estabiliza la interacción entre el agregan y el hialuronato en presencia de temperaturas y pH extremos, fuerzas mecánicas como la ultracentrifugación y solventes disociativos (Hardingham 1979).

1.8.5 Cambios de la matriz extracelular

Los condrocitos sintetizan, organizan y regulan la composición de una compleja matriz peri-celular, territorial e interterritorial. En cada etapa de crecimiento, desarrollo y maduración, las velocidades relativas de la síntesis y degradación de la matriz se ajustan para que la malla alcance su crecimiento, remodelación o equilibrio. Se ha estimado que el número de veces en que el colágeno cambia en los caninos es uno en 120 años y de 350 años en el cartílago articular de humano adulto (Akizuki *et al.* 1987). Los tiempos de cambios del colágeno son más lentos comparándolo con el de los proteoglicanos y se cree que esto se relaciona con las características estructurales de las fibras de colágeno. Una vez que las fibras de colágeno y los enlaces cruzados covalentes se forman dentro y entre las moléculas en las fibrillas, los sitios disponibles para la separación de la enzima son limitados.

No se conoce precisamente como es que los condrocitos cambian la matriz, pero se han demostrado dos factores que aceleran los cambios: uno es el impacto mecánico y el otro son las citocinas así como las interleucinas y el TNF- α , las cuales son producidas por las células sinoviales. Estos factores influyen en la producción y activación de las enzimas condrocíticas que pueden degradar la matriz del cartílago, y este proceso degradativo está equilibrado por un inhibidor enzimático y por la síntesis de factor de crecimiento (Akizuki *et al.* 1987).

1.9 Enzimas capaces de degradar cartílago

1.9.1 Metaloproteinasas de la matriz (MMP's)

Se considera que las metaloproteinasas juegan un papel muy importante en la degradación de la matriz extracelular (Poole 1993; Nagase y Woessner 1993). Tienen un papel clave en lo que se refiere a la migración tanto de células normales como malignas a través del cuerpo. También actúan como moléculas reguladoras participando en las cascadas enzimáticas y procesando proteínas de la matriz, citocinas, factores de crecimiento y adhesión de moléculas para generar fragmentos con efectos biológicos ya sea aumentados o reducidos. Las MMP's se caracterizan por el requerimiento de Zn en su sitio activo. El calcio también es requerido para que se exprese una actividad total pero no reside en el sitio activo (Sapolky *et al.* 1976).

La familia de las metaloproteinasas se divide en cuatro grupos:

- 1) Colagenasas tisulares (MMP-1).
- 2) Gelatinasas: gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9).
- 3) Estromelisinias: la 1 (MMP-3), 2 (MMP-10), 3 (MMP-11). Pueden degradar proteoglicano y colágeno.
- 4) Colagenasa neutrofila (MMP-8), PUMP-1 (MMP-7).

(Poole AR. 1993).

La IL-1 y el TNF- α estimulan la producción de una gran variedad de proteínas, incluyendo colagenasa, estromelisina y gelatinasa (Ollieverre *et al.* 1984; Campbell y Roughley 1986).

Las MMP's son una subfamilia de proteinasas activadas a pH neutro, las cuales juegan un

papel importante en los cambios de las proteínas de la matriz extracelular. Las colagenasas y otras MMP's de la matriz pueden ser activadas por kalikreina y proteinasas séricas que se encuentran en el cartílago articular, además de la catepsina B (Ollieverre *et al.* 1984).

1.9.2 Proteinasas cisteínicas

La catepsina B, H y L son proteinasas lisosomales que pertenecen a la clase de proteinasas cisteínicas; la catepsina B y la L son las más conocidas (Werb 1989). Aunque generalmente es conocido que las proteinasas lisosomales tienen solo actividad en pH ácido, la Catepsina B es enzimáticamente activa en un rango amplio de pH (Mort *et al.* 1984) y cuando el pH extracelular se mantiene neutral, la Catepsina B puede activarse el tiempo necesario para causar daño tisular (Mort *et al.* 1984).

La catepsina B y la L se adhieren a la terminal de los péptidos de colágeno que contienen los enlaces covalente cruzados dentro y entre las moléculas; sin embargo la catepsina L es la más activa de las dos (Werb 1989). La catepsina B también se adhiere a la región de ácido hialurónico del proteoglicano del cartílago y degrada la región glicosaminglucano (GAG) en pequeños fragmentos (Morrisom *et al.* 1987; Roughley y Barret 1977). Cuando se observaron las acciones degradativas de la catepsina B y L en el cartílago articular humano, se encontró que la catepsina L degrada de forma más extensa a los agregados proteoglicanos que la catepsina B. Ambas catepsinas, B y L generan sitios de adhesión múltiples en las proteínas de enlace LP-1, LP-2 y LP-3 (Nguyen *et al.* 1990). También se ha sugerido que la Catepsina B actúa como activador de las MMP's (Eckhout y Vaes

1977). La catepsina B existe en tres diferentes estados de actividad: completamente latente, parcialmente activa y totalmente activa. Para exhibir realmente actividad endopeptidasa, parece ser que la enzima debe estar de modo inestable a la alcalinidad (Mort y Recklies 1986).

Se han reportado niveles altos de catepsina B en el cartílago humano degradado (Bayliss y Ali 1978). Las acciones degradativas de la catepsina B en tejido conectivo ocurre de modo tanto intra como extracelular, siendo estable a pH neutro afuera de los sinoviocitos o condrocitos por un tiempo determinado (Baici *et al.* 1988; Mort *et al.* 1984). Se ha sugerido que la acción proteolítica de la catepsina B en articulaciones humanas se relaciona con los inhibidores proteasa cisteínicos (Killackey 1983).

Otras investigaciones utilizando enzimas e inhibidores purificados del cartílago articular y de la membrana sinovial de articulaciones osteoartíticas de humanos muestran que tanto los condrocitos como los sinoviocitos producen una proteasa cisteínica que tiene las mismas propiedades que la catepsina B de otros tejidos (Martel-Pelletier *et al.* 1990). Los inhibidores proteasa cisteínicos también son secretados por condrocitos o sinoviocitos y se presentan en al menos dos formas: de alto y bajo peso molecular (Martel-Pelletier *et al.* 1990; Ghosh *et al.* 1986). En lesiones osteoartíticas leves, los niveles de catepsina B en el cartílago se muestran elevados. En experimentos con células sinoviales fibroblásticas la secreción de una proteinasa cisteínica latente (principalmente catepsina B) fue estimulada tanto por IL-1 como por el TNF- α (Huet *et al.* 1993). Las calpaínas, proteasas cisteínicas calcio dependiente del citosol (no lisosomales), también se encuentran en tejido sinovial osteoartítico y son capaces de degradar proteoglicano (Suzuki *et al.* 1990). Las calpaínas

pueden degradar rápidamente monómeros de proteoglicanos intactos y agregados (Suzuki *et al.* 1991).

La catepsina B, degrada los componentes del cartílago como el colágeno y el agreca *in vitro*, y ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades de desarrollo ortopédico en el caballo, incluyendo OC. En ésta enfermedad se ha observado que la expresión de la catepsina B aumenta los grupos de condrocitos alrededor de las lesiones necróticas (Hernández-Vidal *et al.*, 1998). Se ha hipotetizado que el impacto biomecánico puede jugar un papel en la patogénesis de OC. (Poole, 1993). Así mismo, el impacto biomecánico aplicado como extensión de dos dimensiones para aislar condrocitos puede causar incremento, decremento o no causar cambios en los niveles de RNAm de varias enzimas (Millward-Sadler *et al.* 2000).

1.10 Síntesis de la catepsina B

La conversión de la pro-enzima a su forma madura activa, probablemente representa el paso clave en el proceso de degradación. Muchas de las 4 clases de proteinasas (metaloproteinasa, aspárticas, serina y proteasas cisteínicas) son sintetizadas como precursores latentes de alto peso molecular que se convierten en su forma madura por medio de una división proteolítica de la pro región (Gal *et al.* 1985; Hanewinkel *et al.* 1987; Nishimura *et al.* 1988a; Kominami *et al.* 1988; Mach *et al.* 1992; Wiederanders *et al.* 1992). Se pensaba que las formas activas de éstas enzimas residían solamente en los lisosomas, comenzando con la propuesta de que la activación puede ocurrir mas tempranamente en

el camino biosintético como se demostró para la maduración del precursor de la proteinasa aspartica catepsina D (Gieselmann *et al.* 1983; Rijnboutt *et al.* 1992).

Se ha encontrado que en el proceso de síntesis intracelular de la pro-catepsina B se requiere la presencia de la catepsina D (Pagano *et al.* 1989; Nishimura *et al.* 1990; Goto *et al.* 1992; Leto *et al.* 1992), dando como resultado la conversión microsomal de la pro-catepsina B en una enzima madura (Nishimura *et al.* 1988b; Kawabata *et al.* 1993). Sin embargo, Felleisen y Klinkert (1990) y Mach *et al.* (1993), concluyen que la síntesis de la pro-catepsina B es un evento automático, y que la conversión auto-catalítica de la pro-enzima a la forma madura de la proteinasa bajo condiciones fisiológicamente relevantes es principalmente el resultado del proceso intramolecular.

In vivo, la catepsina B es sintetizada como una pro-enzima (San segundo *et al.*, 1985; Chan *et al.* 1986) en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y co-translacionalmente glicosilado. Después de ser glicosilada, la pro catepsina B (40-42kDa) es liberada a los lisosomas por medio de los receptores de la manosa 6-fosfato/IGF II en la superficie celular (Hasilik y von Figura, 1984; Hanewinkel *et al.* 1987; Kornfeld 1990; Kornfeld 1992). La catepsina B se convierte a su forma madura con una sola cadena (30-32-kDa), presumiblemente en el compartimiento endosomal/prelisosomal por glicosilación post-transcripcional y una proteólisis limitada, la cual es procesada más adelante de dos formas (25-27-kDa) (Kominami y Katunuma, 1989). La catepsina B completamente procesada se puede encontrar en los lisosomas de manera tipo-célula-específica, asociada con la membrana del plasma o secretada en forma de doble cadena, consistiendo en una cadena pesada y una ligera vinculadas a un enlace disulfuro (Hanewinkel *et al.* 1987; Mach *et al.*

1992). Sólo pequeñas cantidades de la proenzima en estado latente es secretada en el fluido extracelular; se conoce poco acerca del proceso extracelular de la procatepsina B en estado latente *in vivo*, aunque algunos reportes han sugerido que la elastasa neutrofila podría estar involucrada (Keppler *et al.* 1994; Burnett *et al.* 1995). Además, también se ha sugerido que la catepsina D podría regular la actividad de la catepsina B por medio de la inactivación de los inhibidores naturales de las proteinasas cisteínicas (Lenarcic *et al.* 1991) (Figura 1.10).

1.10.1 Modulación fenotípica y expresión de la catepsina B

Las MMP's habían sido las enzimas que más atención habían recibido, hasta que se demostró que las hidrolasas endógenas son las responsables de la auto degradación del cartílago (Lucy *et al.* 1961; Ali, 1964). Niveles elevados de catepsina D fueron encontrados en cartílagos con OA comparado con el cartílago normal (Ali y Evans, 1973; Ali y Bayliss, 1975). Sin embargo, se ha pensado que esa acción se restringe al catabolismo intracelular de las macromoléculas de la matriz dentro de los condrocitos (Vittorio *et al.* 1986). De igual forma se han encontrado cantidades significantes de Catepsina B en cartílago humano con OA comparado con el cartílago normal (Bayliss y Ali, 1978; Martel-Pelletier *et al.* 1990; Baici *et al.* 1995a), en sinovio reumatoide (Mort *et al.* 1984; Colorean *et al.* 1981, Trabandt *et al.* 1991), y en fluido sinovial (Codorean *et al.* 1981; Lenarcic *et al.* 1988; Gabrijelcic *et al.* 1990). Experimentos *in vitro* han sugerido un rol de la Catepsina B en la degradación de proteoglicano del cartílago por IL-1 (Buttle *et al.* 1992; Buttle y Saklatvala 1992; Buttle *et al.* 1993). La participación de la catepsina B propuesto en este contexto fue acerca del incremento de la actividad intracelular de una MMP estimulada por la citocina como el

mediador efectivo de la degradación (Buttle *et al.* 1993). Estos resultados concuerdan con la observación

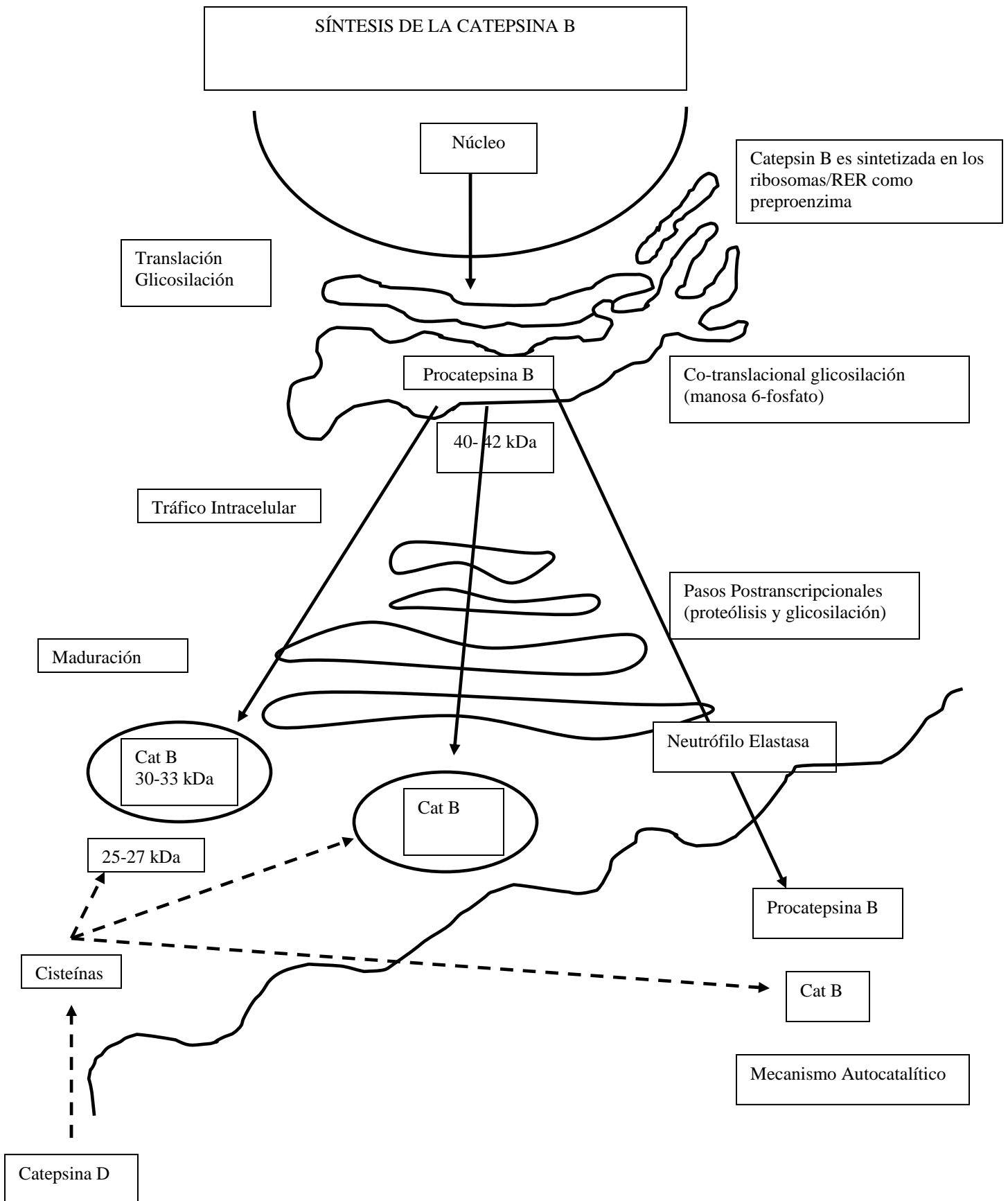


Figura 1.10 Síntesis de catepsina B, modificación esquemática de Berquin y Sloane. 1996.

hecha por Baici y Lang (1990), donde el almacenamiento intracelular y la biosíntesis de la catepsina B fueron estimuladas por IL-1 β , pero no su liberación.

Una manera de estimular a los condrocitos para producir elevados niveles de catepsina B es por medio de la modulación fenotípica (Baici *et al.* 1988). Los condrocitos normales almacenan intracelularmente Catepsina B en muy pequeñas cantidades sin que se presente secreción, pero después de la modulación fenotípica en cultivo mono capa celular, aumentan la biosíntesis, almacenamiento y secreción de la enzima (Baici *et al.* 1988). Esta bien documentado que el fenotipo de la célula varía a través de varios subcultivos (Fröhlich *et al.* 1995). Existe evidencia de que los condrocitos hipertróficos pueden contribuir en el proceso de osificación endocondral experimentando una diferenciación osteogénica basados en estudios de cultivos *in vitro* de células y órganos (Descalzi Canccheda *et al.* 1992; Gentili *et al.* 1993; Galotto *et al.* 1994). El cambio fenotípico de condrocito a osteoblasto como célula es entonces un tema que debe ser retomado en próximas investigaciones biológicas sobre condrocitos y puede servir como paradigma para otros casos de cambios fenotípicos en células diferenciadas.

1.11 Efectos del tejido sinovial, cobre y zinc en la función de los condrocitos y degradación de la matriz.

Teniendo el conocimiento de que los condrocitos pueden ser estimulados por citocinas para producir enzimas degradadoras de cartílago, sería interesante observar los efectos de las citocinas producidas por el tejido sinovial en la producción, liberación y actividad enzimática de la catepsina B y D en el cartílago.

Desde que se sugirió (Pascualicchio *et al.* 1996) que el cobre inhibe indirectamente el efecto de la IL-1 (citocina predominante producida por el tejido sinovial), también el zinc debería ser estudiado en estos diferentes parámetros enzimáticos.

Las anomalías como la laminitis, deformidades angulares de las extremidades, fragilidad de los huesos, cartílago engrosado y erosión del cartílago han sido asociadas con la deficiencia de cobre en potros en crecimiento (Cupps y Howel, 1949). Dicha relación ahora ha sido establecida entre el cartílago y los defectos de huesos que se observan en la enfermedad ortopédica del desarrollo (DOD), así como un desbalance nutricional de cobre y zinc (Bridges *et al.* 1984; Cymbaluk y Smart 1993; Meyer 1994). Las observaciones de Egan y Murrin (1973) y Carberry (1978), establecen una correlación entre el estatus del cobre y DOD con Bridges y Harris 1988, quienes especulaban la acción del cobre en una deficiencia de la estructura del colágeno por deficiencia de cobre en potros, reportaron una asociación entre la deficiencia nutricional de cobre y la osteocondrosis, lesión secundaria desarrollada por la discondroplasia.

Se sabe que el cobre y el zinc afectan la remodelación de la matriz del cartílago (Bridges y Moffitt, 1990; Knight *et al.* 1990; Hurtig *et al.* 1993) y existe evidencia reciente que sugiere que la deficiencia de cobre origina defectos en la unión del colágeno en las lesiones del cartílago en caballos con osteocondrosis (Hurtig *et al.*

1993), causando debilidad biomecánica del cartílago y micro-fracturas en el hueso subcondral y metafiseal.

Otro importante componente estructural de la matriz es el proteoglicano, el cual existe en grandes agregados macromoleculares, no covalentemente unidos al ácido hialurónico y ha sido reportado que la deficiencia de cobre en ratas altera la concentración, tamaño y cantidad de ciertos proteoglicanos en la matriz extracelular de la pared arterial, ocasionando lesiones cardiovasculares (Radhakrishnamurthy *et al.* 1989). Además, los estudios de Hurtig *et al.* (1993) han demostrado niveles elevados de una enzima activa degradadora de proteoglicano (estromelicina) en las lesiones de cartílago en potros con deficiencia de cobre. Aunque estas observaciones ofrecen algunas explicaciones en cuanto a las lesiones esqueléticas provocadas por la deficiencia de cobre, y por la eficacia anti artrítica del cobre (Sorenson 1989; Whitehouse *et al.* 1990) ellos no proveen información alguna convincente acerca de los mecanismos de acción del cobre y del zinc en la degradación de los componentes de la matriz extracelular.

1.12 Distribución de la carga en el cartílago articular

El cartílago articular puede experimentar grandes deformaciones volumétricas durante su actividad normal pero también recobrar su forma original durante los periodos de descanso. Los impactos aplicados a la superficie articular son compartidos entre varios componentes de la matriz. Por ejemplo, las fibras de colágeno dominan todo lo que se refiere al ambiente tensil (Schmidt *et al.* 1990), donde las propiedades osmóticas de los proteoglicanos proporcionan resistencia a la compresión volumétrica (Sporn *et al.* 1988). En una articulación no impactada, las superficies articulares opuestas no son completamente congruentes (Gardner y McGillvray 1971). Sin embargo, la situación cambia cuando las superficies sufren un impacto de carga. Debido a la relativa suavidad

del cartílago, existen dos consecuencias debido al impacto relacionados con la deformación del cartílago: 1) incremento del área de contacto reduciendo los niveles de estrés del tejido, e 2) incremento de la conformación articular (proveído de una estabilidad adicional). Además, la adaptación de la forma en el cartílago impactado puede ayudar a formar y retener un fino gel lubricante concentrado entre las superficies articulares (Walker *et al.* 1968; Swann 1985).

Aunque el cartílago a bajo impacto es directamente comprimido, las áreas adyacentes están sujetas a esfuerzos tensiles transversos. Las variaciones, resultado de la deformación, tienden a redistribuir el fluido lejos de la región comprimida y de las regiones rígidas o tensas. Este proceso es mediado por la baja permeabilidad y la alta presión interna del cartílago. Ambas propiedades son controladas principalmente por la habilidad del cartílago de mantener la hidratación bajo presión debido al ambiente químico de los proteoglicanos (Maroudas *et al.* 1986).

La presión osmótica de los proteoglicanos a la concentración presente en el cartílago (aprox. 5 a 10 veces una concentración mayor que la que existe en otros tejidos conectivos) se encuentra en un rango de 0.1 a 0.2 μ Pa (Maroudas 1980; Maroudas A. *et al.* 1992). La mayor contribución de la presión osmótica de los proteoglicanos (aprox. 75 a 85% del total) proviene de los grupos carboxyl y sulfato negativamente cargados de los glucosaminglucanos y de los cationes asociados (efecto iónico o de Gibbs-Donnan) (Akizuki *et al.* 1987). El agua es atraída hacia el cartílago debido a la densidad muy cargada, y la presión osmótica puede contribuir a más del 50% de la rigidez compresiva del cartílago articular (Mow *et al.* 1990; Lai *et al.* 1989). Esta presión es balanceada por el

estrés tensil de la malla de colágeno. La magnitud de la presión depende de: 1) la densidad de los grupos cargados en los proteoglicanos, 2) la distribución de los grupos cargados a lo largo de las ramas de los proteoglicanos, y 3) la conformación molecular de los proteoglicanos. La magnitud de la fuerza de resistencia depende de 1) la organización estructural, 2) la rigidez tensil, y 3) la fuerza de la malla de colágeno (Akizuki *et al.* 1986). Existe una correlación positiva elevada entre los módulos tensiles intrínsecos de la matriz extracelular y la masa colágeno/proteoglicano (Schmidt *et al.* 1990; Mow *et al.* 1992).

Las articulaciones diartroidales normales tienen un mejor desempeño al momento de un impacto. Las propiedades únicas mecánicas del cartílago articular son cruciales para este desempeño. El cartílago saludable es excepcionalmente resistente y provee de una baja resistencia a los movimientos resbaladizos y de la articulación sobre un amplio rango de impactos y velocidades (Mow *et al.* 1992).

MATERIALES Y MÉTODOS

2

2.1 Materiales

2.1.1 Antisuero

Catepsina B suero anti-humano

En este estudio se utilizó IgG catepsina B específica anti-humano obtenida a partir de ovino, también se utilizó suero policlonal-catepsina B (sch, U554/4) obtenido a partir de ovino en contra de catepsina B purificada de hígado humano y caracterizado tal como describe Buttle *et al.* 1988, los cuales fueron donados por la Dra. Elisabeth Davies del departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.

2.1.2 Anticuerpos secundarios

Se utilizaron inmunoglobulinas de conejo (IgG) anti-ovino conjugadas con FITC y con peroxidasa, de laboratorios Dako-Denmark, las cuales fueron proporcionadas por la Dra.

Elisabeth Davies del Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.

