

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Rol del ligando del factor nuclear kappa Beta (RANKL) en osteoartritis y osteoclastogénesis de equinos fina sangre de carrera. Uso de antiinflamatorios

Role of the nuclear factor kappa Beta ligand (RANKL) in osteoarthritis and osteoclastogenesis in thoroughbred horses. Use of anti-inflammatory drugs.

Luis De Negri^{1,3}, Luis Olguin¹, Leonardo Pavez^{1,2}

RESUMEN

La osteoartritis (OA) es una de las principales afecciones que incide en el rendimiento de equinos de deporte. El diagnóstico temprano de la enfermedad es relevante en su manejo clínico y terapéutico. La evidencia demuestra que este proceso tiene una clara relación entre osteoclastos y células inmune compartiendo moléculas como citoquinas, receptores, moléculas de señalización, factores de transcripción que se influyen mutuamente donde juegan un rol crucial tanto en la resorción ósea patológica como