2.1.3 Sustancias y agentes químicos

Ácido clorhídrico	Fisons
Albúmina (suero de bovino)	Sigma
Azul de toluidina	Gurr®
Cloruro de potasio (KCl)	Fisons
Cloruro de sodio (NaCl)	Fisons
Diaminobencidina tetrahidroclorada (DAB)	Sigma
Etanol	Fisons
Medio de montaje DPX	Gurr®
Metanol	Fisons
O.C.T. (Medio de montaje para muestras congeladas).	Tissue-Tek®
Ortofosfato de potasio dihidrogenado (KH ₂ PO ₄).	Sigma
Ortofosfato disódico hidrogenado (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	Fisons
Óxido de mercurio	Sigma
Paraformaldehído	Sigma

Peróxido de hidrógeno (30%)	Sigma
Poly-L-lisina	Sigma
Suero de conejo	Sera-Lab
Suero fetal bovino	Sera-Lab
Sulfato potásico de aluminio	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trizma base	Sigma
Trizma hidrocloreuro (tris-HCl)	Sigma

2.1.4 Materiales de cultivo de tejidos

Tubos cónicos para centrifuga de 50 ml	Falcons
Colagenasa tipo H (bacterial, EC 3.4.24.3)	Boehringer Mannheim
Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	BHD
Traste de cultivo (100x20 mm)	Falcons
Portaobjetos con compartimientos	Nunc, Inc.
Ditiotreitol (DTT)	Sigma
Disodio hidrógeno ortofosfato (Na ₂ HPO ₄)	Sigma
Disodio hidrógeno ortofosfato (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Sigma

Medio Modificado Dulbecco's-Eagle's	Gibco BRL
Fungizona	Gibco BRL
Suero fetal bovino	Sera-Lab
2-hidroxi-5-nitrobenzaldehido	Sigma
Medio Iscove's	Gibco BRL
L-cisteína	Sigma
Filtros minisart (0.20 y 0.45 µl)	Sartorius
Portaobjetos multi-test 8 compartimientos	Flor labs
N-carbobenzoxi-fenilalanil-arginil-4- metoxi-beta-naftilamida (Z-Ala-Arg-Arg-4MβNA)	Bachem
Cámara de conteo Neubauer	WSI Ltd.
Penicilina	Gibco BRL
Pronasa E (proteasa tipo XIV para <i>Streptomyces griseus</i>)	Sigma
Tijeras – curvas “Noyes”	DePuy® Helathcare
Ortofosfato de hidrógeno dihidrogenado (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	Sigma
Placas de Petri cuadradas (100mm, 25 pozos)	Sterilirn
Estreptomicina	Gibco BRL

Frascos de cultivo de tejido (25-75- cm ²)	Corning
Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4- guanidinio) butano (E 64)	Sigma
Tripsina (EC 3.4.21.4)	Sigma
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	Sigma

2.1.5 Soluciones amortiguadoras

2.1.5.1 Soluciones amortiguadoras para inmunolocalización

Solución salina fosfato buferada pH 7.4 (PBS)

NaCl	136 mM	8 g
KH ₂ PO ₄	1.46 mM	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	8.07 mM	2.89 g
KCl	2.68 mM	0.20 g

Preparar con 1 Lt de H₂O destilada

100 mM búfer fosfatado pH 6.0

Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	100 mM	17.8 g
--	--------	--------

Preparar 1 L con H₂O destilada y ajustar pH

Solución buferada de bloqueo

Albúmina de suero de bovino	1% (p/v)	1 g
Suero fetal bovino o suero normal de conejo	10% (p/v)	10 ml

Solución buferada de lavado

Albúmina de suero de bovino	1% (p/v)	1 g
--------------------------------	----------	-----

Preparar con 100 ml de PBS

Solución buferada tris-HCl 0.1 M pH 7.6

Trizma - HCl	100 mM	7.8 g
--------------	--------	-------

Mezclar con 500 ml de agua destilada y ajustar el pH

Solución buferada tris – HCl 0.1 M pH 7.6 + 1% de BSA

Trizma - HCl	100 mM	7.8 g
Albúmina de suero de	1% (p/v)	5 g

bovino

2.1.5.2 Tinción para inmunolocalización

Reacción de color DAB

10 mg en tableta en:

Búfer Tris-HCl (0.1 M pH 7.6)		10 ml
Peróxido de hidrógeno (30%)	0.1% (v/v)	30 µl

Tinción nuclear

Solución verde metilo	0.01% (p/v)	0.025 g
--------------------------	-------------	---------

Mezclar con 250 ml H₂O destilada

2.1.6 Tinción histológica

Azul de toluidina

Azul de toluidina	0.5% (p/v)	0.5 g
Etanol	5%	5 ml

Mezclar con 100 ml de agua destilada y filtrarse antes de usar

2.1.7 Soluciones para histología

2.1.7.1 Paraformaldehído 4% pH 7.4 (PFA)

Paraformaldehído	4% (p/v)	20 g
------------------	----------	------

Mezclar con 500 ml de PBS

2.1.7.2 Poly – L – lisina

Poly-L-lisina	10% (v/v)	50 ml
---------------	-----------	-------

Mezclar con 500 ml de agua destilada

DMEM (Dulbeccos modified eagles medium)

Na HCO₃

pH 7.4 con 1M NaOH

Mezclar con 1 Lt de agua

Antes de usar añadir 200 UI/ml benzyl penicilina, 10

2.1.8 Solución de tripsina para separación celular

Tripsina (EC 3.4.21.4)	0.25% (p/v)	0.25 g
EDTA	0.537 mM	0.02 g

Preparar 100 ml con PBS

2.1.9 Medios

2.1.9.1 Medio modificado Dulbeccos's-Eagle's (DMEM)

10X DMEM stock	10% (v/v)	100 ml
NaHCO ₃	595 mM	50 ml

Preparar 1 Lt con H₂O

Antes de usar añadir 200 UI/ml benzil penicilina,

100 µg/ ml de estreptomina y 2.5 µg/ml de fungizona

2.1.9.2 Medio de actividad enzimática

EDTA	1.3 mM	5 mg
Dithiothreitol (DTT)	1 mM	2 mg
L-cisteína	2.67 mM	3 mg
2-hidroxi-5-nitrobenzaldehído	1 mM	2 mg

Z-Ala-Arg-Arg-4MβNA

0.1% (p/v)

1 mg

Preparar en 10 ml con 100 mM de solución buferada de fosfato (pH 6.0) (Sección 2.1.5.1)

N.B en algunos experimentos la solución inhibidora (Sección 2.1.9.3) se fue agregada o el sustrato excluido a manera de control.

2.1.9.3 Solución inhibidora (concentración 50X)

E-64

10 μM

350 μg

Preparar en 10 ml de 100 mM de solución buferada de fosfato (pH 6.0) (Sección 2.1.5.1), después diluir 1:50 en el medio de actividad enzimática (Sección 2.1.9.2).

2.2 Métodos

2.2.1 Medio de cultivo de tejido

El medio modificado Dulbecco's-eagle's (DMEM) se preparó a partir de una concentración de 10 (Gibco, UK) suplementado con antibióticos (Sección 2.1.9.1).

2.2.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos fueron preservados a una temperatura de 37°C en una atmósfera de agua saturada que consistía en 95% aire y 5% CO₂. El medio de cultivo fue suplementado con 10% (v / v) de suero fetal bovino (FCS). Para propósitos de co-cultivo, el medio de algunas muestras se suplementó con 0.01 mM de sulfato de cobre, o con 0.01 mM de sulfato de zinc.

2.2.3 Tejidos

Para este estudio se utilizaron muestras de cartílago articular normal y discondroplásico de caballos, los cuales fueron sacrificados por razones diferentes a osteocondrosis/discondroplasia, referidos al hospital de medicina veterinaria de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.

2.2.3.1 Muestras de cartílago y hueso subcondral

Se obtuvieron muestras completas de cartílago y hueso subcondral normal y discondroplásico de la cresta lateral de la tróclea del fémur de 25 caballos. Las muestras fueron colectadas dentro de las primeras 3-6 horas post-mortem de caballos sin historia de enfermedad de desarrollo ortopédico. Para este estudio se utilizaron únicamente animales cuyas edades estaban entre 157 días-24 meses. Las muestras fueron

preparadas en parafina o inmediatamente congeladas en O.C.T con nitrógeno líquido (-186°C) para estudios inmunocitoquímicos.

Las muestras preparadas en parafina líquida se fijaron en paraformaldehído al 4% por 24 horas a temperatura ambiente, siguiendo los pasos que a continuación se mencionan: las muestras fueron sumergidas por 2 horas en etanol al 70%, 2 horas en etanol al 90%, 6 horas en etanol al 100%, 2 horas en etanol al 50% (v/v) / CNP 30 (BDH, UK) al 50%, 6 horas en CNP 30 al 100%, 2 veces por 2 horas al vacío en parafina a 58°C. Después se enfriaron en una plancha fría y se guardaron a temperatura ambiente. Las muestras se cortaron (8 µm de espesor) usando un micrótopo (Bright Instruments, Huntingdon, UK) y se montaron en portaobjetos tratados previamente con un auto-adherente de poly-L-lisina para después reposar a 56°C en un horno por una noche. Las muestras se guardaron a temperatura ambiente hasta ser utilizadas. Para eliminar el exceso de cera, las muestras se sumergieron en CNP 30 (BDH, UK) por 10 minutos, 5 minutos en etanol al 100%, 5 minutos en etanol al 90%, 5 minutos en etanol al 70% y 5 minutos en PBS antes de ser usadas. Las muestras congeladas se cortaron utilizando un micrótopo criogénico (Bright Instruments, Huntingdon, UK) a una temperatura de -30°C. Se obtuvieron muestras de la cresta lateral de la tróclea del fémur cortadas perpendicularmente a la superficie articular con un espesor de 8 µm, las cuales incluían las tres zonas del cartílago articular (superficial o articular, media o proliferativa y profunda o hipertrófica) así como alrededor de 5 mm de hueso subcondral.

2.2.4 Células

2.2.4.1 Aislamiento y propagación de los condrocitos articulares

Cartílago articular normal y discondroplásico fueron obtenidos asépticamente de 3-6 horas después de la eutanasia. Los condrocitos usados para la inmunolocalización fueron aislados de cartílago de las articulaciones femorotibiales de caballos, potros y potros fetales en etapa terminal. El cartílago fue pesado y cortado en cubos pequeños en una placa de Petri estéril que contenía PBS estéril para prevenir la desecación antes de ser utilizados.

2.2.4.1.1 Digestión pronasa/colagenasa

Con el fin de aislar condrocitos del cartílago se utilizó la digestión enzimática. La medida del cartílago cortado fue de aproximadamente 1 mm³, fue enjuagado 3 veces con PBS estéril. Después de enjuagar el cartílago fue digerido por 1 hora a 37°C en la plataforma vibratoria con 10 ml/2 g de tejido de 0.8 % (p/v) de pronasa E de *Streptomyces griseus* (Sigma, UK) en un medio rico en nutrientes (medio modificado Dulbecco's-eagle's) (DMEM) conteniendo 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FCS), 200 UI/ ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2.5 µg/ ml de fungizona. Al cartílago se le permitió establecerse y el supernadante fue eliminado, el pellet fue enjuagado 3 veces con DMEM que contiene 10 % (v / v) de FCS y digerido de 4-6 horas con 10 ml/ 2 g de tejido

de 0.4% (p/v) de colagenasa clostridial (EC 3.4.24.3), en DMEM conteniendo 10% (v/v) FCS, penicilina y estreptomicina (en las mismas concentraciones).

El cartílago no digerido se eliminó por centrifugación a 500 rpm (Mistral MSE 2000) por 5 minutos y el supernadante rico en células fue enjuagado 3 veces por centrifugación en DMEM con 10% (v/v) de FCS por 5 minutos a 2500 rpm. Las células fueron uniformemente resuspendidas en DMEM con 10% (v/v) de FCS, y un alícuota de la suspensión de las células fue contada utilizando la cámara de conteo Neubauer. La viabilidad celular fue determinada por la habilidad de excluir azul tripan. Todas las preparaciones celulares tuvieron una viabilidad mayor del 85%.

Después del conteo, la densidad celular viable fue ajustada a utilizarse a 4×10^7 células/cm² para cultivo de mono capa celular.

2.2.4.1.2 Propagación condrocítica

Los condrocitos articulares fueron puestos como cultivos primarios a una densidad de 4×10^7 células / cm² en frascos para cultivo celular de 25-75 cm² con 10 o 30 ml, respectivamente, de DMEM suplementado con 10% (v/v) de FCS, 200 UI/ ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomicina y 2.5 µg/ ml de fungizona. Los cultivos celulares fueron incubados como se describió previamente (Sección 2.2.2). El medio fue reemplazado cada tercer día o antes si el cambio de color rojo del fenol indicaba agotamiento de nutrientes. Las células fueron subcultivadas después de la tripsinización (Sección 2.1.8) de mono

capa confluyente por 20 minutos. Las células separadas fueron centrifugadas y el pellet resuspendido y enjuagado 3 veces por centrifugación en un volumen conocido del medio a 2500 rpm (Mistral MSE 2000) por 5 minutos. Un alícuota fue usado para contar las células y revisar la viabilidad celular utilizando azul tripan como se describió anteriormente. La suspensión celular fue separada y sembrada en nuevos frascos de la mediada apropiada con DMEM fresco con 10% (v/v) de FCS y antibióticos.

2.2.5 Preparación del tejido sinovial femorotibial

El tejido sinovial de caballo fue obtenido bajo condiciones estériles de la articulación femorotibial de animales con un rango de edad de 12 a 15 meses. Inmediatamente antes de la escisión sinovial, las articulaciones fueron inmersas en etanol al 70% por 5 minutos. Se utilizaron técnicas asépticas y equipo estéril a través de este procedimiento. La articulación fue abierta y la sinovia fue removida utilizando las tijeras curvas “Noyes”. La sinovia fue finamente cortado utilizando las tijeras Noyes y enjuagadas abundantemente en DMEM repetidas veces por centrifugación en una centrifuga Mistral MSE 2000 a 2500 rpm por 5 minutos para separar las células del tejido graso, inmediatamente después se utilizó para experimentos de co-cultivo (Figura 2.1).

2.2.5.1 Co-cultivo del cartílago articular y sinovia

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo bajo condiciones estériles. El cartílago articular normal y la sinovia normal fueron obtenidos por disección de la articulación

femorotibial. El cartílago también fue tomado de la parte lateral de la tróclea del fémur como se acaba de describir. Las piezas de cartílago fueron cultivadas solas o fueron co-cultivadas en 1 ml de DMEM (Sección 2.1.9.1) con tejido sinovial finamente cortado. Los co-cultivos fueron colocados en placas de Petri plásticas de 25 pozos (Sterilin, UK) colocando el tejido sinovial sobre una membrana Millipore en una rejilla metálica con el cartílago directamente en contacto con la sinovia (Figura 2.2).

Los especímenes de cartílago y co-cultivos se mantuvieron por 48 horas en la presencia o ausencia de 0.01 mM de sulfato de cobre o 0.01 mM de sulfato de zinc.



Figura 2.1 Preparación de tejido sinovial obtenido de la articulación femorotibial bajo condiciones estériles.

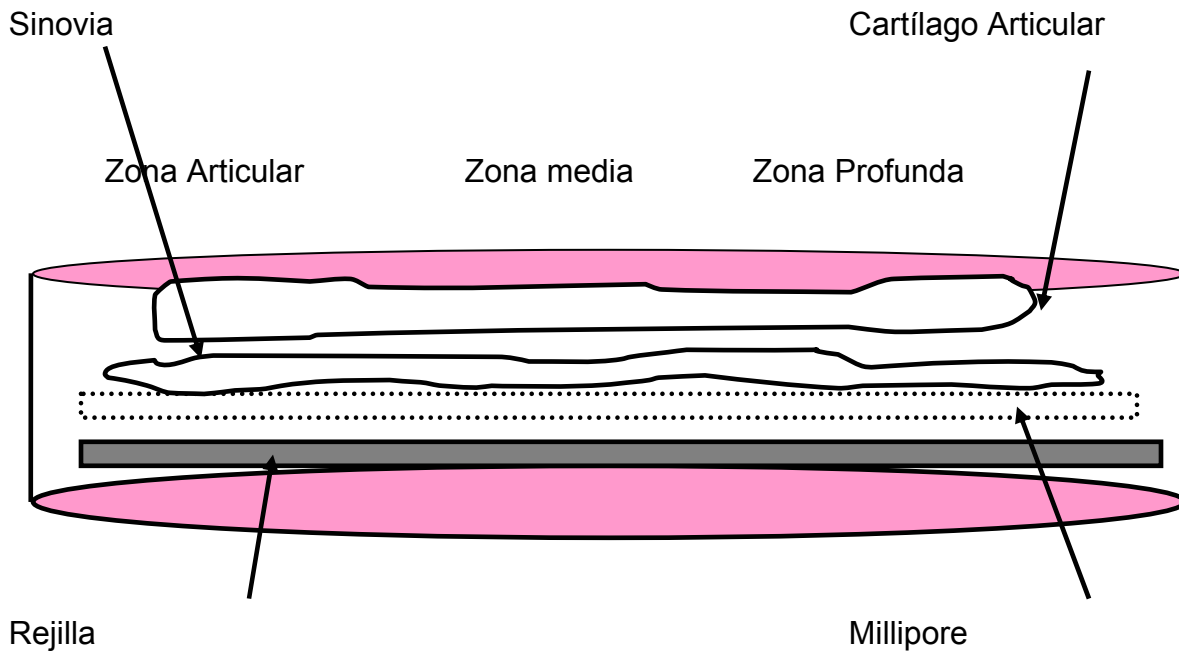


Figura 2.2 Co-cultivo de cartílago articular con sinovia

Después de 48 horas algunos de los especímenes de cartílago fueron sacados, congelados y embebidos en O.C.T y almacenados a -20°C antes de seccionar para histología con azul de toluidinaa e inmunohistoquímica. Tres especímenes de cartílago fueron utilizados en todos los grupos experimentales.

2.2.6 Métodos inmunocitoquímicos

2.2.6.1 Preparación portaobjetos

Los portaobjetos se trataron con adherente poly-L-lisina (Sigma, UK) por 5 minutos y se secaron por 1 hora a 60°C. En seguida se guardaron a temperatura ambiente por 2 semanas.

2.2.6.2 Preparación de las secciones de cartílago y hueso subcondral

Los especímenes congelados de cartílago y hueso subcondral se cortaron en secciones de 8 µm de grueso en un micrótopo criogénico (Bright Instruments, Huntingdon, UK) a una temperatura de -30°C las secciones se montaron en portaobjetos tratados con poly-L-lisina y se dejaron secar por cinco minutos a temperatura ambiente. Después las secciones se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 minutos y se lavaron por 10 minutos en PBS: las secciones preparadas en parafina se cortaron a un espesor de 8 µm para ser usadas dentro de las primeras 24 horas después de haber eliminado el exceso de cera.

2.2.6.3 Preparación de las células

Los condrocitos articulares (Sección 2.2.4.1) fueron preparados para inmunocitoquímica mediante el cultivo de células ($\approx 2 \times 10^5$) en portaobjetos con 8 compartimientos (Nunc Inc, USA) (Sección 2.2.2).

Los cultivos de mono capa celular fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 30 minutos y posteriormente enjuagados por 10 minutos en PBS. Después las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0.1% (v/v) por 5 minutos para facilitar el acceso intracelular de los anticuerpos. Triton X-100 tiene un efecto reactivador en cualquier proteasa inactiva del cartílago (Ali *et al.* 1967).

2.2.6.4 Tinción inmunofluorescente

Las muestras de cartílago, así como las células, fueron tratadas con búfer bloqueador (Sección 2.1.5.1) por lo menos 15 minutos para evitar la unión no específica del antisuero primario. Después se eliminó el exceso de búfer de las muestras y fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con 25 μ l del antisuero primario a una dilución de 1:50 y 1:100 en búfer de lavado (Sección 2.1.5.1). Las muestras controles fueron incluidas en donde el antisuero fue sustituido por suero normal de oveja diluido a la misma concentración que el antisuero primario. Después del periodo de incubación, el antisuero no unido fue eliminado por enjuague con PBS de 3 x 5 min. Las muestras y las células fueron incubadas por 15 minutos en suero bloqueador , después incubadas por 1

hora con 25 µl del anticuerpo secundario, isotiocianato de fluoresceína (FITC)-conjugado con inmunoglobulinas de conejo anti oveja (Dako, Denmark), diluido al 1:200 en solución búfer de lavado (Sección 2.1.5.1). Después de enjuagar se hizo el conteo de células teñidas con 0.01% (p/v) de solución verde metil por 2 minutos y se enjuagaron por 30 segundos en PBS.

Las muestras fueron montadas en Citofluór (glicerol/PBS), observadas a través del microscopio Nikon Diaphot acondicionado con iluminación epifluorescente y fotografiadas con una película de Kodak Ektachrome P1600x. Las células positivas aisladas fueron cuantificadas microscópicamente por conteo, el cual se hizo dos veces. Las células negativas fueron visualizadas por medio del contador nuclear de tinción y cuantificadas. Seis campos por mono capa celular o por zona de cartílago fueron seleccionados al azar y cuantificados. Se calculó el porcentaje de células positivas.

2.2.6.5 Tinción biotina/estreptavidina-peroxidasa de rábano.

Para evitar en los resultados falsos positivos debido a la actividad de la peroxidasa endógena, las muestras fueron tratadas por 5 min. con etanol al 70% (v / v) seguido de hidrogeno peroxidasa en metanol al 1% (v / v) por 10 min. antes de la tinción. Las secciones fueron rehidratadas enjuagándolas por 5 min. en etanol al 70% y 5 min. en agua destilada. El búfer de bloqueo y anticuerpos se trataron de la misma manera como se describió anteriormente para la tinción inmunofluorescente a excepción de que el anticuerpo secundario con biotina se eliminó lavando una vez durante 5 min. en solución

salina fosfato buferada (PBS) y dos veces por 5 min. en búfer Tris-HCl al 0.1%, pH 7.6. (Sección 2.1.5.1). Las muestras fueron incubadas por 30 min. con 25 µl del complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano diluido a 1:100 en búfer 0.1 M Tris-HCl conteniendo 1% (w / v) de suero de albúmina de bovino (BSA). Después de haberse enjuagado dos veces por dos minutos en agua destilada, las muestras fueron enjuagadas dos veces por 5 min. en búfer 0.1 M Tris-HCl. El color de la reacción se desarrolló utilizando diaminobencidina (DAB) (Sigma, UK) (Sección 2.1.5.2). Se les añadió a las muestras solución de stock recién preparada de DAB de 1 mg/ml en búfer 0.1M Tris-HCL con 10 ml de hidrogeno peroxidasa al 1% (v / v) y se incubaron por 15 min. a temperatura ambiente para desarrollar la reacción de color. Las muestras se enjuagaron dos veces por dos minutos en búfer 0.1 M Tris-HCl y una vez por 2 min. en agua destilada, después se montaron en medio de montaje Apathy's y fueron observadas usando un microscopio Nikon Diaphot. Las fotografías fueron tomadas con una película Kodak Ektachrome 64T.

2.2.7 Tinciones histológicas

2.2.7.1 Azul de toluidina

Las secciones fueron teñidas con azul de toluidina para observar la pérdida de proteoglicanos de la matriz extracelular del cartílago articular. Las secciones se tiñeron por 10 minutos en azul de toluidina, posteriormente se lavaron dos veces en agua destilada por 25 minutos, después se sumergieron en etanol al 70% por 10 minutos, en etanol al

90% por 5 minutos, en alcohol absoluto por 1 minuto y finalmente en xilol por 2 minutos. Los portaobjetos se montaron con DPX (Gurr®, UK).

2.2.7.2 Localización de la actividad enzimática *in situ*

La detección de la actividad enzimática de la Catepsina B en cartílago normal sin fijar, condrocitos aislados, cartílago y condrocitos discondroplásicos, se realizó esencialmente a través del método de Van Noorden y Vogels (1987) y Van Noorden *et al* (1987).

El N-carbobenzoxyl-L-alanil-L-arginil-L-arginina-4-metoxido- β naftil-amida (Z-Ala-Arg-Arg-4M β NA) fue utilizado en una concentración del 0.01% como sustrato específico para la Catepsina B, 1mM 2-hidroxy-5-nitrobenzaldheido (5-nitrosalicilaldehido) como reactivo de unión y E64 (10 μ M) como inhibidor específico de la Catepsina B.

Las secciones de cartílago seleccionadas, los condrocitos aislados (2×10^5) fueron cultivados por 48 h. en laminillas de 8 compartimientos. Después las células fueron incubadas en un medio libre de FCS suplementado con antibióticos (Sección 2.1.9.1) 24 horas antes de utilizarse. En el día del experimento, las células fueron cubiertas en solución Hanks salina buferada libre de Ca – y Mg. Las laminillas que contenían las secciones del cartílago o las células, fueron enjuagadas en búfer fosfatado con pH de 6.0 por 2.5 min. y 50 μ l en medio de incubación conteniendo el sustrato específico de Catepsina B. El cartílago y los condrocitos fueron incubados a temperatura ambiente durante la etapa de microscopia fluorescente por un periodo de 150 min. De esta manera

la reacción del producto unida al 5-nitrosalicilaldehído pudo ser continuamente monitoreada. La especificidad de la reacción enzimática fue confirmada durante el periodo de incubación en la presencia del inhibidor E64 o en la ausencia del sustrato específico.

Las laminillas fueron examinadas y fotografiadas durante el periodo de incubación utilizando un microscopio Nikon Diaphot acondicionado con iluminación epifluorescente y fueron fotografiadas durante el transcurso de 5, 20, 45, 60,80 y 150 minutos en un film Kodak Ektachrome P1600x.

RESULTADOS

3

3.1 Localización de la catepsina B en el cartílago articular normal del caballo

Se utilizaron 20 muestras de cartílago articular y de la parte radial distal de la placa de crecimiento congeladas en O.C.T o preparadas en parafina. Estas muestras fueron analizadas para identificar la presencia de la catepsina B mediante inmunofluorescencia utilizando suero específico de ovino anti-humano para la catepsina B (scn, U554/4). Estudios preliminares (Hernández Vidal *et al.* 1996) han confirmado por medio de los métodos de inmunofluorescencia y biotina/estreptavidina-horseradish peroxidasa una distribución heterogénea de la catepsina B en el cartílago articular normal del caballo. Se examinaron quince secciones de 8mm de espesor cada muestra por medio de un microscopio ligero de alta resolución.

Tinción de biotina/estreptavidina-peroxidasa de rábano

La localización inmunocitoquímica de catepsina B en los condrocitos del cartílago articular normal indica que muchas de las células de la zona profunda fueron inmunopositivas debido a la fuerte tinción intracelular. El suero ovino anti-humano catepsina B (sah, U554/4) demostró inmunoreactividad positiva debido a una tinción café de peroxidasa (Fig.3.1b y 3.2a) en las zonas profundas del cartílago donde más del 50% de las células fueron positivas, comparada con la zona articular (Fig. 3.1a), en la que aproximadamente el 30% de los condrocitos fueron débilmente teñidos. No se observó tinción café de peroxidasa en la zona media del cartílago articular normal (Fig. 3.1a). Hubo ausencia de la tinción café peroxidasa en las muestras de cartílago articular normal después de sustituir el anti suero específico por suero pre-inmune (U554/1) o suero normal de oveja (NSS), confirmando así la especificidad de esta clasificación (Fig.3.2b). El método de peroxidasa demostró buena sensibilidad de tinción en las muestras de cartílago.

Inmunofluorescencia

En este estudio se utilizaron 20 caballos separados en 2 grupos, 10 caballos (de 4 a 24 meses de edad) y 10 caballos (de 157 días a 1 mes de edad). Se observó una distribución zonal distintiva de catepsina B en el cartílago articular de la parte troclear lateral del fémur de 10 caballos (de 4 a 24 meses de edad). La figura 3.3a muestra una organización uniforme en la zona profunda del cartílago articular normal. La presencia de catepsina B en las células fue principalmente visto en 50 a 70% de los condrocitos (Fig.3.3b) (Tabla 3.1).

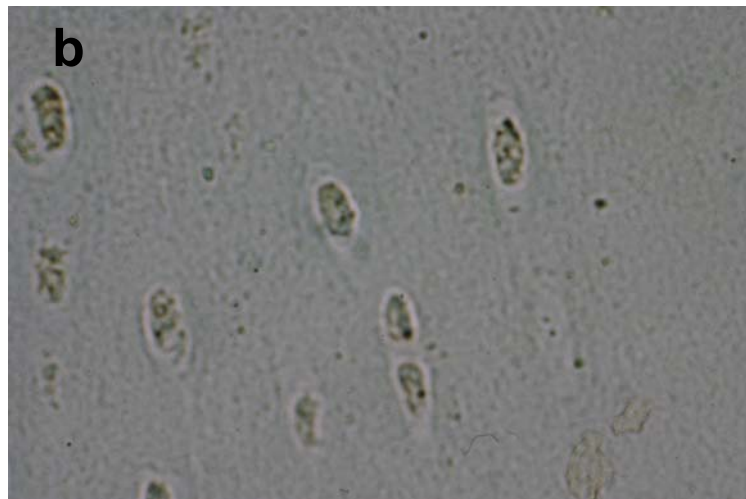
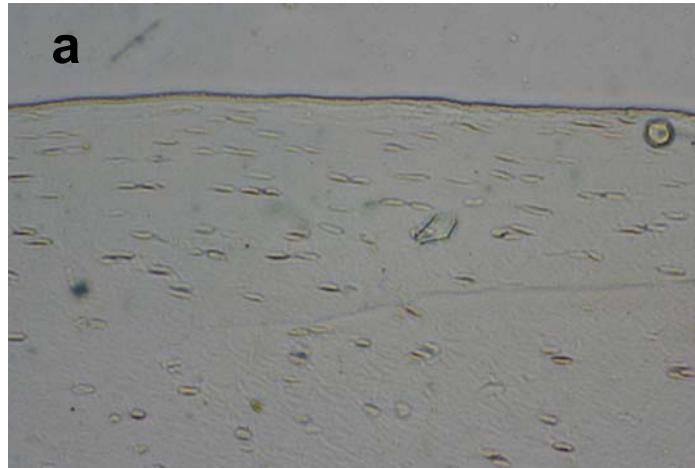


Figura 3.1 Localización inmunocitoquímica de catepsina B en condrocitos del cartílago articular equino (x40).

Sección incubada con suero de ovino anti-humano (α h, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con HRP/estrapavidina diluida 1:200.

(a) Zona articular e intermedia.

(b) Zona profunda.

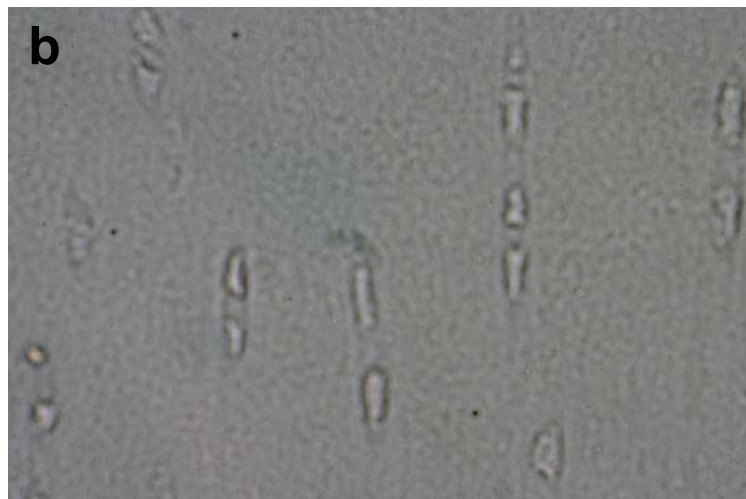
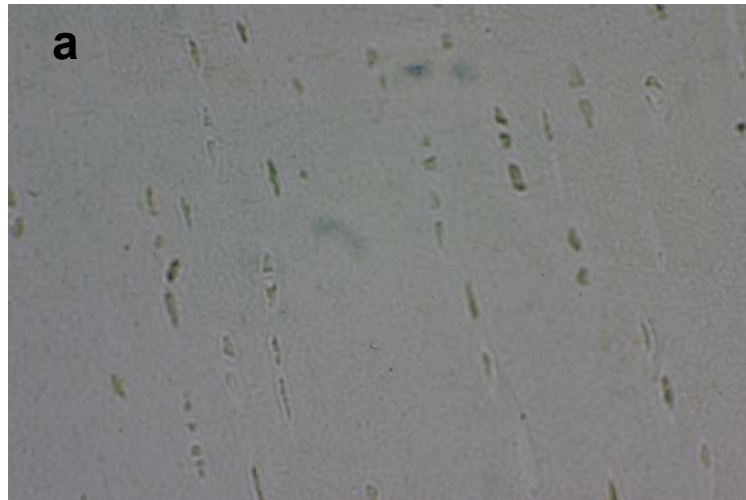


Figura 3.2 Localización inmunocitoquímica de catepsina B en condrocitos del cartilago articular equino (x40).

Sección incubada con suero de ovino anti-humano ($s\alpha h$, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con HRP/estraptavidina diluida 1:200.

(a) Zona profunda.

(b) Zona profunda. Control en donde el suero ovino anti-humano ($s\alpha h$, U554/4) fue sustituido por suero pre inmune (U554/1) diluido 1:50

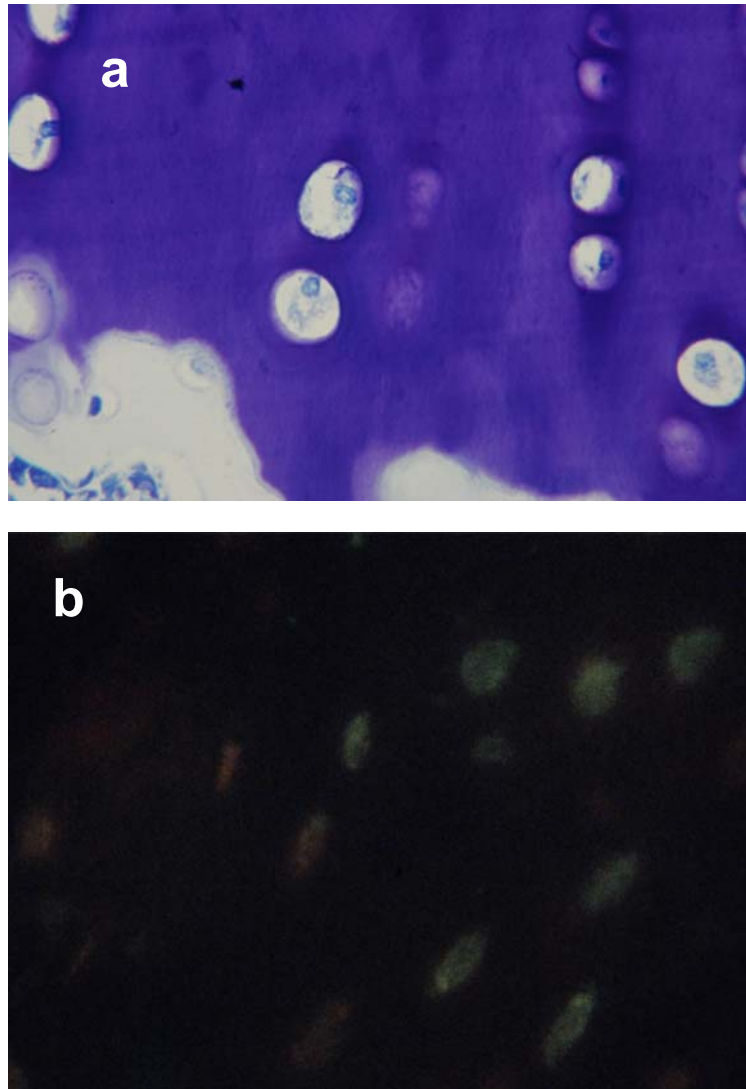


Figura 3.3 Histología y localización inmunocitoquímica de catepsina B en cartílago equino (x40).

(a) Sección teñida con azul de toluidina donde se observa la organización de los condrocitos en la zona profunda.

(b) Sección incubada con suero de ovino anti-humano (α h, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con FITC diluida 1:200. Se observa claramente la reacción inmunopositiva indicando la presencia de la catepsina B en los condrocitos de la zona profunda.

En la zona articular aproximadamente el 30% de los condrocitos fueron débilmente teñidos en contraste con la zona media donde los condrocitos fueron esencialmente negativos, aunque casualmente se localizaron células inmunopositivas (aprox. <10%) (Tabla 3.1).

No se observó tinción inmunofluorescente extracelular en ninguna de las zonas del cartílago articular.

Se observaron muestras negativas a catepsina B sustituyendo el suero ovino anti-humano de catepsina B (sch, U554/4) por el suero de oveja pre inmune (U554/1) o normal (NSS). Todos estos resultados concuerdan con las observaciones de Ali y Bayliss (1975) y Baici *et al* (1995a; b) en el cartílago humano, que encontraron estas enzimas en los sitios de remodelación de la matriz, y con el típico patrón de localización intracelular de catepsina D (Hernández-Vidal *et al* 1996; 1997a).

Es importante mencionar que únicamente en una muestra fetal de la tróclea lateral del fémur de un rango de 157 días a 1 mes de edad, se identificó una inmunoreactividad enzimática positiva para la catepsina B (Tabla 3.2). En esta muestra, se observó una desorganización celular que consistía en una masa de condrocitos anormales con una degradación de proteoglicanos en áreas específicas. Esto es debido a las alteraciones en la secuencia normal de eventos de la osificación endocondral. Sólo en ésta muestra se observó una fuerte inmunotinción de catepsina B en el 50 a 70% de las células en la zona articular, media y profunda. No se detectó expresión enzimática extracelularmente. Tampoco hubo tinción inmunofluorescente en ninguna

C A T E P S I N A B

Equino #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tinción Zona-Art	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tinción Zona-Med	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Tinción Zona-Prof	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Liberación enzimática	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

Rango de edad de 4 a 24 meses.

Tabla 3.1

Distribución zonal de la catepsina B en cartilago articular equino (tróclea lateral)

- =0% no tinción; +/- =<10%, tinción débil; + =10-30%, tinción débil; ++ = 40-50%, tinción moderada; +++ =50-70%, tinción fuerte; ++++ =70-90%, tinción fuerte; +++++ =>90% tinción fuerte.

C A T E P S I N A B

Equino #	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tinción Zona-Art	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Tinción Zona-Med	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Tinción Zona-Prof	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Liberación enzimática	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

Tróclea lateral del fémur.

Tabla 3. 2

Distribución zonal de la catepsina B en cartílago articular equino. Rango de edad 157 d – 1 mes de edad.

- = 0% no tinción; +/- =<10%, tinción débil; + =10-30%, tinción débil; ++ = 40-50%, tinción moderada; +++ =50-70%, tinción fuerte; tinción fuerte; ++++ =70-90 tinción fuerte; +++++ =>90% tinción fuerte.

muestra de la parte radial distal de la placa de crecimiento de los mismos 10 caballos (157 días a 1 mes de edad).

Los resultados determinaron una distribución específica de la catepsina B en las muestras de cartílago normal de la parte troclear lateral del fémur en caballos de edad variable. La catepsina B demostró una expresión relacionada con la edad, lo que sugiere que las enzimas juegan un papel importante en la regulación del desarrollo. La expresión de catepsina B en los sitios intracelulares y extracelulares en la parte radial distal de la placa de crecimiento (5 a 12 meses de edad) no fue investigado por lo que no se puede descartar una distribución similar a la catepsina D.

3.2 Expresión de catepsina B en cartílago discondroplásico y en condrocitos aislados de cartílago discondroplásico.

3.2.1 Distribución de la catepsina B en discondroplasia equina

Los resultados, los cuales indican una diferencia en la distribución de la catepsina B en las diferentes zonas del cartílago articular y la poca inmunodetección de la enzima en la primera línea de condrocitos aislados del cartílago articular, implican que la expresión de esta enzima difiere bajo condiciones patológicas. La expresión de ésta enzima fue investigada en cartílago articular y condrocitos aislados de caballos con discondroplasia.

C A T E P S I N A B						
Equino #	N	21	22	23	24	25
Tinción Zona-Art.	+	+	+	+/-	+	+
Tinción Zona-Med	+/-	+/-	+	+	+	+
Tinción Zona-Prof	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Colonias celulares	No	Si	Si	Si	Si	Si
Tinción colonias celulares	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Liberación enzimática	No	No	No	Si	Si	Si

Rango de edad 12 a 24 meses.

Tabla 3.3
Distribución de catepsina B en cartilago articular equino con discondroplasia.
- =0% no tinción; +/- =<10%, tinción débil; + =10-30%, tinción débil; ++ = 40-50%, tinción moderada; +++ =50-70%, tinción fuerte; ++++ =70-90%, tinción fuerte; +++++ =>90% tinción fuerte. N , combinación de la tinción de áreas normales de los caballos con discondroplasia (21,22,23,24,25)

Análisis inmunohistoquímico de cartílago discondroplásico

La lesión principal de discondroplasia que se presenta en el complejo articular/epifiseal del cartílago en crecimiento se observó mediante un microscopio ligero como sitios multifocales de retención de cartílago, que consisten en regiones en el cartílago necrótico con depleción de condrocitos rodeado por colonias de condrocitos (Figura 3.4).

La localización y distribución de la catepsina B en los condrocitos del cartílago, fue analizada en muestras preparadas en parafina proveniente de 5 caballos (de 12 a 24 meses de edad) con discondroplasia. Una peculiaridad importante del cartílago discondroplásico fue la presencia de grupos de condrocitos que se tiñeron fuertemente para catepsina B (Tabla 3.3; Fig. 3.5a). Se estimó que <90% de los condrocitos en estos grupos fueron inmunopositivos. La especificidad de esta reacción fue confirmada por la ausencia de tinción inmunofluorescente cuando el antisuero (sah,U554/4) fue sustituido por el suero de oveja normal (NSS) o por el suero de oveja preinmune (U554/1) (Fig.3.5b). Los análisis histológicos demostraron que los grupos consistían en masas de células que variaban en tamaño dentro de espacios vacíos llamados lagunas formadas en la matriz (Fig. 3.6a). La tinción meta cromática de la matriz en las áreas de organización de estos grupos se redujo notablemente. Frecuentemente esta tinción se encontró relacionada con áreas anormales de cartílago en la zona profunda (Fig. 3.5c), casualmente también se observaron áreas de colonias celulares, extendiéndose a través de la zona media hacia la superficie articular (Fig. 3.6a). La organización dispersa de las colonias

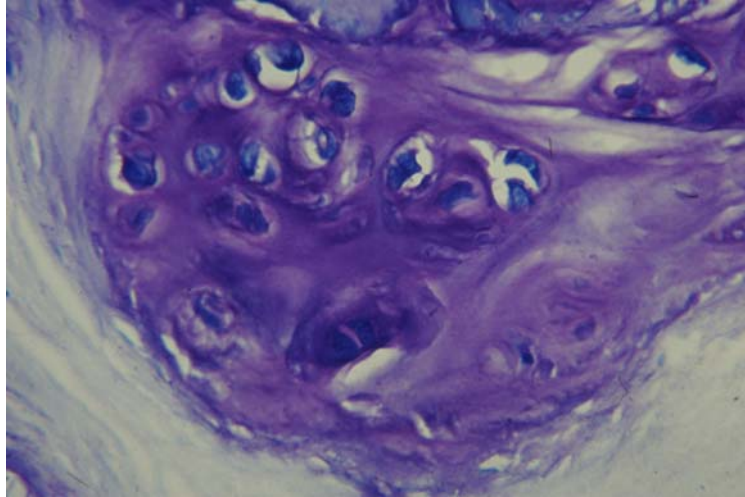


Figura 3.4 Sección teñida con azul de toluidina (x40) en donde se observa la desorganización de los condrocitos en la zona profunda.

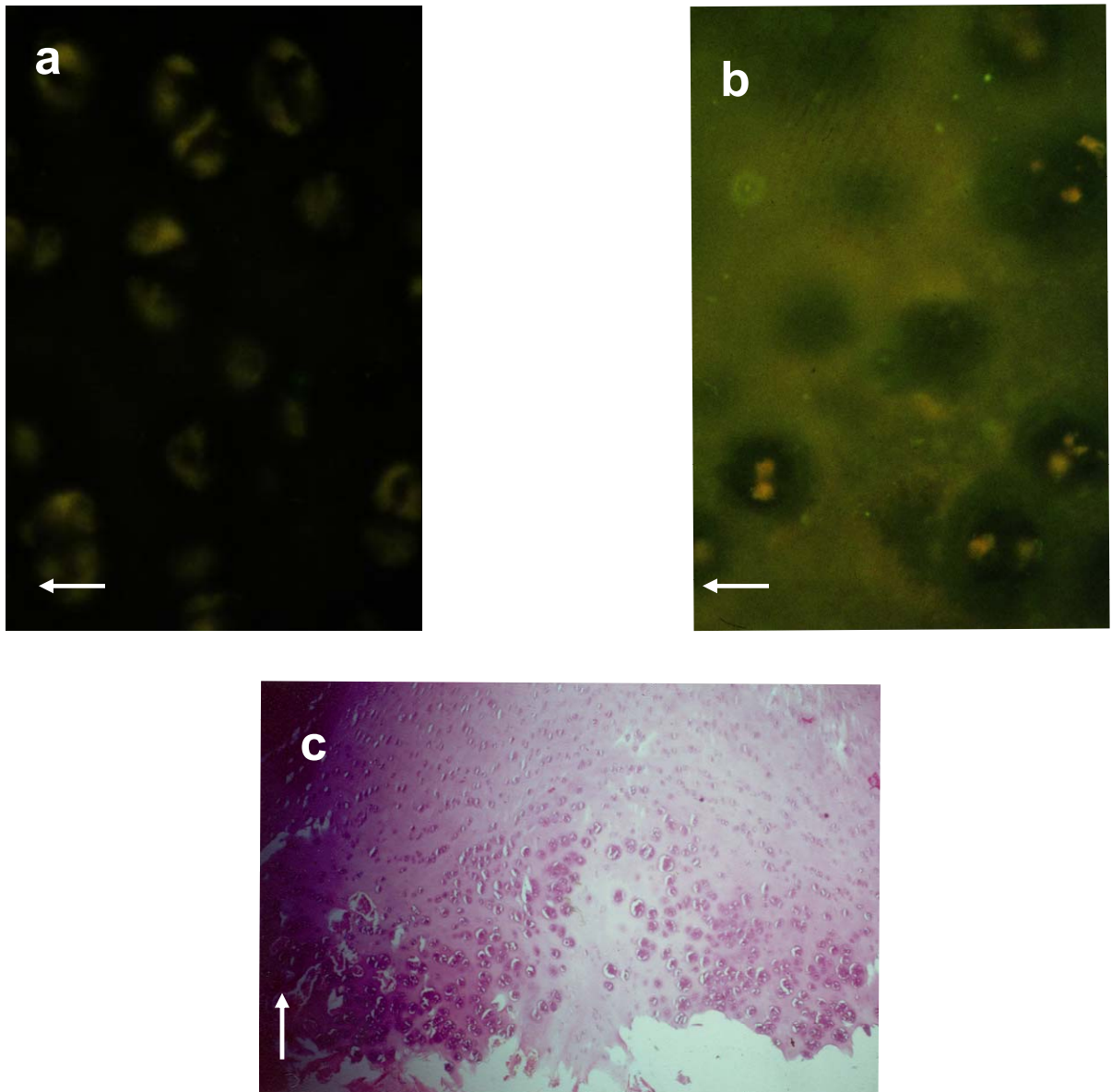


Figura 3.5 Inmunolocalización de catepsina B e histología de cartílago discondroplásico tomado de la cresta lateral de la tróclea del fémur de un equino.
(a) Sección incubada con suero de ovino anti-humano (α h, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con FITC diluida 1:200.
(b) Control en donde el suero de ovino anti-humano (α h, U554/4) fue sustituido por suero pre inmune (U554/1) diluido 1:50.
(c) Sección teñida con azul de toluidina donde se observa la desorganización de los condrocitos en la zona profunda. Las flechas indican la dirección de la zona articular.

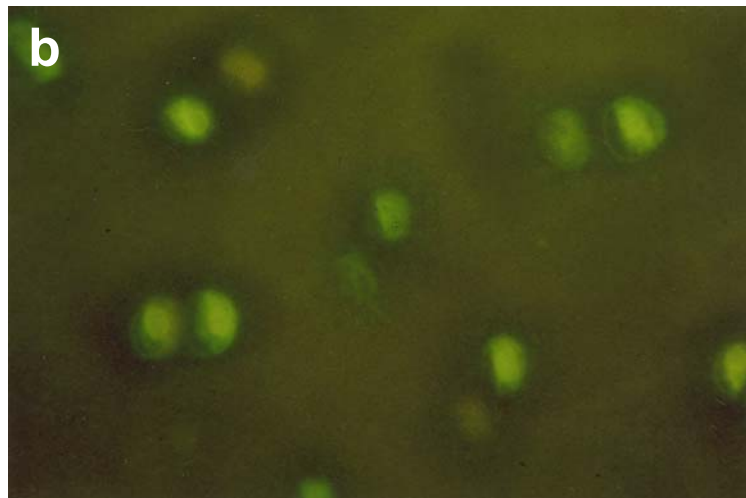
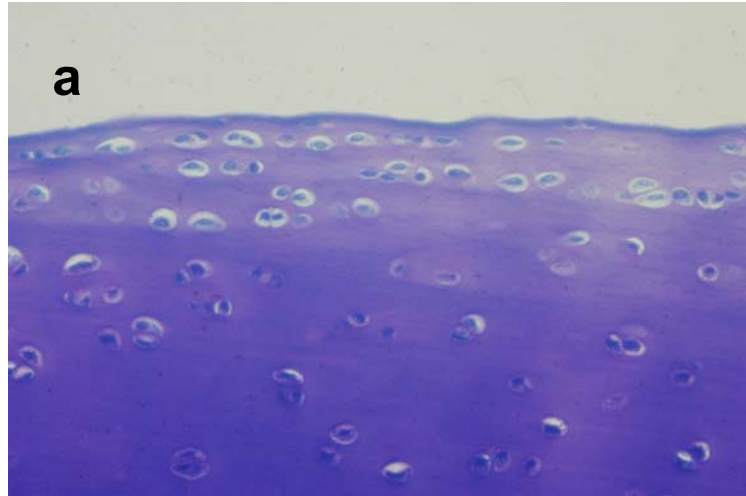


Figura 3. 6 Histología e inmunolocalización de catepsina B en cartílago discondroplásico.
(a) Sección teñida con azul de toluidina zona articular.
(b) Sección incubada con suero de ovino anti-humano (α h, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con FITC diluida 1:200. Células de la zona profunda (x40).

contribuyó a la desorganización zonal en el cartílago y elevó la variabilidad en la distribución de la catepsina B entre las diferentes muestras de cartílago discondroplásico. Esto contrasta con la distribución zonalmente uniforme en el cartílago normal.

Dejando a un lado las lesiones, se observaron áreas de cartílago aparentemente “normal” desprovistos de grupos de condrocitos. Los patrones de tinción en las tres zonas de estas áreas “normales” del cartílago se muestran en la Tabla 3.3 de los 5 diferentes caballos con discondroplasia. Se puede observar que la tinción de la catepsina B se elevó en la zona intermedia en 3 caballos y fue más intensa y elevada en la zona profunda (Fig. 3.6b) en los 5 caballos.

Fue interesante notar que las muestras de 3 caballos con discondroplasia teñidas para catepsina B también contenían fluorescencia en la matriz extracelular (Tabla 3.3). La localización y distribución de la catepsina B en la matriz extracelular fue generalmente observada en las zonas media y profunda del cartílago articular, donde la tinción meta cromática de la matriz disminuyó considerablemente. En las áreas donde se observó mayor fluorescencia de la matriz hubo menor inmunoreactividad a catepsina B en los condrocitos y viceversa. (Fig.3.7).

Interesantemente, estas muestras con catepsina B extracelular vinieron de caballos tratados con hormona de crecimiento. Aisa *et al.* (1996) demostraron un incremento significativo en la actividad intracelular pero también un aumento

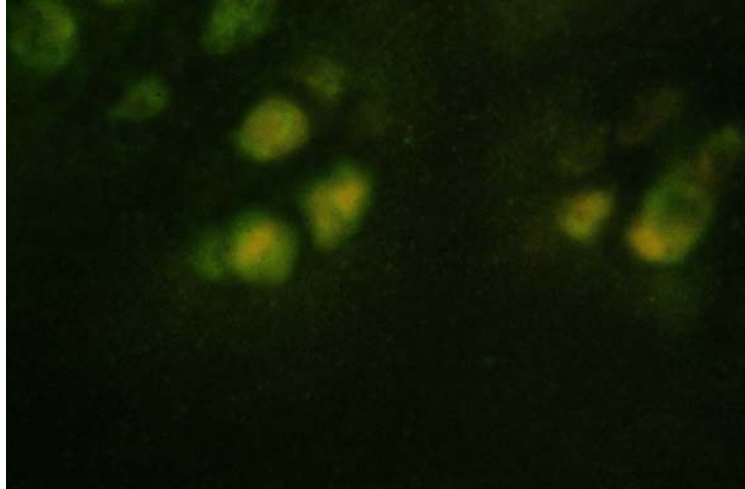


Figura 3.7 Inmunolocalización de catepsina B en caballo tratado con hormona del crecimiento. Sección incubada con suero de ovino anti-humano ($s\alpha h$, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con FITC diluida 1:200. Células de la zona profunda (x40).

de catepsina B extracelular con un potente agente de reabsorción ósea (hormona paratiroide) en especímenes de hueso humano.

Análisis inmunocitoquímico de condrocitos discondroplásicos aislados

Durante el curso de este estudio, el cartílago discondroplásico fue obtenido en suficientes cantidades de 3 caballos de 12 meses de edad, para permitir el aislamiento de suficientes condrocitos para su cultivo. Como se demostró anteriormente en condrocitos cultivados y muestras de cartílago, las células discondroplásicas producen más catepsina B a diferencia de células del cartílago normal. La mayoría (aproximadamente 90%) de los condrocitos discondroplásicos en los cultivos primarios, contenían un gran número de gránulos citoplasmáticos teñidos positivamente (Fig. 3.8a). La expresión extracelular de la enzima fue una característica constante de las células discondroplásicas. En las 3 muestras, también se observó que el fenotipo celular en los condrocitos discondroplásicos era diferente.

También se observó que las células discondroplásicas se adherían rápidamente al fondo del frasco para cultivo celular comparadas con los condrocitos normales. Cuando los condrocitos articulares discondroplásicos fueron primeramente aislados y puestos en cultivos de mono capa celular, se observó que las células se adherían rápidamente al fondo del frasco en solo 10 a 15 minutos después de la digestión enzimática mientras que los condrocitos normales aislados necesitaron de 3 a 24 horas.

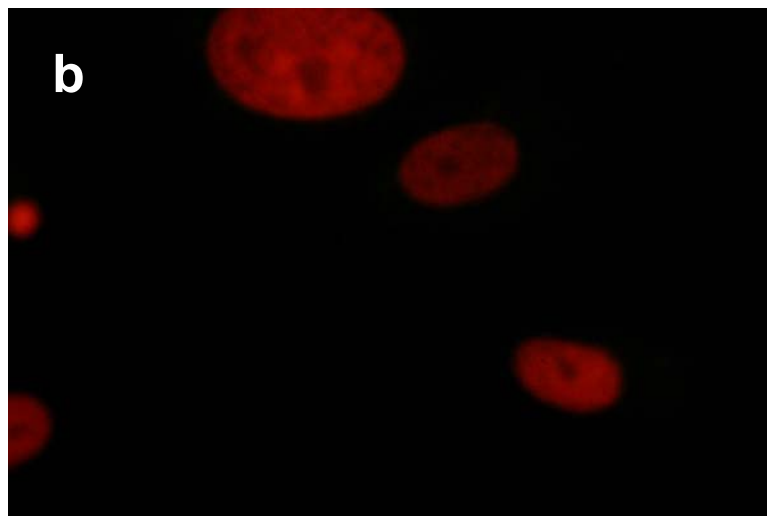
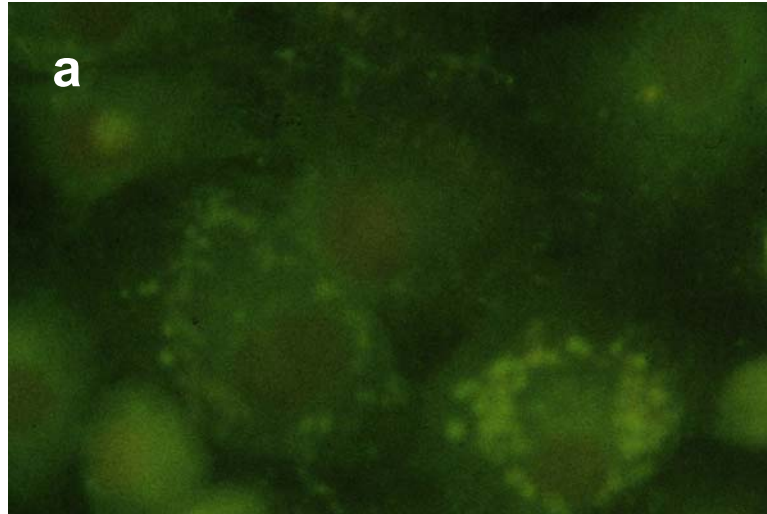


Figura 3.8 Localización inmunocitoquímica de catepsina B en cultivo de monocapa de condrocitos discondroplásicos.

(a) Monocapa de condrocitos discondroplásicos incubados con suero de ovino anti-humano (α h, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con FITC diluida 1:200.

(b) Control en donde el suero de ovino anti-humano (α h, U554/4) fue reemplazado por suero pre inmune (U554/1) diluido 1:50.

Los cultivos de células discondroplásicas en mono capa celular incubados con suero de oveja pre-inmune (U554/1) seguido por inmunoglobulinas IgG de conejo anti oveja, conjugado con FITC, como control, no presentaron tinción fluorescente (Fig.3.8b).

3.3 Efectos del impacto mecánico en la expresión y distribución de la catepsina B en el cartílago articular.

El cartílago articular de caballo sometido a pruebas de impacto fue proporcionado por el departamento de ortopedia de la Universidad de Aberdeen, Reino Unido.

El cartílago articular es un material mecánicamente fuerte y flexible, el cual transmite y distribuye los impactos en las articulaciones al mismo tiempo que provee de baja fricción en la superficie articular (Weightman y Kempson, 1979; Swanson, 1979). El efecto del estímulo mecánico en la expresión enzimática en el cartílago fue investigada desde que las fuerzas físicas (impacto en articulación) son consideradas en la prevención y patogénesis de la enfermedad articular. El cartílago articular equino (16 a 20 meses de edad) fue sometido a pruebas de impacto utilizando masas de 500 g a una altura de 5 cm. (bajo impacto), 10 cm. (impacto medio) y 20 cm. (alto impacto), mostrando un daño observable en las muestras de cartílago, transformando la superficie suave en una forma fisurada y elíptica (Jeffrey *et al* 1995).

La localización y distribución de la catepsina B se investigó en muestras preparadas en parafina y congeladas en O.C.T de cartílago articular de equino normal (control) y anormal (impactado) utilizando microscopio ligero de alta resolución.

3.3.1 Expresión y distribución de la catepsina B en cartílago articular impactado.

El antisuero utilizado en este estudio mostró reacción cruzada con el homólogo de bovino para catepsina B. La especificidad de esta enzima para el antisuero fue confirmada anteriormente por Hernández Vidal *et al.* 2002 por medio del electroforesis en gel SDS y análisis de Western blot .

Análisis inmunohistoquímico

En todas las muestras de cartílago de equino estudiadas (edad de 16 a 20 meses de edad) se demostró que la localización de la catepsina B es intracelular sin evidencia de liberación de la enzima en la matriz extracelular.

El análisis inmunohistoquímico demostró un incremento en la expresión de la catepsina B en la zona articular del cartílago que sufrió un bajo impacto. Aproximadamente 40 a 50% de la población celular dentro de esta zona, presentaron una tinción moderada para catepsina B (Tabla 3.4., Fig. 3.9a). Las células que no se tiñeron fueron identificadas por la coloración roja para conteo nuclear celular como se describió en *Materiales y Métodos* (Sección 2.2.6.4).

CATEPSINA B				
Grupo	Control	Impacto Bajo	Impacto Moderado	Impacto Alto
Tinción Zona-Art	+	++	+/-	+/-
Tinción Zona-Med	+	+	+/-	+/-
Tinción Zona-Prof	+	+/-	+/-	+/-
Tinción Matriz extracelular	No	No	No	No

Tabla 3.4
Distribución zonal de la catepsina B en cartílago articular después de una prueba de impacto.
 +/- =<10%, tinción débil; + =10-30%, tinción moderada; ++ = 40-50%, tinción moderada; +++ =50-70%, tinción fuerte; ++++ =70-90%, tinción fuerte; +++++ =>90% tinción fuerte.

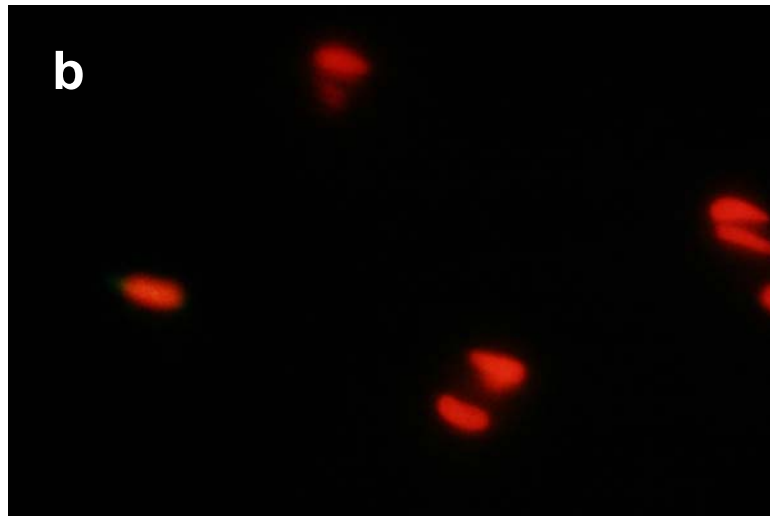
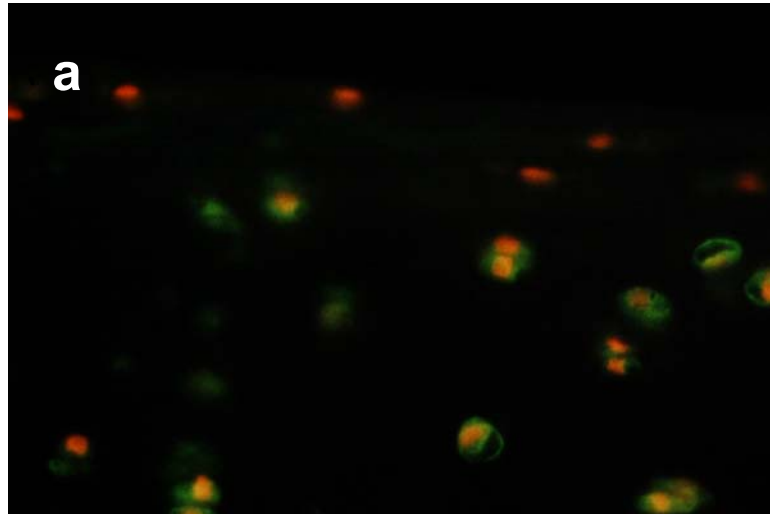


Figura 3.9 Localización inmunocitoquímica de catepsina B en cartílago articular equino después de una prueba de impacto.

(a) Cartílago articular equino después de una prueba de impacto bajo (0h) incubado con suero de ovino anti-humano ($s\alpha h$, U554/4) diluida 1:50 y con IgG de conejo anti-ovino conjugada con FITC diluida 1:200.

(b) Control donde el suero de ovino anti-humano ($s\alpha h$, U554/4) fue reemplazado por suero pre inmune (U554/1) diluido 1:50.

En la zona media entre el 10 y 30% de la población celular demostraron una inmunoreactividad moderada a catepsina B mientras que en la zona profunda menos del 10% de los condrocitos presentaron una tinción débil (Tabla 3.4).

Se observó una reducción intracelular de la catepsina B en la zona articular y media tanto en muestras sometidas a impacto moderado y alto impacto. Se notó una pequeña proporción (<10%) de condrocitos teñidos débilmente para catepsina B (Tabla 3.4). No se observaron cambios en la zona profunda. En las muestras no impactadas (control) no hubo diferencias en la distribución enzimática y la zona articular, media y profunda se tiñeron moderadamente (Tabla 3.4).

Las muestras control en donde el suero para catepsina B de ovino anti humano (saH, U554/4) fue reemplazado por el suero pre inmune (U554/1) fueron negativas (Fig. 3.9b).

3.3.2 Expresión y distribución de la catepsina B en el cartílago articular sometido a bajo impacto durante largos periodos en cultivo.

La expresión y distribución de la catepsina B fue investigada en el cartílago articular equino sometido solo a una prueba de bajo impacto durante largos periodos de tiempo en cultivo (0h, 4h, 8h, 1 día, 2 días, 5 días). El bajo impacto fue seleccionado ya que demostró que no había daño significativo en el tejido y presentaba un aumento en la expresión de la enzima.

Análisis inmunohistoquímico

Las muestras de cartílago articular de equino impactadas (impacto bajo 0h) demostraron un incremento en la expresión de catepsina B en la zona articular. Cerca del 40 a 50% de los condrocitos mostraron una expresión intracelular moderada de la enzima. Los niveles de expresión de la catepsina B fueron similares durante largos periodos en cultivo (4h, 8h, 2 días, 5 días) (Tabla 3.5). Se observó un incremento en la inmunoreactividad de la enzima en la zona articular en muestras de bajo impacto después de pasar en cultivo por 24 horas. Aproximadamente del 50 al 70% de las células se tiñeron intensamente para catepsina B (Tabla 3.5).

En la zona media no se detectaron cambios a nivel de expresión enzimática entre las muestras control y las que fueron sometidas a bajo impacto (0h, 4h, 8h). Los condrocitos (10-30%) en esta área mostraron una inmunoreactividad positiva moderada (Tabla 3.5) al mismo tiempo que hubo un incremento en el número de condrocitos inmunopositivos (40-50%) para catepsina B en explantes después de 1 día, 2 días y 5 días en cultivo (Tabla 3.5).

Un decremento en el número de células inmunopositivas (<10%) se observó en la zona profunda de las muestras sometidas a bajo impacto inmediatamente después del impacto (L0h) seguido de un cultivo de 4h (Tabla 3.5).

Un incremento gradual de la expresión intracelular (10-30%) de la enzima fue observado en la zona profunda de las muestras de cartílago articular sometidos

C A T E P S I N A B							
Grupo	Control	Impacto Bajo 0h	Impacto Bajo 4h	Impacto Bajo 8h	Impacto Bajo 1 día	Impacto Bajo 2 días	Impacto Bajo 5 días
Tinción Zona-Art	+	++	++	++	+++	++	++
Tinción Zona-Med	+	+	+	+	++	++	++
Tinción Zona-Prof	+	+/-	+/-	+	+	++	++
Tinción Matriz extracelular	No	No	No	No	No	No	No

Tabla 3.5

Distribución zonal de la catepsina B en cartílago articular durante diferentes periodos de tiempo.

+/- =<10%, tinción débil; + =10-30%, tinción moderada; ++ = 40-50%, tinción moderada; +++ =50-70%, tinción fuerte; ++++ =70-90%, tinción fuerte; +++++ =>90% tinción fuerte. C, combinación de resultados de todas las muestras control, n=3 por cada periodo de tiempo.

a impacto bajo seguidos de un cultivo de 8 horas y 1 día. Los niveles de inmunoreactividad incrementaron (40 a 50%) en los especímenes cultivados por 2 y 5 días (Tabla 3.5). No se observó tinción inmunopositiva en las muestras de cartílago articular sometidas a bajo impacto seguidas de la sustitución de suero de catepsina B (sah, U554/4) por suero pre-immune (U554/1). No hubo evidencia de liberación de la enzima en sitios extracelulares.

3.4 Estudios de la actividad enzimática de la catepsina B

Basados en datos obtenidos de estudios inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos, se decidió investigar la actividad de esta proteinasa cisteínica. Este estudio proporcionara información esencial que servirá para correlacionar la presencia de la enzima con su actividad e identificar posibles deterioros por la actividad de la proteinasa cisteínica en la discondroplasia.

La actividad de la catepsina B fue detectada por los métodos de fluorescencia histoquímica y citoquímica utilizando Z-Ala-Arg-Arg-4MβNA como sustrato específico para catepsina B (McDonlad y Ellis, 1975; Van Noorden *et al* 1987; Baici *et al* 1988; Baici *et al* 1995a, Shuja y Murnane, 1996) el cual es conocido por ser selectivo (Smith *et al* 1972; Szego *et al* 1976), y 5-nitrosalicilaldehído (Dolbeare y Vanderlaan, 1979; Graf *et al* 1979; Van Noorden *et al* 1987) como un reactivo acoplador para producir un producto fluorescente. Se confirmó la especificidad de la reacción enzimática utilizando el inhibidor específico de catepsina B E-64 (Barret *et al* 1982; Baici y Lang, 1990; Kawada *et al* 1995; Baici *et al* 1995; Aisa *et al* 1996) como en *Materiales y Métodos* (Sección 2.2.7.2).

3.4.1 Localización histoquímica de la actividad enzimática de la catepsina B en muestras normales y discondroplásicas.

En la primera serie de experimentos, un total de 48 muestras de cartílago articular de 10 caballos en un rango de edad de 4 a 24 meses de edad fueron analizadas para detectar la actividad enzimática de la catepsina B. Las muestras sin fijar fueron cortadas en un criostato. La actividad enzimática de la catepsina B no fue detectada en ninguna de las muestras de cartílago normal. Estos resultados concuerdan con los de Baici *et al.* (1995b), donde reportan que no hay actividad de catepsina B en cartílago osteoartrítico aparentemente intacto o levemente dañado y por otro lado, el cartílago severamente dañado se tiñó positivamente. Basándonos en estas observaciones donde las muestras patológicas demuestran actividad enzimática de catepsina B y por los altos niveles de expresión de esta enzima encontrados en los grupos de condrocitos los cuales son característicos de la lesión discondroplásica, se analizaron muestras de caballos con discondroplasia.

Desafortunadamente la localización de actividad enzimática de catepsina B presentó dos dificultades en las muestras discondroplásicas disponibles. (i) Todas las muestras patológicas fueron fijadas en paraformaldehído al 4%. Graf y Strauli (1983) demostraron que la inclusión o fijación con formaldehído (4%) detiene la inmunoreactividad de catepsina B en fibroblastos de piel de conejo. (ii) Todas las muestras fueron montadas en parafina las cuales necesitaron una serie de inmersiones en alcohol para enjuagar las muestras. Sin embargo, la actividad enzimática de catepsina B en cartílago discondroplásico fue

investigada en muestras de la troclea lateral del fémur de 5 caballos (de 12 a 24 meses de edad). Fueron analizadas un total de 45 muestras. No se detectó actividad enzimática en las muestras patológicas, probablemente debido a la combinación de los dos factores antes mencionados. El uso del medio de actividad fue usado únicamente en las muestras congeladas y no fijadas, ya que fueron excluidas el uso de las muestras embebidas en parafina, creando problemas para la interpretación de la actividad enzimática de catepsina B en las muestras discondroplásicas. Sin embargo, en condrocitos discondroplásicos primeramente aislados, se observaron elevados niveles de actividad enzimática.

Las células discondroplásicas primeramente aisladas y sin fijar que fueron incubadas con el medio para actividad enzimática (*Materiales y Métodos 2.1.9.2*) mostraron tanto la actividad lisosomal como extracelular de la catepsina B. La catepsina B puede sobrevivir en la matriz extracelular por un periodo suficiente de tiempo para producir una degradación significativa de los componentes del tejido conectivo (Mort *et al* 1984; Baici y Knopfel, 1986) y esa actividad extracelular es estable bajo condiciones relativamente fisiológicas (Aisa *et al* 1996).

La reacción fluorescente se incremento progresivamente durante la incubación. Sin embargo, se observó una fuerte tinción fluorescente específica inmediatamente después de que la reacción había comenzado. Fuertes partículas fluorescentes lisosomales estuvieron presentes en las células así como también se detectó actividad extracelular. La intensidad de las partículas fluorescentes se observaron como cristales después de la incubación por 20 minutos con el medio para actividad enzimática (Fig. 3.10). El método de

fluorescencia microscópica demuestra partículas amarillas brillantes fluorescentes, lo cual indica actividad enzimática de catepsina B.

Estas observaciones demuestran que en condrocitos discondroplásicos existe una correlación proporcional entre la presencia de la enzima y su actividad.

Basándonos en resultados previos donde muestras congeladas y preparadas en parafina no permiten la detección de actividad enzimática de catepsina B, no se llevaron a cabo estudios en muestras sometidas a impacto de carga.

3.4.2 Localización citoquímica de la actividad enzimática de la catepsina B en condrocitos modulados fenotípicamente.

Los primeros condrocitos aislados liberaron pequeñas o no detectables cantidades de enzima lisosomal y la actividad de la Catepsina B no fue detectada en muestras de cartílago normal, la actividad de esta enzima fue estudiada en condrocitos fenotípicamente modulados mediante una serie de subcultivos los cuales demostraron un incremento gradual en la expresión de ésta enzima. La actividad enzimática de la Catepsina B fue identificada mediante la reacción fluorescente y observada en el microscopio epifluorescente.

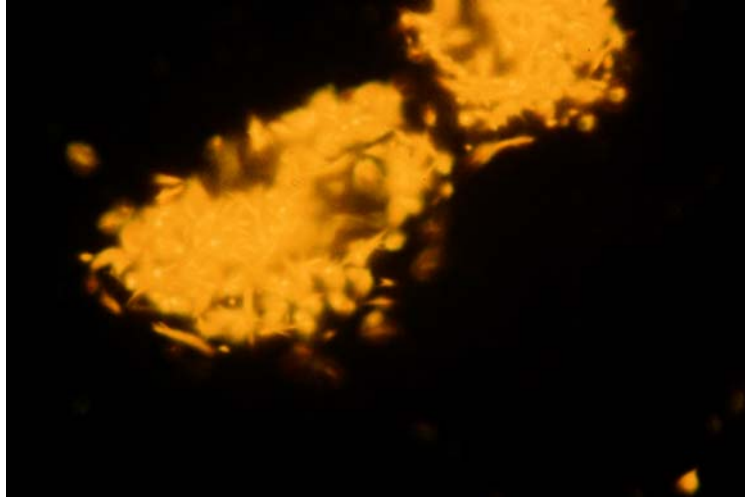


Figura 3.10 Actividad enzimática de la catepsina B en condrocito discondroplásico. Monocapa de condrocitos incubados con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4MBNA y 5- nitrosalicilaldehído. Actividad después de 20 minutos de incubación.

La figura 3.11 a-b muestra la actividad lisosomal fluorescente de la Catepsina B. Utilizando el medio de actividad de la enzima (materiales y métodos sección 2.1.9.2) conteniendo el sustrato específico de Catepsina B y 5-nitrosalicilaldeído como un reactivo de unión, en condrocitos fenotípicamente modulados se observaron partículas con una marcada fluorescencia amarilla en los lisosomas de las células (figura 3.11a.) Sin embargo, también se detectó la actividad extracelular del homólogo equino de la Catepsina B. Así mismo, se observó que la intensidad de las partículas fluorescentes se incrementó durante la incubación para la actividad de la Catepsina B, y eventualmente se observaron cristales en forma de estrella (figura 3.11b). Estas observaciones coinciden con Van Noorden *et al* 1987 donde se reportó una cristalización de la reacción final del producto.

La actividad lisosomal de la célula fenotípicamente modulada fue comparable con la observada en condrocitos discondroplásicos.

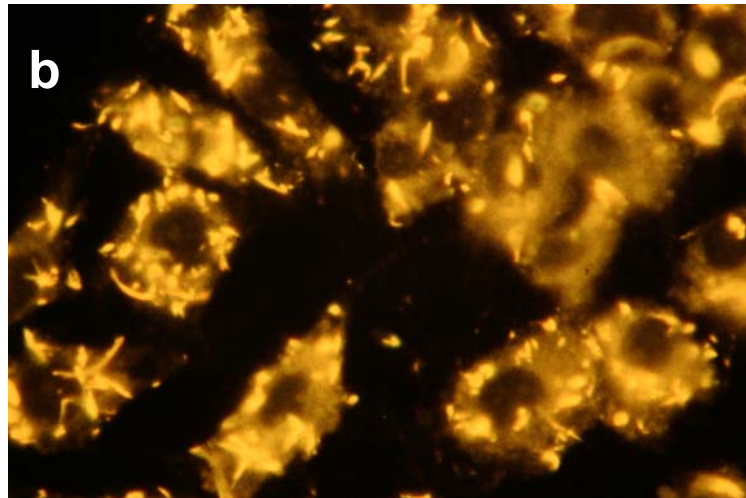
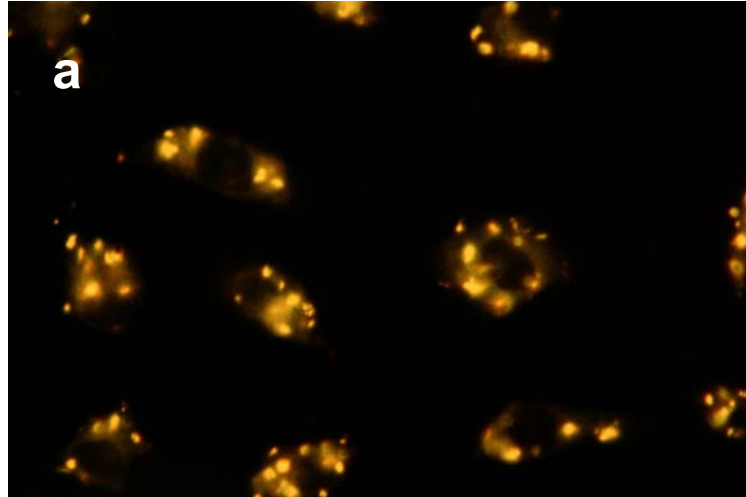


Figura 3. 11 Actividad de catepsina B en condrocitos fenotípicamente modulados ($\times 100$). Monocapa de condrocitos incubados con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4MBNA y 5- nitrosalicilaldehído.
(a) Actividad después de 25 min en incubación.
(b) Actividad después de 45 min en incubación.

3.4.3 Monitoreo de la actividad enzimática de la catepsina B en condrocitos durante la incubación.

En los condrocitos fenotípicamente modulados sin fijación, la reacción amarillo fluorescente del producto se incrementó con el tiempo de incubación. La figura 3.12 a,b y c muestra a los condrocitos durante el monitoreo de la actividad de la Catepsina B. Se observó una leve tinción fluorescente no específica (Dolbeare y Smith, 1977; Dolbeare y Vanderlaan, 1979) en el citoplasma de las células durante los primeros 5 min. de incubación (Fig.3.12a). Algunas pequeñas partículas amarillas fluorescentes comenzaron a aparecer después de 5 a 7 min., sin embargo, se observó que incrementaron las partículas lisosomales fluorescentes por célula durante los primeros 25 min. después de iniciada la reacción.

Después de 50 minutos se observó un incremento más, tanto en el número como en la intensidad de las partículas fluorescentes amarillas en los lisosomas de las células (figura 3.12 C). Los controles en los cuales los condrocitos fueron incubados con el medio de actividad enzimática por 60 min. en la ausencia de un sustrato específico de la Catepsina B (Z-ala-arg-arg4MβNA) o en la presencia de un inhibidor específico (E-64) (*Materiales y Métodos* sección 2.1.9.3) no mostraron ninguna actividad inmunofluorescente (dato no mostrado). Este experimento fue realizado 10 veces obteniendo resultados similares.

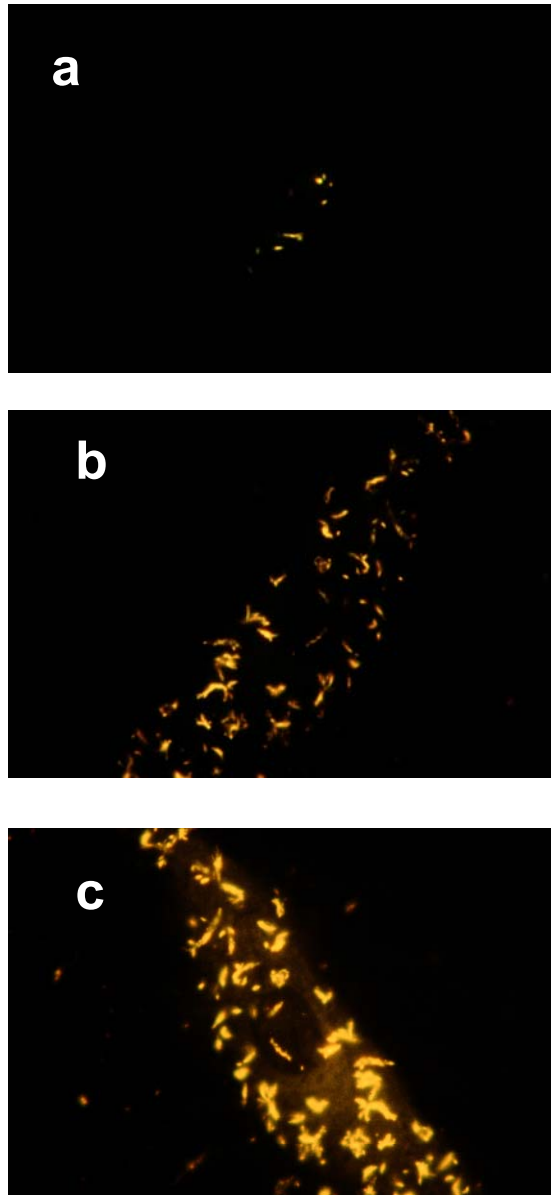


Figura 3. 12 Monitoreo de la actividad enzimática de la catepsina B en condrocitos durante incubación con el medio para actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4M β NA y 5-nitrosalicilaldehido.

- (a) Actividad después de 5 min de incubación
- (b) Actividad después de 25 min de incubación
- (c) Actividad después de 50 min de incubación

3.4.4 Efectos del cobre y zinc en la actividad enzimática de la catepsina B

En base a los niveles incrementados de expresión de enzimas lisosomales observadas en experimentos co-cultivados, se decidió investigar si había una correlación con la actividad de la Catepsina B.

Con el fin de investigar la correlación *in vitro* de la expresión de la Catepsina B y su actividad en condrocitos, los especímenes de cartílago fueron co-cultivados con tejido sinovial, cobre y zinc (0.01 mM). Un total de 60 especímenes congelados de cartílago articular y hueso subcondral cortados en un microtomo criogénico sin fijar fueron teñidos por la actividad de la catepsina B utilizando un reactivo de unión (5-nitrosalicilaldeído) (Dolbeare y Vanderlaan), 1979; Graf *et al* 1979, Van Noorden *et al.* 1987) y un inhibidor específico (E-64) (Barrett *et al* 1982; Baici y Lang, *et al* 1990; Kawada *et al* 1995; Baici *et al.* 1995a; Aisa *et al* 1996) y Z-Ala-Arg-Arg 4MβNA como sustrato específico para la Catepsina B (McDonald y Ellis, 1975; Van Noorden *et al* 1987; Baici *et al* 1988; Baici *et al.* 1995b; Shuja y Murnane, 1996) como se describe en *Materiales y Métodos*.

Todas las muestras de cartílago fueron cuidadosamente examinadas en microscopio de luz. La notable peculiaridad de los especímenes de cartílagos co-cultivados con tejido sinovial, fue una gran disminución de PG (figura 3.13 a) en áreas que fueron teñidas positivamente por la actividad enzimática de la catepsina B (figura 3.13b).

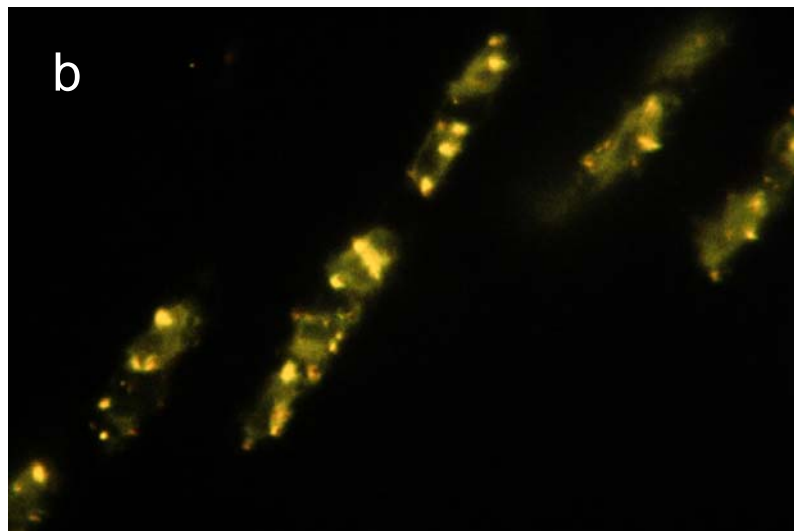
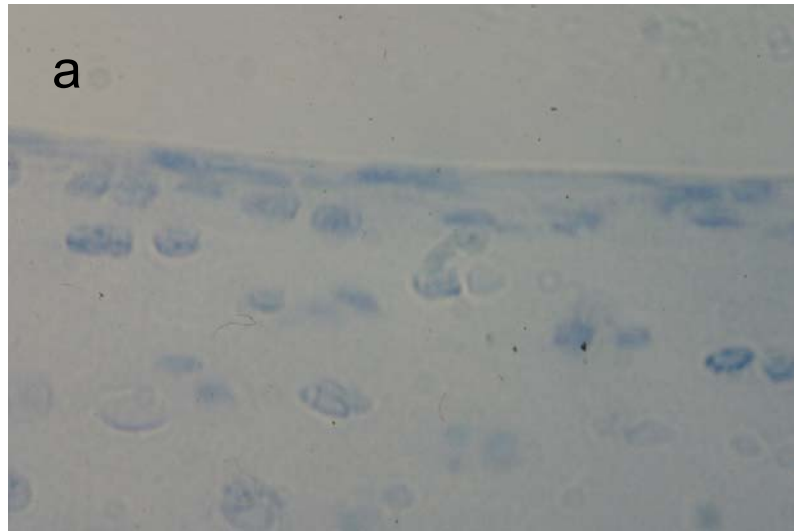


Figura 3. 13 Actividad de la catepsina B en cartílago articular normal de equino co cultivado con tejido sinovial por 48 h.

(a) Cartílago articular el cual muestra pérdida de metacromasia en la matriz extracelular.

(b) Cartílago articular incubado por 30 min con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4MβNA y 5- nitrosalicilaldehído.

La figura 3.13b muestra una fuerte actividad intracelular de la catepsina B, las partículas lisosomales amarillo fluorescente se hicieron visibles después de 30 min. de incubación, durante este periodo no hubo indicación de actividad enzimática extracelular. Fue interesante observar que la adición de sulfato de cobre (0.01mM) al co-cultivo redujo considerablemente no solo la degradación de PG (figura 3.14 a), sino también la actividad de la Catepsina B (figura 3.14b). La actividad de esta enzima no fue solo en los condrocitos de la zona profunda del cartílago articular, también se extendió a través de la zona media a la superficie articular, en donde también se detectaron niveles altos. La figura 3.15a, b y c muestra la variación de los niveles de actividad enzimática de la Catepsina B dentro de los diferentes especímenes de cartílago (control, co-cultivo y co cultivo + Cu) en la zona media. Los diferentes niveles de actividad de la Catepsina B observados con los diferentes especímenes en la zona articular y media asemejan lo observado en la zona profunda. Estos hallazgos indican una falta de heterogeneidad en la actividad de la catepsina B en especímenes co-cultivados en la presencia de cobre (0.01 mM). No hubo presencia de actividad positiva hacia la Catepsina B en los especímenes control (figura 3.16b).

Fue notable que las partículas fluorescentes se observaron en la matriz extracelular después de 45 min. de incubación. Las partículas de color amarillo brillante fluorescente indican los sitios de actividad de la Catepsina B a nivel intracelular y extracelular

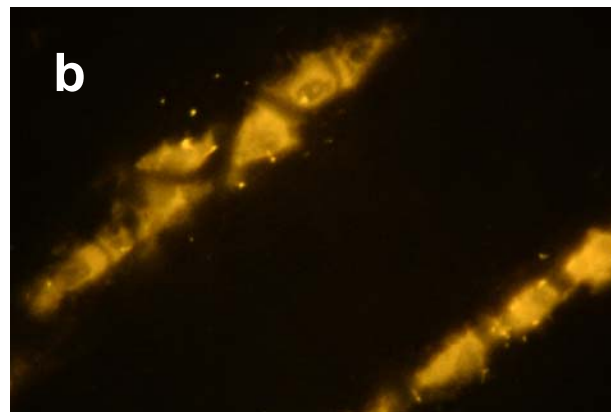
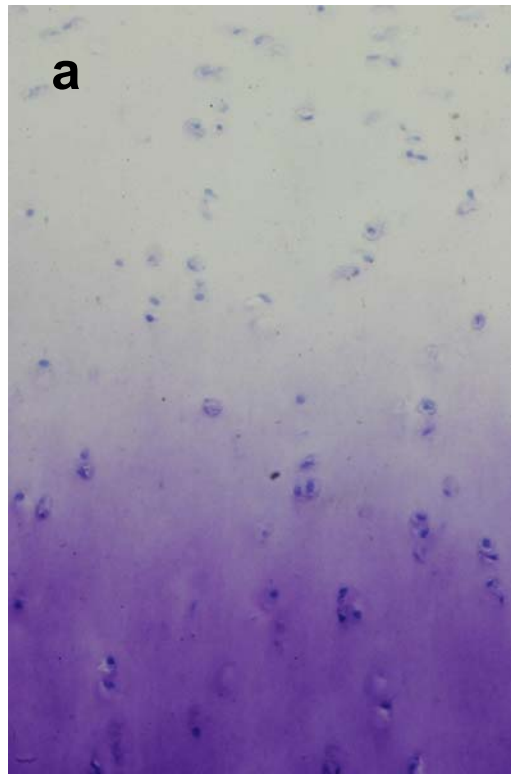


Figura 3.14 Actividad de la catepsina B en cartílago articular normal de equino co cultivado con tejido sinovial y sulfato de cobre (0.01m M) por 48 h.

(a) Cartílago articular el cual muestra la acción inversa del cobre sobre la pérdida de metacromasia en la matriz extracelular.

(b) Cartílago articular incubado por 30 min con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4MBNA y 5- nitrosalicilaldehído.

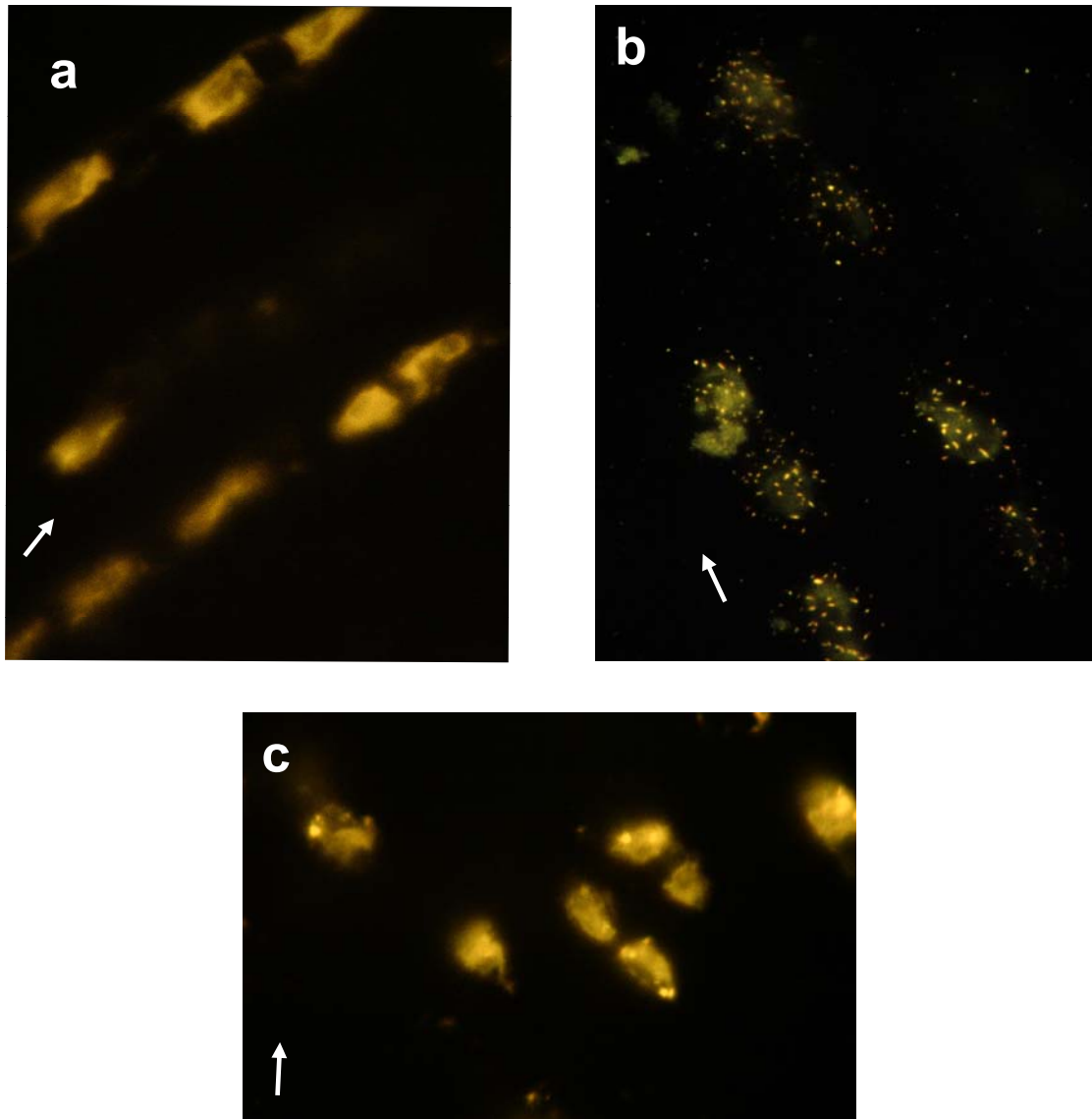


Figura 3.15 Actividad de la catepsina B en la zona media del cartílago articular incubado por 30 min con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4MBNA y 5-nitrosalicilaldehido

(a) Control cartílago articular cultivado solo por 48h.

(b) Co-cultivo con tejido sinovial por 48h.

(c) Co-cultivo con tejido sinovial y sulfato de cobre (0.01mM) por 48 h. Las flechas indican la dirección de la zona articular.

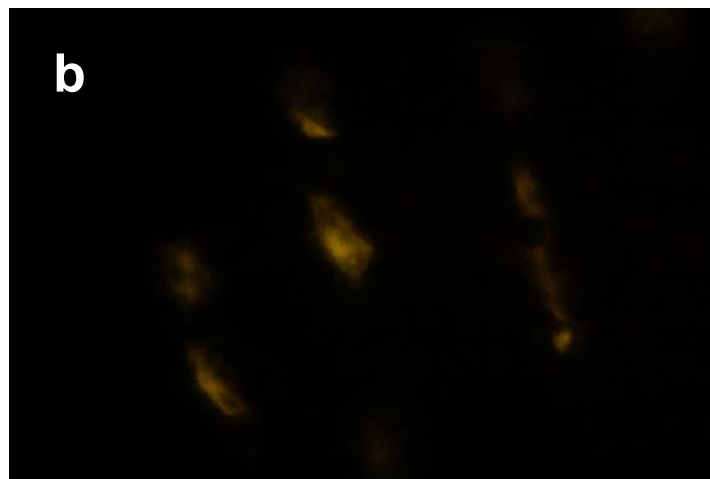
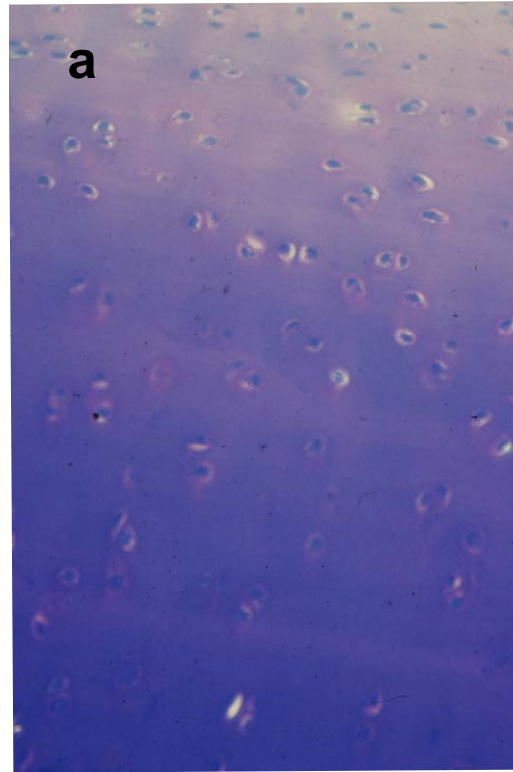


Figura 3. 16 Actividad de la catepsina B en cartílago articular normal equino cultivado por 48 h sin tejido sinovial (control).
(a) Cartílago articular el cual muestra una tinción metacromática normal de la matriz extracelular.
(b) Cartílago articular incubado por 30 min con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4M β NA y 5- nitrosalicilaldehído.

(Figura 3.17 a). La actividad enzimática extracelular fue una característica regular en todas las muestras que fueron co-cultivadas solo con tejido sinovial y en la presencia de sulfato de zinc (0.01mM).

No se observó actividad extracelular ni en las muestras tratadas con cobre ni en los controles. Los cambios en la actividad extracelular fueron monitoreados hasta por 4 horas en todos los especímenes para reducir la posibilidad de una actividad dependiente del tiempo. Se observó cristalización (Van Noorden *et al* 1987) de las partículas fluorescentes en secciones incubadas por más de 60 min. Las muestras co-cultivadas con tejido sinovial fueron incubadas en la presencia de solución inhibidora conteniendo E-64, inhibidor específico para la Catepsina B y usadas como controles (figura 3.17b).

El sulfato de zinc (0.01mM) fue incapaz de revertir el efecto de degradación de PG del tejido sinovial y no influyó en la actividad enzimática de la Catepsina B. (tabla 3.6).

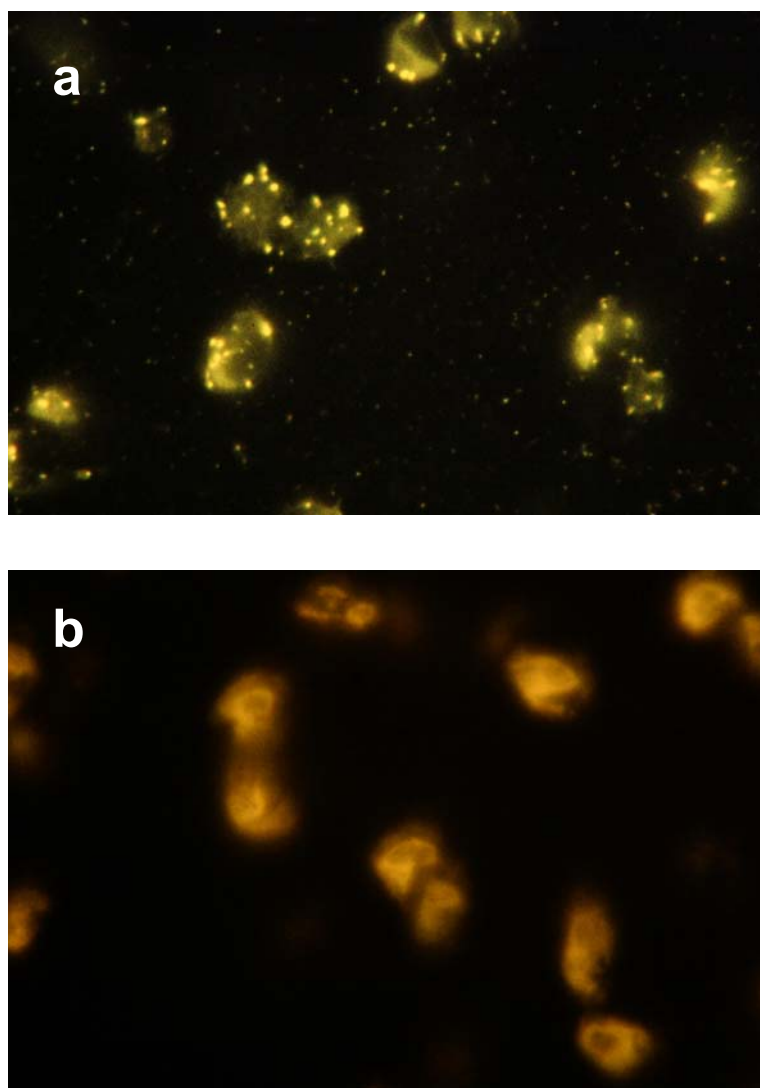


Figura 3.17 Actividad extracelular de la catepsina B en cartílago articular normal equino co-cultivado con tejido sinovial y E-64.

(a) Cartílago articular incubado con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4MBNA y 5- nitrosalicilaldehído por 45min.

(b) Cartílago articular incubado con el medio para detectar la actividad enzimática con Z-Ala-Arg-Arg-4MBNA y 5- nitrosalicilaldehído y solución inhibidora E-64 por 4h.

C A T E P S I N A B				
Zonas cartilago	Control Cartilago solo	Co-cultivo Tejido sinovial	Co-cultivo + Cu (0.01mM)	Co-cultivo + Zn (0.01mM)
Actividad Zona-Art	-	+++++	+	+++++
Actividad Zona-Med.	-	+++++	+	+++++
Actividad Zona-Prof	-	+++++	+	+++++
Actividad Matriz extracelular(> 45min)	No	Si	No	Si

Rango de edad de 12 a 15 meses.

Tabla 3.6
Efectos del tejido sinovial, cobre y zinc en la actividad de la catepsina B en el cartilago articular equino.
- =0% no actividad; +/- =<10%, actividad débil; + =10-30%, actividad débil; ++ = 40-50%, actividad moderada; +++ =50-70%, actividad fuerte; ++++ =70-90%, actividad fuerte; +++++ =>90% actividad fuerte.

3.5 Resumen

Los resultados y datos presentados aquí se resumen de la siguiente forma:

- (i) Se observó que la sobre regulación de los niveles intracelulares, actividad y liberación extracelular de la Catepsina B es una característica de la modulación fenotípica y de los condrocitos aislados.
- (ii) Los niveles intracelulares elevados de la Catepsina B fueron asociados con cambios en las zonas del cartílago particularmente en cartílago articular discondroplásico.
- (iii) La expresión celular *in vitro*, la secreción y actividad de la Catepsina B aumentó en respuesta a la acción degradante del tejido sinovial, sobre los PG.
- (iv) La acción degradante del tejido sinovial sobre los PG *in vitro* y la prueba de impacto inducen a niveles elevados de liberación tanto a nivel intracelular como extracelular de la Catepsina B.
- (v) El cobre pero no el zinc, disminuye parcialmente la acción degradativa del tejido sinovial sobre los PG y reduce la expresión de las Catepsinas B así como su actividad enzimática *in vitro*.

DISCUSIÓN

4

En este estudio, mediante experimentos inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos se demostró que los condrocitos primeramente aislados de cartílago normal y discondroplásico del caballo presentan una interesante distribución de la expresión enzimática de la catepsina B.

Los niveles de expresión de la catepsina B en condrocitos primeramente aislados difieren a los niveles de la catepsina D reportados por Hernández Vidal *et al.* (1997 a) lo que sugiere que la importancia de estas enzimas en la fisiología del cartílago articular es diferente. Cultivos primarios de condrocitos aislados del caballo presentaron en los lisosomas la catepsina B, pero solo en un bajo porcentaje de las células. Este resultado muestra nuevamente la reconocida heterogeneidad de la población celular del cartílago articular (Aydelotte y Kuettner, 1988), y es consistente con observaciones previas de la diferencia significativa entre los niveles enzimáticos de la catepsina B expresados por los condrocitos en las diferentes zonas del cartílago articular normal del caballo (Hernández Vidal *et al.* 1996). Se puede especular que los condrocitos en cultivo de mono capa celular que expresaron mayor cantidad de catepsina B fueron aquellos de la zona profunda.

En esta investigación se observó que el cartílago articular normal de caballos jóvenes no expresaron catepsina B pero las muestras provenientes de caballos adultos expresaron cantidades considerables de esta enzima principalmente en la zona profunda del cartílago articular. Esto sugiere una correlación proporcional entre la expresión de la enzima y la edad en caballos sanos.

En el proceso de osificación endocondral, que consiste en el reemplazo del cartílago por hueso, es cierto que una variedad de enzimas están involucradas tanto en la degradación extracelular e intracelular de PG y colágeno de la matriz. Se cree que los PG inhiben la mineralización (Chen y Boskey, 1985), por lo que su eliminación por degradación proteolítica constituye un paso esencial en el proceso de osificación endocondral. De igual forma la eliminación enzimática del colágeno de tipo X, el cual es sintetizado únicamente en la zona hipertrófica, parece ser necesario en el proceso de osificación endocondral (Sires *et al.* 1995). Es lógico especular que estas enzimas, las cuales abundan en la zona profunda del cartílago articular, juegan un papel aun indefinido en este proceso degradativo.

Los niveles de expresión lisosomal de la catepsina B en condrocitos primeramente aislados de caballos normales fueron bajos, sin embargo después de algunos días en cultivo de mono capa celular las células comenzaron a expresar detectables cantidades intracelularmente de catepsina B la cual fue mas aparente después de la modulación fenotípica por subcultivo.

Con la progresión del tiempo del subcultivo celular, aumentó en número la cantidad de inmunoreactividad de la catepsina B en la célula y más células fueron inmunopositivas.

Después del segundo día en cultivo de mono capa celular, los condrocitos mostraron la enzima lisosomal catepsina B. Los pocos condrocitos positivos a catepsina B observados durante el primer cultivo de mono capa celular, demostraron claramente que la población celular de estudio fue heterogénea. Estos resultados concuerdan con los de Bayliss y Ali (1978) y Hernández Vidal *et al* (1996) donde la catepsina B demostró una variación zonal en el cartílago articular. La observación de que la expresión de la catepsina B fue mayor en la zona profunda que en la zona articular y media es un factor importante a considerar en la evaluación zonal de la distribución enzimática bajo condiciones patológicas y normales.

Una vez demostrada la localización de la catepsina B en condrocitos del caballo *in vivo* e *in vitro* bajo condiciones normales, se decidió investigar los niveles de la expresión enzimática en el cartílago discondroplásico. Este estudio reporta que los niveles de la catepsina B aumentan en el cartílago articular de caballos con discondroplasia. Los niveles de esta enzima incrementaron en las colonias de condrocitos presentes en la zona profunda de los caballos con discondroplasia. Aunque estas colonias celulares con altos niveles de catepsina B están asociadas predominantemente con áreas anormales de la zona profunda, también fueron observadas en la zona media y articular del cartílago.

Actualmente se desconoce la importancia de los altos niveles de catepsina B en los grupos celulares presentes en el cartílago discondroplásico. Siendo que la formación de colonias o grupos celulares en el cartílago necrótico con depleción celular es característica de las lesiones de discondroplasia en el caballo (Savage *et al.* 1993), por lo que no es irrazonable sugerir que la presencia de la catepsina B en estas estructuras tenga alguna importancia patológica.

Baici *et al.* (1995 a; b) reportaron altos niveles de catepsina B en colonias celulares en osteoartritis en humanos y sugieren un papel importante en la regeneración del cartílago. Los mecanismos por los cuales la catepsina B ejerce una acción enzimática en el cartílago se desconocen. Se sabe mediante estudios *in vitro* que la catepsina B tiene la capacidad de degradar la mayoría de componentes de la matriz extracelular incluyendo los PG (Nguyen *et al.*1990) y los colágenos tipo II, IX, X y XI (Maciewicz *et al.*1991; Sires *et al.*1995).

Aunque tiene la capacidad de degradar los proteoglicanos, es poco probable que la catepsina B sea directamente responsable por los bajos niveles de este componente de la matriz extracelular, como se observó por la reducción de la tinción metacromática frecuente en la matriz adyacente a las colonias celulares discondroplásicas. No hubo evidencia de liberación extracelular de la catepsina B en la matriz que rodea a los grupos celulares en las muestras de cartílago donde la enfermedad no fue inducida. La reducción de PG por la acción de otras enzimas degradativas tales como las serina, metaloproteinasas y agrecanasa (Henderson y Blake, 1994; Buttle *et al.* 1995) no debe de ser excluida.

En el cartílago discondroplásico la enzima se detecto intracelularmente, específicamente en los gránulos lisosomales donde se cree que tiene una función importante (Kominami *et al.* 1991). Se cree que es responsable de la fase final de la proteólisis intralisosomal de los elementos de la matriz extracelular (Everts *et al.*1994; Sires *et al.*1995).

La degradación de algunos elementos de la matriz extracelular tales como el colágeno de tipo X puede ser debido a la actividad anormal de la catepsina B la cual lleva a una falla en el proceso de osificación endocondral y aun debilitamiento de la placa de crecimiento, dos de las características que definen a la discondroplasia.

La identificación inmunofluorescente de la catepsina B fue reportada por primera vez por Sylvén y Snellman en 1974 y su actividad enzimática por Van Noorden *et al.* (1987). Una adecuada fijación es importante para una localización inmunohistoquímica y citoquímica de la actividad enzimática de la catepsina B como lo demostró Graf y Sträuli (1983).

El hecho de que la actividad enzimática de la catepsina B no fue detectada en el cartílago normal del caballo pero fue inmunolocalizada pudo haber sido debido a diversos factores: (i) A que no se encontraba activa debido a que el pH lisosomal no era el óptimo, ya que la catepsina B es inactivada a un pH neutro a alcalino (Barrett y Kirschke 1981). (ii) El anticuerpo solo reconocía la catepsina B inactiva. (iii) La actividad pudo ser enmascarada por la presencia de inhibidores naturales como la cistatinas de las cuales la cistatina C es la más importante fisiológicamente (Barrett *et al.* 1986; Abrahamson *et al.* 1986). Se identificó la actividad enzimática en condrocitos modulados fenotípicamente y en condrocitos discondroplásicos así como en el cartílago cultivado con tejido sinovial.

Los condrocitos del cartílago discondroplásico presentan características morfológicas y bioquímicas similares a aquellas observadas en los condrocitos normales modulados

fenotípicamente. Dentro de las características similares destacan el mayor tamaño de las células y el aumento de expresión y secreción de la actividad de la catepsina B.

En este estudio, se demostró que co-cultivos de cartílago articular con tejido sinovial es un modelo *in vitro* útil para investigar los efectos del cobre y del zinc en los cambios de PG de la matriz extracelular en el proceso inflamatorio inducido por citocinas. Se observó que el cobre protege el cartílago disminuyendo la degradación de los PG por el tejido sinovial.

Se sabe que el tejido sinovial normal promueve la pérdida de PG en el cartílago (Fell y Jubb, 1977) y secreta citocinas inflamatorias tales como la interleucina 1 (IL-1) (Fell y Jubb, 1977; Davies *et al.* 1991) la cual es una de los mediadores sinoviales indirectamente responsable de esta actividad degradativa (Saklatvala *et al.* 1984; Shingu *et al.* 1995).

Estudios *in vitro* han demostrado que la IL-1 induce una falla del cartílago mediante la estimulación por los sinoviocitos y condrocitos de enzimas degradativas de la matriz extracelular (Pratta *et al.* 1989; Nguyen *et al.* 1989; Malfait *et al.* 1994.) inhibiendo la síntesis de PG (Tyler, 1985 b; Bayliss *et al.* 1991) y alterando la composición molecular de PG (Platt y Bayliss, 1994).

Scuderi (1990) demostró que el cobre tiene la capacidad de inhibir la liberación de IL-1, por lo que se puede especular que el cobre protege el cartílago del daño inducido por la sinovia. La inhibición de IL-1 explica la observación de la habilidad del cobre de reducir la expresión de la enzima degradativa catepsina B.

Una correlación proporcional entre la degradación de PG y la actividad proteolítica de la catepsina B en el cartílago articular del caballo fue observado mediante el estudio de co-cultivo. Estudios inmunohistoquímicos mostraron la actividad de la catepsina B tanto intracelular como extracelularmente en cartílago co-cultivado con tejido sinovial, sugiriendo que los condrocitos bajo condiciones normales no liberan esta enzima implicando al tejido sinovial probablemente como el responsable por la degradación de PG y la actividad de la catepsina B inducida por los condrocitos *in vitro*. La sinovia es una importante fuente de IL-1 (Fell y Jubb, 1977; Davies *et al.* 1991) por lo que se asume que los condrocitos cultivados con sinovia están expuestos a una elevada concentración de citocinas, responsables de la elevada actividad enzimática de la catepsina B expresada por los condrocitos.

Se determinó histológicamente que la distribución zonal de la actividad de la catepsina B corresponde con la degradación del tejido articular co-cultivado. La adición de sulfato de cobre (0,01 mM) al cultivo resultó en una importante disminución no tan solo de la actividad intracelular sino también de la liberación extracelular de la enzima. Estos resultados ofrecen una posible explicación para la acción anti-artrítica del cobre, y pueden ser importantes para el tratamiento de enfermedades degenerativas tales como la osteoartritis.

Anormalidades tales como claudicaciones, deformidad angular del miembro, fragilidad ósea, engrosamiento y erosión del cartílago han sido relacionadas con la deficiencia del cobre en potrillos en desarrollo (Cupps y Howell 1949). Egan y Murrin (1973) y Carberry

(1978), establecieron una relación entre el cobre y la presencia de las enfermedades de desarrollo ortopédico (DOD) y Bridges y Harris (1988) reportaron la relación de la deficiencia del cobre con la displasia fiseal y la osteocondrosis. Hurtig *et al.* (1990; 1993) establecieron que en potros con osteocondrosis, la deficiencia del cobre ocasionaba una disrupción de las fibras del colágeno causando una debilidad biomecánica y micro fracturas en el hueso metafiseal y subcondral. Aunque estos estudios ofrecen convincente explicación de las lesiones esqueléticas producidas por la deficiencia del cobre, no proveen información alguna de los efectos directos del cobre en los componentes de la matriz extracelular.

Los resultados indican que la catepsina B tiene un papel patofisiológico en el metabolismo de la matriz extracelular del cartílago del caballo. Sin embargo, su mecanismo en la discondroplasia/osteocondrosis cuya etiología es multifactorial esta lejos de ser entendido. La actividad física (presión mecánica) ha sido implicada como un factor etiológico importante (Poole, 1993), por lo que se investigó los efectos del estímulo mecánico en la expresión de esta enzima.

La función principal del cartílago articular es la de proveer una superficie de soporte a la articulación. La capacidad del cartílago de soportar la presión mecánica depende de la composición y buen funcionamiento de la matriz extracelular (Inerot *et al.* 1978). Muchos de los fenómenos físicos que ocurren en el cartílago durante la presión mecánica han sido identificados y cuantificados: la compresión del cartílago articular produce una deformidad de las células y de la matriz extracelular, gradientes de presión hidrostática, flujo de líquido

y cambios fisicoquímicos incluyendo alteraciones del contenido de agua de la matriz extracelular, fijación cargas de densidad, movimiento de concentración de iones y cambios en la presión osmótica (Grodzinsky, 1983; Urban y Hall, 1992; Urban *et al.* 1993). Cualquiera de estos fenómenos mecánicos, físicos o eléctricos puede modular el metabolismo de la matriz extracelular y alterar el comportamiento de los condrocitos.

Se han realizado estudios para investigar los efectos de los mecanismos de presión en la matriz extracelular (Caterson y Lowther, 1978; Buschmann *et al.*1996) y en la morfología de los condrocitos (Guilak *et al.* 1995). Sin embargo se sabe muy poco de cómo las células perciben a la presión mecánica y que cambios ocurren en respuesta a dichos mecanismos de presión. Parte de este estudio se enfocó en investigar los cambios en la expresión de la catepsina B en muestras de cartílago articular sometidas a pruebas de impacto.

El evidente efecto de las pruebas de impacto sobre el cartílago fue un aumento en la expresión de la catepsina B en la superficie articular. Sin embargo, bajos niveles de la enzima fueron observados en la zona media y profunda. Esta variación en la expresión de la enzima en las diferentes zonas del cartílago pudo ser debido a la resistencia de expansión del tejido por la organización alineada de las fibras de colágeno (Aspden y Hukins 1981).

En algunos casos los efectos de los mecanismos de presión producen cambios de masa (Jeffrey *et al.* 1995) y alteraciones en el medio iónico / osmótico del condrocito, incluyendo cambios en el pH extracelular (Wilkins y Hall, 1995) los cuales son factores importantes para la expresión de esta enzima.

El incremento constante de la expresión intracelular de la catepsina B sugiere que ocurren cambios con el tiempo durante el cultivo, probablemente debido a la ausencia del estímulo mecánico el cual es necesario para el mantenimiento y regulación de la matriz extracelular (Gray *et al.* 1986; 1987), variaciones del pH intracelular y extracelular, alteraciones en el medio iónico / osmótica, y aumento de masa. Interesantes resultados se observaron cuando se incremento la altura de la masa en las pruebas de impacto con la finalidad de aumentar la expresión de la enzima, sin embargo se obtuvo una disminución de la expresión de la catepsina B en todas las zonas del cartílago articular.

Diferencias significativas se observaron en el numero de condrocitos entre las muestras sometidas a pruebas de impacto y los control. El impacto alto reduce el numero de condrocitos mientras en el impacto bajo no se observaron alteraciones en el numero de los mismos debido a que el daño tisular fue mínimo.

Otros investigadores han establecido que el factor biomecánico es necesario para el mantenimiento fisiológico del cartílago (Mankin *et al.* 1971; Roy, 1970). Excesos en las actividades tales como aumento de presión o inmovilización de la articulación eventualmente producen una degeneración del cartílago.

Esta enzima tiene un efecto regulador en el comportamiento de los condrocitos y por lo tanto tienen un efecto importante en la matriz extracelular.

BIBLIOGRAFÍA

Abrahamson, M., Barret, A.J., Salvesen, G. and Grubb, A. (1986) Isolation of six cysteine proteinasa inhibitors from human urine. *J. Biol. Chem.* **261**, pp.11282-11289.

Aisa, M.C., Rahman, S., Senin, U., Maggio, D. and Russel, R. G.G. (1996) Cathepsin B activity in normal human osteoblast-like cells and human osteoblastic osteosarcoma cells (MG-63): regulation by interleukin-1 β and parathyroid hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* **1290**, pp. 29-36.

Akeson W.H., Woo S.L., Amiel D., Coutts R.D., and Daniel D. (1973) The connective tissue response to immobility: biochemical changes in periarticular connective tissue of the immobilized rabbit knee. *Clin. Orthop.* **93**, 356-362.

Akizuki, S., Mow, V.C., Muller, V.C. (1986) Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing and fibrillation on the tensile modulus. *Orthop. Res.* **4**, pp. 379-392.

Akizuki, S., Mow, V.C., Muller, F. (1987) Tensile properties of human knee joint cartilage: II. Correlations between weight bearing and tissue pathology and the kinetics of swelling. *J. Orthop. Res.* **5**, pp. 173-186.

Ali, S. Y. (1964) The degradation of cartilage matrix by an intracellular protease. *Biochem.J.* **93**, pp. 611-618.

Ali, S.Y. (1967) The presence of cathepsin B in cartilage. *Biochem. J.* **102**, pp. 10-11.

Ali, S.Y. and Bayliss, M.T. (1975) Enzymes involved in degradation of cartilage in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **34**, pp. 65-66.

Ali, S.Y. and Evans, L. (1973) Enzymic degradation of cartilage in osteoarthritis. *Fed. Proc.* **32**, pp. 1494-1498.

Aspden, R.M. and Hukins, D.W.L. (1981) Collagen organization in articular determined by x-ray diffraction, and its relationship to tissue function. *Proc. R. Soc. London.* **B212**, pp. 299-304.

Aydelotte, M.B. and Kuettner, K. E. (1988) Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Conn. Tiss. Res.* **18**, pp. 205-222.

Baici, A., Lang. A., Hörler. D. and Knöpfel, M. (1988) Cathepsin B as a marker of the dedifferentiated chondrocyte phenotype. *Ann. Rheum. Dis.* **47**, pp. 684-691.

Baici, A. Knöpfel, M. (1986) Cysreine proteinases produced by cultured rabbit V2 carcinoma cells and rabbit skin fibroblasts. *Int. J. Cancer.* **38**, pp. 753-761.

Baici, A. and Lang. A. (1990) Cathepsin B secretion by rabbit articular chondrocytes: modulation by cycloheximide and glycosaminoglycans. *Cell. Tiss. Res.* **259**, pp. 567-573.

Baici, A., Hörler. D., Lang. A., Merlin, C. and Kissling R. (1995a) Cathepsin B in osteoarthritis: zonal variation of enzyme activity in human femoral head cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **54**, pp. 281-288.

Baici, A. and Lang. A., Hörler. D., Kissling. R. and Merlin,C. (1995b) Cathepsin B in osteoarthritis : cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **54**, pp. 289-297.

Barret, A.J., Buttle, D.J., A. A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai, M. and Hanada, K. (1982) L-*trans* – Epoxysuccinyl-L-eucylamido-4 guanidino butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **201**, pp. 189-198.

Barret, A. J. and Kirschke, H. (1981) Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods. Enzymol.* 80, pp. 535-561.

Barret, A.J., Rawlings, N.D., Davies, M. E., machleidt, W., Salvesen, G. and Turk, V. (1986) In: *Proteinase Inhibitors*. Eds. Barret, A.J. and Salvesen, G. Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam. Pp. 515-569.

Bayliss, M.T. and Ali, S.Y. (1978) Studies on cathepsin B in human articular cartilage. *Biochem. J.* **171**, pp. 149-154.

Bayliss, M.T., Hickery, M.S. and Hardingham, T.E. (1991) Effects of IL-1 and TNF on human articular cartilage. Differences in biosynthetic and degradative responses. *Trans. Orth. Res. Soc.* **16**, pp. 147-148.

Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. (1993) Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Min Res*; **8**(2):5565-5570.

Bendtzen K., Petersen J., Halkjaer K.J., and Ingemann H.T. (1985) Interleukin-1-like activities in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis and traumatic synovitis. *Rheumatol.Int.* **5**, 79-82.

Benton H.P. and Tyler J.A. (1988) Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **154**, 421-428.

Berquin, I.M. and Sloane, B.F. (1996) Cathepsin B expression in human tumors. In: *Intracellular Protein Catabolism*. Eds: Suzuki, K. and Bond, J. Plenum Press, New York. Pp. 281-294.

Bjelle, A. (1975) Content and composition of glycosaminoglycans in human knee joint cartilage, variation with site and age in adults. *Conne. Tiss. Res.* **3**, pp. 141-147.

Boskey,A.L. (1981) Current concepts on the physiology and biochemistry of calcification. *Clin. Orthop.* **167**, pp. 225-257.

Bridges, C.H. and Harris, E.D. (1988) Experimentally induced cartilaginous fractures (osteochondritis dissecans) in foals fed low-copper diets. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **193**, pp. 215-221.

Bridges, C.H., Womack, J.E. and Harris, E.D. (1984) Considerations of copper metabolism in osteochondrosis of suckling foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **185**, pp. 173-178.

Bridges, C.H. and Moffit, P.G. (1990) Influence of variable content dietary zinc on copper metabolism of weanling foals. *Am. J. Vet. Res.* **51**, pp. 275-280.

Brighton C.T. (1978) Structure and function of the growth plate. *Clin. Orthop.* 22-23.

Brown,C., Hembry, R.M., and Reynolds, J.J. (1989) Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J. Bone Joint Surg.* **71**, 580-593.

Buckwalter, A.J., Rosenburg, L. and Tang, L. (1984) The effect of link protein on proteoglycan aggregate structure. *J. Biochem.* **259**, pp. 5361-5363.

Bullough, P. G., Yawitz, P.S. and Tafra, L. (1985) Topographical variations in the morphology and biochemistry of adult tibial plateau articular cartilage. *J. Orthop. Res.* **3**, pp.1.16.

Burnett, D., Abrahamson, M., Devalia, J., Davies, R.J. and Buttle, D.J. (1995). Synthesis and secretion of procathepsin B and cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro : modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, pp. 305-310.

Buttle , D.J., Bonner, B.C., Burnett, D. and Barret, A.J. (1988). A catalytically active high *Mr* form of human cathepsin B from sputum. *Biochem.J.* **254**, pp. 693-699.

Buttle, D.J. and Saklatvala, J. (1992) Lysosomal cysteine endopeptidases mediate interleukin 1-stimulated cartilage proteoglycan degradation. *Biochem. J.* **287**, pp. 657-661.

Buttle, D. J., Saklatvala, J., Tamai, M. and Barret, A.J. (1992) Inhibition of interleukin 1-stimulated cartilage proteoglycan degradation by lipophilic inactivator of cysteine endopeptidases. *Biochem. J.* **281**, pp. 175-177.

Buttle, D.J., Handley, C.J., Ilic, M., Saklatvala, J., Murata, M. and Barret, A.J. (1993) Inhibition of cartilage proteoglycan release by a specific inactivator of cathepsin B and inhibitor of matrix metalloproteinases: evidence for two converging pathways of chondrocyte-mediated proteoglycan degradation. *Arth. Rheum.* **36**, pp. 1709-1717.

Buttle, D.J., Bramwell, H. and Hollander, A.P. (1995) Proteolytic mechanisms of cartilage breakdown: a target for arthritis therapy. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* **48**, pp. M167-M177.

Campbell, I.K. and Roughley, P. J. (1986) The action of human articular cartilage metalloproteinase on proteoglycan and link protein. *Biochem. J.* **237**, pp. 117-122.

Carberry, J. T. (1978) Osteodysgebesis in a foal associated with copper deficiency. *N. Z. Vet. J.* **26**, pp. 279-280.

Carlson C. S., Hilley H. D., Henrikson C.K., and Meuten D. J. (1986) The ultrastructure of osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in growinf swine. *Calcif. Tissue Int.* **38**, 44-51.

Carlson C.S., Hilley H.D., and Meuten D. J. (1989) Degeneration of cartilage canal vessels associated with lesions of osteochondrosis in swine. *Vet. Pathol.* **26**, 47-54.

Caterson, B. and Lowther, D.A. (1978) Changes in the metabolism of the proteoglycans from sheep articular cartilage in response to mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **540**, pp. 412-422.

Centiella M, McCarthy TL, Canalis E. (1991) Growth factors and cytokines. *In* Hall BK (ed): Bone, vol 4, Bone Metabolism and Mineralization, Boca Raton, *CRC Press*, pp 47-72.

Chan, S.J., San Segundo, B., McCormick, M.B. and Steiner, D.F. (1986) Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse osteopontin B cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, pp. 7721-7725.

Chen, C.C. and Boskey, A.L. (1985) Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif. Tiss. Int.* **39**, pp. 324-329.

Chen Q., Gibney E.P., Leach R.M., and Linsenmayer T. F. (1993) Chicken tibial dyschondroplasia: a limb mutant with two growth plates and possible defects of collagen crosslinking. *Dev. Dyn.* **196**, 54-61.

Cole DE, Hanley DA: Osteocalcin. (1991) *In* Hall BK (ed); Bone, vol 3, Bone Matrix and Bone Specific Products, Boca Raton, *CRC Press*, pp 239-294.

Codorean, E., Buzilă, L. and Gabrielescu, E. (1981) Immunocytochemical investigation of cathepsin B in the rheumatoid synovial membrane and fluid. *Rev. Roum. Biochim.* **18**, pp. 241-247.

Cornwell, M.W. (1984) Biomechanics of non contractile tissue. *Physical Therapy* **64**, 1869-1873.

Cupps, P.T. and Howell, C.E. (1949) The effects of feeding supplemented copper to growing foals. *J. Anim. Sci.* **8**, pp. 286-288.

Cymbaluk, N.F. and Smart, M.E. (1993) A review of possible metabolic relationships of copper to equine bone disease. *Equine Vet. J.* **16**, pp. 19-26.

Davies, M.E., Horner, A. and Dingle, J.T. (1991) Immunorecognition of chondrocytes in articular cartilage activated by synovial interleukin 1. *Conn. Tiss. Res.* **25**, pp. 243-249.

Dayer J.M., de R.B., Burrus B., Demczuk S., and Dinarello C.A. (1986) Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J. Clin. Invest.* **77**, 645-648.

Dean, D.D. (1991) Proteinase-mediated cartilage degradation in osteoarthritis. *Sem. Arthritis Rheum. Suppl.* **20**, 2-11.

Descalzi Cancedda, F., Gentili, G., Manduca, P. and Cancedda, R. (1992) Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J. Cell. Biol.* **117**, pp. 87-95.

Dik, K.J., Enzerink, E., y van Weeren, P.R. (1999) Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine vet. J. Suppl.* **31**, 9-15.

Dodge G.R. and Poole A. R. (1989) Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J. Clin. Invest.* **83**, 647-661.

Dolbeare, F.A. and Smith, R.E. (1977) Flow cytometric measurement of peptidases with use of 5-nitrosalicylaldehyde and 4-methoxy- β naphthylamine derivatives. *Clin. Chem.* **23**, pp. 1485-1491.

Dolbeare, F.A. and Vanderlaan, M. (1979) A fluorescent assay of proteinases in cultured mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, pp. 1493-1495.

Eckhout, Y. and Vaes, G. (1977) Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase: Effects of lysosomal cathepsin-B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem. J.* **166**, pp. 61-62.

Egan, D. A and Murrin, M.P. (1973) Copper-responsive osteodysgenesis in a Thoroughbred foal. *Ir. Vet. J.* **27**, pp. 61-62.

Ehrlich, M., Mankin, H.J., Jones, H., Wright, R., Crispen, C., and Vigliani, G. (1977) Collagenase and collagenase inhibitors in osteoarthritic and normal human cartilage. *J. Clin. Invest.* **59**, 226-233.

Ekman S., Rodriguez M. H., and Ploen L. (1990) Morphology of normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage. A study in the domestic pig and minipig of wild hog ancestry. *Acta Anat. Basel.* **139**, 239-253.

Ekman S. and Ridderstrale Y. (1992) Carbonic anhydrase localization in normal and osteochondrotic joint cartilage of growing pigs. *Vet. Pathol.* **29**, 308-315.

Esquisatto M.A., Pimentel E.R., and Gomes L. (1997) Extracellular matrix composition of different regions of the knee joint cartilage in cattle. *Anat. Anz.* **179**, 433-437.

Everts, V., Korper, W., Niehof, A., Jansen, I. and Beertsen, W. (1994) Type VI collagen is phagocytosed by fibroblasts and digested in the lysosomal apparatus: involvement of collagenase, serine proteinases and lysosomal enzymes. *Matrix Biol.* **14**, pp. 665-676.

Eyre DR, Wu JJ, Woods PE, et al. (1991) The cartilage collagens and joint degeneration. *Br J Rheumatol*; **30** (1):10-15.

Eyre, D.R., Wu, J., and Woods, P.E. (1991a) The cartilage collagens: structural and metabolic studies. *J. Rheumatol. Suppl.* **27**, 49-51.

Farquharson C., Whitehead C., Rennie S., Thorp B., and Loveridge N. (1992) Cell proliferation and enzyme activities associated with the development of avian tibial dyschondroplasia: an in situ biochemical study. *Bone.* **13**, 59-67.

Farnum C. E., Wilsman N. J. and Hilley H.D. (1984) An ultrastructural analysis of osteochondritic growth plate cartilage in growing swine. *Vet. Pathol.* **26**, 47-54.

Fell H. B. and Jubb R.W. (1977) The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture. *Arthritis Rheum.* **20**, 1359-1371.

Felleisen, R. y Klinkert, M.O. (1990). *In vitro* translation and processing of cathepsin B of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.*, **9**, pp. 371-377.

Fife, R.S. and Brandt, K.D. (1993) Extracellular matrix of cartilage: Glycoproteins. IN: Joint cartilage degradation: basic and clinical aspects. Eds: J.F. Woessner and D. R. Howel. Marcel Dekker. New York. pp 139-158.

Fisher LW, Hawkins G, Tuross N, et al. (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteína I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem*; **262**: 9702-9708

Firth, E.C. y Greydanus, Y. (1987) Cartilage thickness measurements in foals. *Res. Vet. Sci.* **42**, 35-46.

Franchimont, P. and Bassleer, C. (1991) Effects of hormone and local growth factors on articular chondrocyte metabolism. *J. Rheumatol. Suppl.* **27**, pp. 68-70.

Franzen, A., Bjornsson, S., and Heingard, D. (1981) Cartilage proteoglycan aggregate formation. Role of link protein. *Biochem. J.* **197**, 669-674.

Frohlich, E., Schumburg-Lever, G. and Klessen, C. (1995) Immunocytochemical and immunoelectron microscopic demonstration of cathepsin B in human malignant melanoma. *British. J. Dermatol.* **132**, pp. 867-875.

Gabrijelcic, D., Annan-Prah, A., Rodic, B., Rozman, B., Cotic, V. and Turk, V. (1990) Determination of cathepsin B and H in sera and synovial fluids of patients with different joint diseases. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **28**, pp. 149-153.

Gal, S., Willingham, M. C., y Gottesman, M.M. (1985). Processing and lysosomal localization of a glycoprotein whose secretion is transformation stimulated. *J. Cell. Biol.* **100**, pp. 535-544

Galotto, M., Campanile, G., Robino, G., Descalzi Cancedda, F., Bianco, P. and Cancedda, R. (1994) Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and

participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J. Bone Miner. Res.* **9**, pp. 1239-1249.

Gamble, J.G. (1988) The musculoskeletal system. Physiological basics. *Raven Press*. New York, pp 100-115.

Gardner, S.L., McGillivray, D.C. (1971) Living articular cartilage is not smooth. The structure of mammalian and avian joint surfaces demonstrated in vivo by immersion incident light microscopy. *Ann. Rheum. Dis.* **30**, pp. 3.

Gentili, C., Bianco, P., Neri, M., Malpeli, M., Campanile, G., Castagnola, P., Cancedda, R. and Descalzi Cancedda, F. (1993) Cell proliferation, extracellular matrix mineralization, and ovotransferrin transient expression during in Vitro differentiation of chick hypertrophic chondrocytes into osteoblast-like cells. *J. Cell. Biol.* **122**, pp. 703-712.

Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A and von Figura, K. (1983). Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **97**, pp. 1-5.

Glade, M.J. y Belling, T.H. (1986) A dietary etiology for osteochondrotic cartilage. *J. Equine Vet. Sci.* **6**, 151-155.

Ghosh, P., Andrews, J.L., Osborne, R.A., Lesjak, M.S. (1986) Variation with aging and degeneration of the serine and cysteine protease inhibitors of human articular cartilage. *Agents Actions.* **18**, pp. 69-81.

Goto, T., Tsukuba. T., Ayasaka, N., yamamoto, K. y tanaka, T. (1992) Immunocytochemical localization of cathepsin D in the rat Osteoclast. *Histochem.* **97**, pp. 13-18.

Graf, M., Leemann, U., Ruch, F. and Sträuli, P. (1979) The fluorescence and bright field microscopic demonstration of cathepsin B in human fibroblasts. *Histochem.* **64**, pp. 319-322.

Graf, M.F. and Sträuli, P. (1983) Use of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method for the localization of rabbit cathepsin B in cells and tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, pp. 803-810.

Gray M.L., Pizzanelli A.M., Grodzinsky A.J., and Lee R.C. (1988) Mechanical and Physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J.Orthop.Res.* **6**, 777-792.

Gray, M.L., Frank, E.H., Grodzinsky, A.J. and Lee, R.C. (1986) Mechanical forces modulate the biosynthetic response of bovine articular and epiphyseal cartilage, in *Proceedings. Trans. Orthop. Res. Soc.* **11**, pp. 449.

Gray, M.L., Pizzanelli, A. M. and Lee, R.C. (1987) The kinetics of chondrocyte biosynthetic response to compressive loads, in *Proceedings. Trans. Orthop. Res. Soc.* **12**, pp. 135.

Greenwald, R.A. and Moak, S.A. (1986) Degradation of hyaluronic acid by polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation.* **10**, pp. 15-30.

Grodzinsky, A.J. (1983) Electromechanical and physicochemical properties of connective tissue. *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* **9**, pp. 133-199.

Guenther H.L., Guenther H.E., Froesch E.R., and Fleisch H. (1982) Effect of insulin-like growth factor on collagen and glycosaminoglycan synthesis by rabbit articular chondrocytes in culture. *Experientia* **38**, 979-981.

Guylak, F., Ratcliffe, A. and Mow, V.C. (1995) Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: A confocal microscopy study. *J. Orthop. Res.* **13**, pp. 410-421.

Hall BK. (1990) Bone, vol 1, The Osteoblast and the Osteocyte. West Caldwell, NJ, *The Telford Press*.

Hanewinkel, H., Glössl, J. y Kresse, H. (1987). Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **262**, pp. 12351-12355.

Hardingham, T.E. and Muir, H. (1972) The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Byochim. Biophys. Acta.* **279**, 401-405.

Hardingham, T.E. (1979) The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochem. J.* **177**, pp. 237-247.

Hardingham, T. and Bayliss, M. (1990) Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Sem. Arthr. Rheum. Suppl.* **20**, 12-33.

Hasilik, A. and von Figura, K. (1984) In: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Vol. 7, Eds: Dingel, J.T., Dean, R.T., and Sly, W. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam. Pp. 3-16.

Hauschka, P.V., Maurokas, A.E. and Lafnati, M.D. (1986) Growth factors in bone matrix: Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin sepharose. *J. Biol. Chem.* **261**, pp. 12, 665-12, 674.

Henderson, B. and Pettipher, E.R. (1985) The synovial lining cell: *Biology and pathobiology. Semin. Arthritis Rheum.* **15**, 1-32.

Henderson, B., and Blake, S. (1994) Connective tissue destruction in rheumatoid arthritis: therapeutic potential of selective metalloproteinase inhibitors. In: Immunopharmacology of Joints and Connective Tissue. Eds: Davies, M.E. and Dingle, J.T. *Academic Press, London.* pp. 199-223.

Henson F. M., Davies M. E., and Jeffcott L. B. (1997) Equine dyschondroplasia (osteocondrosis)-histological findings and type VI collagen localization. *Vet. J.* **154**, 53-62.

Hernández-Vidal, G., Jeffcott, L.B. y Davies, M.E. (1996) Immunolocalization of Cathepsin B in equine dyschondroplastic cartilage. *Vet. J.* **156**, 193-201.

Hernández-Vidal, G., Jeffcot, L.B. and Davies, M.E. (1997a) Cellular heterogeneity in cathepsin D distribution in equine articular cartilage. *Equine Vet. J.* **29**, pp. 267-273.

Hernández-Vidal, G., Jeffcott, L.B. and Davies, M.E. (1998) Immunolocalization of cathepsin B in equine dyschondroplasia growth cartilage. *The Vet.J.* **156**, pp. 193-201.

Hernández-Vidal, G., Valdes, M.A., Mora, V.F., Kawas, G.J., Ramirez, R.R., Davies, M.E., Jeffcot, L.B. (2002) Inmunolocalización de catepsina B en condrocitos y osteoclastos en discondroplasia (osteocondrosis) equina.

Hill D.J. and Logan A. (1992) Peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis. *Prog. Growth Factor. Res.* **4**, 45-68.

Hope E, Johnston SD, Hegstad RL, et al. (1993) Effects of sample collection and handling on concentration of osteocalcin in equine serum. *Am J. Vet. Res.* **54**, 1017-1020.

Horton, W.A. (1993) Morphology of connective tissue cartilage. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. Eds: Royce, P.M, P.M. and Steinman, B. Wiley-Liss, New York. pp. 73-84.

Hunziker E.B. (1994) Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc. Res. Tech.* **28**, 505-519.

Hurtig, M.B., Green, S.L., Dobson, H. and Burton, J. (1990) Defective bone and cartilage in foals fed a low-copper diet. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* **36**, pp. 637-643.

Hurtig, M., Green, S.L., Dobson, H., Mikuni-Takagaki, Y. and Choi, J. (1993) Correlative study of defective cartilage and bone growth in foals fed a low-copper diet. *Equine Vet. J. Suppl.* **16**, pp. 66-74.

Hurtig, M.B. and Pool, R.R. (1996) Pathogenesis of equine osteochondrosis. in : *Joint Disease in the Horse*, Eds : C.W. McIlwraith y G.W. trotter, W.B. Saunders, Philadelphia, pp 362-383.

Igarishi, M. and Hayashi, Y. (1980) Aging of in vivo cartilage cell. *Adv. Exp. Med. Biol.* **129**, 111-122.

Inerot, S., Heinegard, D., Audell, L. and Olsson, S.E. (1978) Articular cartilage proteoglycans in ageing and osteoarthritis. *Biochem. J.* **169**, pp. 143-156.

Jeffcot, L.B. (1991) Osteocho|ndrosis in the horse-searching for the key to pathogenesis. *Equine Vet. J.* **23**, pp. 331-338.

Jeffrey, J.E., Gregory, D. W. and Aspden,R.M. (1995) Matrix damage and chondrocyte viability following a single impact load on articular cartilage. *Arch. Biochem. Biophy.* **322**, pp. 87-96.

Jubb R.W. and Fell H.B. (1980) The effect of synovial tissue on the synthesis of proteoglycan by the articular cartilage of young pigs. *Arthritis Rheum.* **23**, 545-555.

Jurvelin, J., Säämänen, A.M., Arokoski, J., Helminen, H.J., Kiviranta, I., and Tammi, M. (1988) Biomechanical properties of canine knee articular cartilage as related to matrix proteoglycans and collagen. *Engineer. Med.* **17**, 157-162.

Kawabata, T., Nishimura, Y., Higaki, M. y Kato, K. (1993). Purification and processing of rat liver procathepsin. *Brit. J. Biochem.* **113**, pp. 389-394.

Kawada, A., Hara, K.,Morimoto, K., Hiruma, M. and Ishibashi, A. (1995) Rat epidermal cathepsin B: Purification and characterization of proteolytic properties toward filaggrin and synthetic substrates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, pp. 175-183.

Keaveny TM, Hayes WC. (1993) Mechanical properties of cortical and trabecular bone . *In* Hal BK (ed): Bone, vol 7, Bone Growth-B. BocaRaton, CRC Press, pp 285-344.

Kempson, G.E. (1980) The mechanical properties of articular cartilage. In : The joints and synovial fluid, volume II. Ed: L. Sokoloff. *Academic Press. New York.* pp. 177-183.

Keppler, D., Waridel, P., Abrahamson, M., Bachmann, D., Berdoz, J. and Sordat, B. (1994). Latency of cathepsin B secreted by human colon carcinoma cells is not linked to secretion of cystatin C and is relieved by neutrophil elastase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1226**, pp. 117-125.

Kerr, H.R. (1985) Warbuston B: Surface rheological properties of hyaluronic acid solutions. *Biorheology*, **22**, pp. 133-144.

Killackey J.J., Roughley, P.J., Mort, J.S. (1983) Proteinase inhibitors of human articular cartilage. *Coll. Rel. Res.* **3**, pp. 419-430.

Kincaid S. A., Allhands R. V., and Pijanowski G. J. (1985) Chondrolysis associated with cartilage canals of the epiphyseal cartilage of the distal humerus of growing pigs. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 726-732.

Kiviranta I., Tammi M., Jurvelin J., Saamanen A.M., and Helminen H.J. (1988) Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *J. Orthop. Res.* **6**, 188-195.

Kominami, E. and Katunuma, N. (1989) Biosynthesis, processing and localization of lysosomal cysteine proteinases. In: *Intracellular Proteolysis*. Eds: Katunuma, N. and Kominami, E. Japan Scientific Societies Press Tokyo. pp. 52-60.

Kominami, E., y Tsukahara, T., Hara, K. y Katunuma, N. (1988) Biosíntesis and processing of lysosomal cystein proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett.* **231**, pp. 225-228.

Kominami, E., Ueno, Y., Muno, D. and Katunuma, N. (1991) The selective role of cathepsins B and D in the lisosomal degradation of endogenous and exogenous proteins. *FEBS Lett.* **287**, pp. 189-192.

Koolwijk, P., Miltenburg, A. M. M., van Erck, M.G.M., Oudshoorn, M., Niedbala, M.J., Breedvel, F.C. and van Hinsbergh, V. W. M. (1995) Activated gelatinase-B (MMP-9) and urokinase-type plasminógeno activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation. *J. Rheum.* **22**, pp. 385-393.

Kornfeld, S. (1990). Lysosomal enzyme targeting. *Biochem.Soc. Trans.* **18**, pp. 367-374.

Kornfeld, S. (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, pp. 307-330.

Korver T.H., van-de S.R., Kiljan E., van K.G., and van-der K.J. (1992) Effects of loading on the síntesis of proteoglycans in different layers of anatomically intact articular cartilage in vitro. *J. Rheumatol.* **19**, 905-912.

Kuettner, K.E., Aydelotte, M.B., and Thonar, E.J.A. (1991) Articular cartilage matrix and structure : a minireview. *J. Rheumatol. Suppl.* **27**, 46-48.

Knight, D.A., Weisbrode, S.E., Schmall, L.M., Reed, S.M., Gabel, A.A., Bramlage, L.R., y Tyznik, W.I. (1990) The effects of copper supplementation on the prevalence of cartilage lesions in foals. *Equine vet. J.* **22**, 426-432.

Knox, P. Levick, J.R., and McDonald, J.N. (1988) Synovial fluid. Its mass, macromolecular content, and pressure in major limbs of the rabbit. *Q.J. Exp. Physiol.* **73**, 33-46.

Kuettner, K. E. and Pauli, B. U. (1983) in *Cartilage* (Hall, B. K., Ed.), Academic Press, New York.

Lai, W.M., How, V.C. (1989) Triphasic theory for articular cartilage swelling. *Proc. Biochem. Symp. ASME, NY, USA.* Pp. 33-36.

Lakowski, M. Jr. and kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 593-626.

Lenarcic, B., Gabrijelcic, D., Rozman, B., Drobnic-Kosork, M. and Turk, V. (1988) Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint disease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **369**, pp. 257-261.

Lenarcic, B., Krasovec, M., Ritonja, A., Olafsson, I. and Turk, V. (1991). Inactivation of human cystatin C and kininogen by human cathepsin D. *FEBS Lett.* **280**, pp. 211-215.

Leto, G., Gebbia, N., Rausa, L. y Tumminello, F.M. (1992). Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases (review). *Anticancer Research.* **12**, pp. 235-240.

Levick J. R. (1984) An analysis of the effect of synovial capillary distribution upon trans-synovial concentration profiles and exchange. *Q. J. Exp. Physiol.* **69**, pp. 289-300.

Levick J. R. (1987) Flow through interstitium and other fibrous matrices. *Q. J. Exp. Physiol.* **72**, pp. 409-437.

Lillich, J.D., Bertone, A.L., Malemud, C.J., Weisbrode, E., Ruggles, A.J., y Stevenson, S. (1997) Biochemical, histochemical e immunohistochemical characterisation of distal tibial osteochondrosis in horses. *Am. J. Vet. Res.* **58**. 89-98.

Lohmander, L.S., Lark, M.W., Dahlberg, L., Walakovits, L.A., and Ross, H. (1992) Cartilage matrix metabolism in osteoarthritis: Markers in synovial fluid, serum, and urine. *Clin. Biochem.* **25**, pp. 167-174

Lorenzo, J.A., Pilbeam, C.C and kalinowski, J.F. (1992) Production of both 92-and 72-kDa gelatinasas by bone cells. *Matrix.* **12**, pp. 282-290.

Lucy, J. A., Dingle, J.T. and Fell, H.B. (1961) Studies on the mode of action of excess vitamin A. 2. A possible role of intracellular proteases in the degradation of cartilage matrix. *Biochem. J.* **79**, pp. 500-508.

Mach, L., Stüwe, K., Hagen, A., Ballahum, C. y Glössl, J. (1992) Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem. J.* **282**, pp. 577-582.

Mach, L., Schwihla, H., Stüwe, K., Rowan, A.D., J.S. y Glössl, J. (1993). Activation of procathepsin B in human hepatoma cells: the conversion into the mature enzyme relies on the action of cathepsin B itself. *Biochem. J.* **293**, pp. 437-442.

Malfait, A.M., Verbruggen, G., Almqvist, K. F., Boddelez, C. and Veys, E. M. (1994) Co-culture of human articular chondrocytes with peripheral blood mononuclear cells as a model to study cytokine-mediated interactions between inflammatory cells and target cells in the rheumatoid joint. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **30**, pp. 747-752.

Mankin H. J., Dorfman H., Lipiello L., and Zarins A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips.II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg. Am.* **53**, 523-537.

Maroudas , A. (1980) Metabolism of cartilaginous tissues : A quantitative approach . In: Studies in Joint Disease, vol 1. Eds: A. Maroudas and E.J. Holborow.Pitman Medical. *Tunbridge Wells*, pp 59-86.

Maroudas, A., Mizrahi, J., Katz, E.P., et al. (1986) Physico chemical properties and functional behavior of normal and osteoarthritis human cartilage. In Kuettner KE, Scheyerbach R, Hascall VC (eds) : Articular Cartilage Biochemistry. New York, *Raven Press*. pp.311-320.

Maroudas, A., Palla, G., and Gilav, E. (1992) Racemization of aspartic acid in human articular cartilage. *Connect. Tissue Res.* **28**, 161-169.

Martell-Pelletier, J., Cloutier, J.M., and Pelletier, J.P. (1990) Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* **8**, 336-344.

Martel-Pelletier, J., Zafarullah, M., Kodama, S., and Pelletier, J.P. (1991) In Vitro effects of IL-1 on the synthesis of metalloproteinases, TIMP, plasminogen activators and inhibitors in human articular cartilage. *J. Rheumatol. Suppl.* **27**, 80-84.

Martel-Pelletier, J.M., Di Battista, J.A., Lajeunesse, D., and Pelletier, J.P. (1998) IGF/IGFBP axis in cartilage and bone osteoarthritis pathogenesis inflamm. Res. **47**, 90-100.

May, S.A., Hooke, R.E., and Lees, P. (1992) Interleukin-1 stimulation of equine articular cells. *Res. Vet. Sci.* **52**, 342-348.

Mayne, R. and Burgerson, R.E. (1987) Structure and function of collagen types. *Academic Press. New York.* pp. 1-317.

Mcdevitt, C.A. (1973) Biochemistry of articular cartilage. *Ann. Rheum. Diss.* **32**, pp. 364-378.

Mcdevitt C. A. and Muir H. (1976) Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. *J. Bone Joint Surg. Br.* **58**, 94-101.

McDonald, J. K. and Ellis, S. (1975) On the substrate specificity of cathepsins B1 and B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1. *Life Sci.* **17**, pp. 1269-1276.

Mcquillan D. J., Handley C.J., Campbell M. A., Bolis S., Milway V. E., and Herington A. C. (1986) Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem.J.* **240**, 423-430.

Maciewicz, R.A., Wootton, S.F., Etherington, D.J. and Duance, V.C. (1991) Susceptibility of the cartilage collagen types II, IX and XI to the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS Lett.* **269**, pp.189-192.

McIlwraith, C.W. (1986) Incidence of developmental joint problems. In: *AQHA Developmental Orthopedic Disease Symposium*, Ed: C.W. McIlwraith, AQHA, Amarillo, pp 15-20.

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

Meyer, H. (1994) Kupferstoffwechsel und Kupferbedarf beim Pferd. *Ubers. Tierernahr.* **22**, pp. 363-394.

Milward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Davies, L.W., Nuki, G. and Salter D.M (2000) Arthritis Rheum. **43**, 2091-2099.

Mitrovic, D., Quintero, M., Stankovic, A. and Ryckewaert, A. (1983) Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab. Invest.* **49**, pp. 309-316.

Mochan E., Uhl J., and Newton R. (1986) Evidence that interleukin-1 induction of synovial cell plasminogen activator is mediated via prostaglandin E2 and cAMP. *Arthritis Rheum.* **29**, 1078-1084.

Morales T.I. and Roberts A.B. (1988) Transforming fgrowth factor beta regulates the metabolism of proteoglycans in bovine cartilage organ cultures. *J. Biol. Chem.* **263**, 12828-12831.

Morris, E. A. and Treadwell, B.V. (1994) Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism pf osteoarthritic cartilage. *Am. J. Vet. Res.* **55**, pp. 138-146.

Mort, J.S., Recklies, A.D. and Poole, A.R. (1984) Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arth. Rheum.* **27**, pp. 509-515.

Mort, J.S., Recklies, A.D. (1986) Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin-B precursors. *Biochem.J.* **233**, pp.57-63.

Moskowitz R. W., Pun Y., and Haqqi T. M. Genetics and osteoarthritis (1992) *Bull. Rheum. Dis.* **41**, 4-6.

Mow, V.C., Holmes, M.H., and Lai, W.M. (1984) Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage. A review. *J. Biomechanics* **17**, 377-384.

Mow, V.C., Lai, W.M., Hou, J.S. (1990) A triphasic theory for the swelling properties of hydrated charged soft biological tissues. *Appl. Mech. Rev.* **43**, pp.134-141.

Mow, V.C., Ratcliffe, A., Poole, A.R. (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials.* **13**, pp.67-97.

Muir, I.H.M. (1972) Biochemistry. In: *Adult articular cartilage*. Ed: M.A.R. Freeman. Grune&Stratton. New York. pp.100-130.

.Mundy GR. (1993) Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling, *J Bone Min Res.* **8** (suppl 2): S505-S510.

Murphy , G., Hembry, R.M., Hughes, C.E., Fosang, A.J., and Hardingham , T.E. (1990) Role and regulation of metalloproteinases in connective tissue turnover. *Bioch. Soc. Trans.* **18**, 812-815.

Murphy G., Cockett M. I., Stephens P. E., Smith B. J., and Docherty A. J. (1987) Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* **248**, 265-268.

Nagase, H. (1996) Matrix Metalloproteinases in Zinc Metalloproteases in Health and Disease, Hooper NM, ed., Taylor and Francis, London.

Nguyen, Q., Murphy, G.M., Roughley, P.J. and Mort, J.S. (1989) Proteoglycan aggregate degradation by a cartilage metalloproteinase. Evidence for the involvement of stromelysin in the generation of link protein heterogeneity *in situ*. *Biochem. J.* 259 pp. 61-67.

Nguyen, Q., Mort, J.S. and Roughley, P.J. (1990) Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem. J.* **266**, pp. 569-573.

Nishimura, Y., Amano, J., Sato, H., Tsuji, H. y Kato, K. (1988a). Biosíntesis of lysosomal cathepsins B and H in cultured rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, pp. 159-170.

Nishimura, Y., Kawabata, T., Yano, S. y Kato, K. (1990) Intracellular processing and activation of lysosomal cathepsins. *Acta. Histochem. Cytochem.* **23**, pp. 53-64.

Nishimura, Y., Kawabata, T. y Kato, K. (1988 b). Identification of latent procathepsin B and L in microsomal lumen: characterisation of enzymatic activation and proteolytic processing *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, pp. 64-71.

Nilsson, F. (1947) Hästens goniter. *Svensk Vetidn.* **52**, 1-14.

Node S., Newbold P.J. (1983) factors determining the level of changes in intra-articular pressure in the knee of the dog. *J. Physiol*, **338**, pp. 21-36.

Oldberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K. and Heinegard, D. (1989) A collagen-binding 59-kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* **8**, pp. 2601-2604

Olivier, A., Nurton, J.P., and Guthrie, A.J (1997) An epizootological study of wastage in Thoroughbred racehorses in Gauteng, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Ass.* **68**, 125-129.

Oloyede, A. and Broom, N. (1996) The biomechanics of cartilage load carriage. *Conn. Tissue Res.* **34**, 119-143.

Olsson S.E. and Reiland S. (1978) The nature of osteochondrosis in animals. Summary and conclusions with comparative aspects on osteochondritis dissecans in man. *Acta Radiol. Suppl. Stockh.* **358**, 299-306.

Pagano, M., Capony, F. and Rochefort, H. (1989). La pro-cathepsine D peut activer *in vitro* la pro-cathepsine B secrete pas les cancers ovariens. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **309**, pp. 7-12.

Palmer J.L., Bertone A.L., Malemud C.J., Carter B.G., Papay R.S., and Mansour J. (1995) Site-specific proteoglycan characteristics of third carpal articular cartilage in exercised and nonexercised horses. *Am.J.Vet.Res.* **56**, 1570-1576

Palmer, J.L. and Bertone, A.L. (1994) Review article: joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet. J.* **26**, pp. 263-277.

Palmer, J.L. and Bertone, A.L. (1996) Joint biomechanics in the pathogenesis of traumatic arthritis. In: *Joint disease in the horse*. Eds: C.W McIlwraith and G.W. Trotter. Saunders. Philadelphia, pp. 104-119.

Palmoski M.J., Colyer R.A., and Brandt K.D. (1980) Joint motion in the absence of normal loading does not maintain normal articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **23**, 325-334.

Pascualicchio, M., Gasperini, R., Velo, G.P. and Davies, M.E. (1996) Effects of copper and zinc on proteoglycan metabolism in articular cartilage. *Med. of Inflamm.* **5**, pp. 95-99.

Pearce, S.G., Firth, E.C., Grace, N.D., y Fennessy, P.F. (1998) Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed New Zealand Thoroughbreds. *Equine vet. J.* **30**, 211-218.

Perin, J.P., Bonnet, F., Thurieau, C., and Jolles, P. (1987) Link protein interactions with hyaluronate and proteoglycans. Characterization of two distinct domains in bovine cartilage link proteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 13269-13272.

Plaas, A.H., Ison, A. L. and Ackland, J. (1989) Synthesis of small proteoglycans substituted with keratin sulfate by rabbit articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **264**, pp. 297-303.

Platt, D. (1996) Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In : *Joint disease in the horse*. Eds : C.W. McIlwraith and G.W. Trotter. Saunders. Philadelphia, pp 29-40.

Platt, D. and Bayliss, M.T. (1994) An investigation of the proteoglycan metabolism of mature equine articular cartilage and its regulation by interleukin-1. *Equine Vet. J.* **26**, pp. 297-303.

Platt D., Bird J.L., and Bayliss M.T. (1998) Ageing of equine articular cartilage: structure and composition of aggrecan and decorin. *Equine Vet.* **30**, 43-52.

Poole, R.R. (1993) Difficulties in the definition of equine OCD; differentiation of developmental and acquired lesions. *Equine Vet. J.* **S16**, 5-12.

Poole, C.A., Ayad, S. and Scholfield, J.R. (1988) Chondrons from articular cartilage. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J. Cell. Sci.* **90**, pp. 635-643.

Poole AR. (1993) Cartilage in health and disease. In McCarty DJ. (ed) : Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology. Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 279-333.

Poole, A.R., Alini, M., and Hollander, A.P. (1995) Cellular biology of cartilage degradation. In : Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis. Eds: B. Henderson, J. Edwards and R Pettipher. *Academis Press.* London. P. 163.

Pratta, M. A., Dimeo, T.M., Ruhl, D. M. and Arner, E.C. (1989) Effect of interleukin 1 β and tumour necrosis factor- α on cartilage proteoglycan metabolism in vitro. *Agents Actions.* **27**, pp. 250-253.

Radhakrishnamurthy, B., Ruiz, H., Daleferes, E. R., Klevay, L. M. and Berenson, G.S. (1989) Composition of proteoglycans in the aortas of copper-deficient rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **190**, pp. 98-104.

Radin EL, Rose RM. (1986) Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop* 1986; **213**:34-40.

Ralston, S.L. (1996) Hyperglycaemia/hyperinsulinaemia after feeding a meal of grain to young horses with osteochondrosis dissecans (OCD) lesions. *Pferdeheilk.* **12**, 320-322.

Reddi AH, Cunningham NS. (1993) Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Min Res* ; **8**(2): 5499-550

.Redini F., Galera P., Mauviel A., Loyau G., and Pujol J.P. (1988) Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett.* **234**, 172-176.

Richardson DW, Young DR, Clark CC. (1993) The relationship of subchondral bone stiffness to overlying cartilage morphology and biochemistry. *Trans Orthop Res Soc* 1993; **18**(2):720.

Rijas L, Halstead LR, Peck WA, et al. (1989) Human osteoblasts *in Vitro* secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major cellular products. *J Clin Invest*; **84**:686-694.

Rijnboutt,S., Stoorvogel, W., Geuze, H. J. and Strous, G. J. (1992). Identification of subcellular compartments involved in biosynthetic processing of cathepsin D. *J. Biol. Chem.* **267**, pp. 15665-15672.

Roberts C.R., Roughley P.J., and Mort J.S. (1989) Degradation of human proteoglycan aggregate induced by hydrogen peroxide. Protein fragmentation, amino acid modification and hyaluronic acid cleavage. *Biochem. J.* **259**, 805-811.

Rosenberg, L.C., Choi, H. U., Tang, L.H., Johnson, T. C., Pal, S., Webber, C., Reiner, A. and Poole, A.R. (1985) Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.* **260**, pp. 6304-6313.

Rossdale, P.D., Hopes, R., Wingfield-Digby, N.J., and Offord, K. (1985) *Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983.* *Vet. Rec.* **116**, 66-69.

Roughley, P.J., Barret, A.J. (1977) The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Proteoglycan structure and its susceptibility to proteolysis. *Biochem.J.* **167**, pp.629-637.

Roughley, P.J. (1986) Changes in cartilage proteoglycan structure during aging : origin and effects-a review. *Agents actions*, pp. **18**, 19-29.

Roughley, P. J., Nguyen, Q., Mort, J.S. Hughes, C.E. and Caterson, B. (1993) Proteolytic degradation in human articular cartilage: its relationship to stromelysin. In: *Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis*. Eds: van der Berg, W.B., van der Kraan, P. M., and van lent, P.L.E.M. Birkhäuser, Basel.pp.149-159.

Roughley P.J. and Lee E.R. (1994) Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc. Res. Tech.* **28**, pp. 385-397.

Roy, S. (1970) Ultrastructure of articular cartilage in experimental immobilization. *Ann. Rheum. Dis.* **29**, pp. 634-642.

Sah R.L., Kim Y.J., Doong J.Y., Grodzinsky A.J., Plaas A.H., and Sandy J.D. (1989) Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J. Orthop. Res.* **7**, 619-636.

Saklatvala, J., Pilsworth, L.M.C., Sarsfield, S.J., Gavrilovic, J. and Heath, J. K. (1984) Pig catabolin is a form of interleukin 1. *Biochem. J.* **224**, pp. 461-466.

Salter R.B., Simmonds D.F., Malcolm B.W., Rumble E.J., MacMichael D., and Clements N.D. (1980) The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. *An experimental investigation in the rabbit.* *J. Bone Joint Surg. Am.* **62**, 1232-1251.

Sandy J. D., Flannery C. R., Neame P. J., and Lohmander L. S. (1992) The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J. Clin. Invest.* **89**, 1512-1516.

San Segundo, B., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1985) Identification of cDNA clones encoding a precursor of rat liver cathepsin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, pp. 2320-2324.

Sasaki, T. and Ueno-Matsuda, E. (1993). Cysteine-proteinase localization in osteoclasts : an immunocytochemical study. *Cell. Tiss. Res.* **271**, pp. 177-179.

Savage, C. J., McCarthy, R. N. and Jeffcott, L.B. (1993) Effects of dietary energy and protein on induction of discondroplasia in foals. *Equine Vet. J.* **16**, pp. 74-79.

Shapiro, S.D., Campbell, E.J., Senior, R.M., Welgus, H.G. (1991) Proteinases secreted by human mononuclear phagocytes. *J. Rheumatol. Suppl.* **27**, 95-98.

Schmidt, M.B., Mow, V.C., Chun, L.E., et al: (1990) Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *J. Orthop. Res.* **8**, 353-363.

Scuderi, P. (1990) Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion. *Cell. Immunol.* **126**, pp. 391-405.

Shingu, M., Miyauchi, S., Nagai, S., Yasutake, C. and Horie, K. (1995) The role of IL-4 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation. *Brit. J. Rheum.* **34**, pp. 101-106.

Shuja, S. and Murnane, M.J. (1996) Marked increases in cathepsin B and L activities distinguish papillary carcinoma of the thyroid from normal thyroid or thyroid with non-neoplastic disease. *Int. J. Cancer.* **66**, pp. 420-426.

Simmons DJ, Grynepas MD. (1990) Mechanisms of bone formation in vivo. *In* Hall BK (ed) : Bone, vol 1, The Osteoblast and the Osteocyte. NJ, *The Telford Press*, pp 193-302.

Simpkin, P.A. and Pizzorno, J.E. (1974) Transsynovial exchange of small molecules in normal human subjects. *J. Appl. Physiol.* **36**, 581-588.

Simpkin, P.A. (1993) Synovial physiology. In: McCarty DJ, Koopman WJ (eds): Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, Vol.1 Philadelphia, *Lea&Febiger*, pp. 199-212.

Simunek, Z. and Muir, H. (1972) Changes in the protein-polysaccharides of pig articular cartilage during prenatal life, development and old age. *Bioch. J.* **126**, 515-523.

Sires, U.I., Schmid, T.M., Fliszar, C.J., Wang, Z-Q., Gluck, S.L and welgus , H.G. (1995) Complete degradation of type X collagen requires the combined action interstitial collagenase and osteoclasto-derived cathepsin B. *J. Clin. Invest.* **957**, pp. 2089-2095.

Smith, R.E., Smithwick, E.L. and Allen, C.H. (1972) A new assay for cathepsin B using CBZ-Ala-Arg-4MeO NA. *J. Histochem. Cytochem.* **20**, pp. 843.

Sorenson, J. R. J. (1989) Copper complexes offer a physiological approach to treatment of chronic diseases. In: *Progress in Medicinal Chemistry*. Eds: Ellis, G.P. and West, G. B. Elsevier. Amsterdam. **26**, pp. 437-568.

Spirit, A.A., Mak, A.E. and Wassel, R.P. (1989) Nonlinear viscoelastic properties of articular cartilage in shear. *J. Orthop. Res.* **7**, pp. 43-49.

Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1988) Peptide Growth factors are multifunctional. *Nature* **332**, pp. 217-219.

Stashak T.S (1987) Adams' lameness in horses. 4th ed. *Lea & Febiger*. Philadelphia. p. 339.

Stromberg B. (1976) Osteochondrosis dissecans of the stifle joint in the horse. A clinical, radiographic and pathologic study. *JAVRS*. **17**, 117-123.

Stockwell, R.A. and Meachim, G. (1979) The matrix. In: *Adult articular cartilage*. Ed: Freeman, M. A. R. England, pitman medical Publishing Co. Ltd. Tunbridge Wells. pp. 415-460.

Suzuki, K., Shimizu, K., Hamamoto, T., et al. (1990) Biochemical demonstration of calpains and calpastatin in osteoarthritic synovial fluid. *Arthritis. Rheum.* **33**, pp.728-732.

Suzuki, K., Shimizu, K., Hamamoto, T., Nakagawa, Y. (1991) Degradation of cartilage proteoglycans by calpains. In *Proceedings of the Orthopedic Research Society. Banff, Alberta*. P.27.

Swann, D.A., Silver, F.H., Slater, H.S., et al. (1985) The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochem. J.* **225**, pp. 195-201.

Swanson, S.A.V. (1979) Friction, wear and lubrication. In: *Adult Articular Cartilage*. Ed: Freeman, M.A.R. Kent, UK, Pitman Medical Publishing Co. Ltd. Tunbridge Wells. pp. 415-460.

Sweet M. B., Thonar E.J., Immelman A. R., and Solomon L. (1977) Biochemical changes in progressive osteoarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* **36**, 387-398.

Szego, C.M., Seeler, B.J. and Smith, R.E. (1976) Lysosomal cathepsin B1: partial characterization in rat preputial gland and re-compartmentation in response to estradiol-17. *Eur. J. Biochem.* **69**, pp. 463-474.

Teitelbaum SL. (1993) Bone remodeling and the osteoclasto. *J Bone Min Res.* **8**(suppl 2): S523-S525.

Tesch G.H., Handley C.J., Cornell H.J., and Herington A.C. (1992) Effects of free and bound insulin-like growth factors on proteoglycan metabolism in articular cartilage explants. *J. Orthop. Res.* **10**, 14-22.

Testa, V., Capasso, G., Mafulli, N., Sgambato, A., and Ames, P.R.J. (1994) Proteases and antiproteases in cartilage homeostasis . *Clin. Orthop. Related. Res.* **308**, 79-84.

Thonar, E.J: M: A., Manicourt, D.M., Williams, J., Lenz, M.E., Sweet, M.B., Schnitzer, T.J., Otten, L., Glant, T., and Kuettner, K.E. (1991) Circulating keratan sulfate: a marker of cartilage proteoglycan catabolism in osteoarthritis. *J. Rheum. Suppl.* **27**, 24-26.

Todhunter, R.J. and Lust, G. (1990) Pathophysiology of synovitis: Clinical signs and examination in horses. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* **12**, 980-992.

Todhunter, R.J. (1996) Anatomy and physiology of synovial joints. In: *Joint disease in the horse.* Eds. C.W. McIlwraith and G.W. Trotter. Saunders. Philadelphia, pp.1-28.

Trabandt, A., Gay, R.E., Fassbender, H.G. and Gay, S. (1991) Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arth. Rheum.* **34**, pp. 1444-1451.

Tracy RP, Mann KG. (1991) Osteonectin. In Hall BK (ed) : Bone, vol 3, Bone Matrix and Bone Specific Products, Boca Raton, CRC Press, pp 295-320.

Treadwell, B.V., Pavia, M., Towle, C.A., Cooley, V.J., and Mankin, H.J. (1991) Cartilage Synthesizes the serine perotease inhibitor PAI-1 : support fot the involvement of serine proteases in cartilage remodeling. *J. Orthop. Res.* **9**, 309-316.

Tyler, J.A. (1985b) Articular cartilage cultured with catabolin (pig interleukin-1) synthesizes a decreased number of normal proteoglycan molecules. *Biochem. J.* **227**, pp. 869-878.

Tyler J. A. (1989) Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem. J.* **260**, 543-548.

Urban, J.P.G. amd Hall, A. (1992) Physical modifiers of cartilage metabolism. In: *Articular cartilage and osteoarthritis*. Eds: Kuettner, E. K., Schleyerbach, R., Peyron, J.G. and Hascall, V.C. Raven Press, New York. pp. 393-406.

Urban, J.P.G., Hall, A.C. and Gehl, K.A. (1993) Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. *J. Cell. Physiol.* **154**, pp. 262-270.

Vachon, A.M., Keeley, F. N., McIlwraight, W. and Chapman, P. (1990) Biochemical analysis of normal articular cartilage in horses. *Am. J. Vet. Res.* **51**, pp. 1905-1911.

Van der Rest, M. and Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB. J.* **5**, pp. 2821-2823.

Van Noorden, C.J.F., Vogels, I.M.C., Everts, V. and Beertsen, W. (1987) Localization of cathepsin B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction product using 5-nitrosalicylaldehyde. *Histochem. J.* **19**, pp. 483-487.

Van Noorden, C.J.F. and Vogels, I.M.C. (1987) Cathepsin B activity in unfixed and undecalcified cryostat sections of normal and arthritic mouse knee joints. In: *Proc. 2nd Int. Meet. Mol. Cell. Regul. Enzyme Act.* Ed: Schowen, R.L. Pergamon Press. New York.

Van Weeren, P.R., Knaap, J. y Firth, E.C. (2002) The influence of liver copper status of mare and newborn foals on the development of osteochondrosis lesions. *Equine vet. J.*, accepted for publication.

Van-de L.A and van-den B.W. (1990) Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann, Rheum.Dis.* **49**, 238-245.

Van de Lest, C.H.A., Van den Hoogen, B.M., Van Weeren, P.R., Brouwers, J.F.H.M., Van Golde, L.M.G. and Barneveld, A. (1999) Changes in bone morphogenic enzymes and lipid composition of equine osteochondrotic subchondral bone. *Equine vet. J. Suppl.* **31**, 31-37.

Vasan N. (1980) Proteoglycans in normal and severely osteoarthritic human cartilage. *Biochem. J.* **187**, 781-787.

Veis A. (1993) Mineral-matrix interactions in bone and dentin. *J Bone Min Res.* **8**(2):5493-5497.

Verschure P.J. and Van N.C. (1990) The effects of interleukin-1 on articular cartilage destruction as observed in arthritic diseases, and its therapeutic control. *Clin. Exp. Rheumatol.* **8**, 303-313.

Vittorio, N., Crissman, J.D., Hopson, C.N. and Herman, J.H. (1986) Histologic assessment of cathepsin D in osteoarthritic cartilage. *Clin. Exp. Rheumatol.* **4**, pp. 221-230.

Wagner, P.C., Grant, B.D., Watrous, B.J., Appell, L.H y Blythe, L.L. (1995) A study of the heritability of cervical vertebral malformation in horses. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* **31**, 43-50.

Walker, P.S., Dowson, D., Longfield, M.D., et al. (1968) "Boosted lubrication" in synovial joints by fluid entrapment and enrichment. *Ann. Rheum. Dis.* **27**, pp.512-520.

Weightman, B. and Kempson, G.E. (1979) Load carriage. In: *Adult Articular Cartilage*. Ed: Freeman, M.A.R. England, Pitman Medical Publishing Co. Ltd. Tunbridge Wells. pp. 291-331.

Weiss, C., Rosenberg, L. and Helfet, A.J. (1968) An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg.* **50A**, pp. 663-674.

Werb, Z. (1989) Proteinases and matrix degradation. In Kelley WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Sledge CB. (eds). *Textbook of Rheumatology, ed 3. Philadelphia, WB Saunders.* pp. 300-321

Whitehouse, M. W., Rainsford, K. D., Taylor, R. M., Vernon-Roberts, B. (1990) Zinc monoglycerolate: a slow-release source of zinc with anti-arthritic activity in rats. *Agents and Actions.* **31**, pp. 47-58.

Wiederanders, B., Brömme, D., Kirschke, H., von Figura, K., Schmidt, B., y Peters, C. (1992). Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. *J. Biol. Chem.* **267**, pp. 13708-13713.

Wilkins, R.J. and Hall, A.C. (1995) Control of matrix synthesis in isolated bovine chondrocytes by extracellular and intracellular pH. *J. Cell. Physiol.* **164**, pp. 474-481.

Witsch P.P., Miehke R., and Kresse H. (1992) Presence of small proteoglycan fragments in normal and arthritic human cartilage. *Arthritis Rheum.* **35**, pp. 1042-1052.

Woodard J. C., Becker H. N., and Poulos-PW J. (1987) Articular cartilage blood vessels in swine osteochondrosis. *Vet. Pathol.* **24**, 118-123.

Woessner, J.F. Jr and Howell, D.S. (1983) Hydrolitic enzymes in cartilage. In : Studies in joint disease. Eds. : A. Maroudas and E.J. Holborow. Pitman. London. pp 106-152.

Woessner, J.F. Jr and Gunja-Smith, Z. (1991) Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J. Rheumatol. Suppl.* **27**, 99-101.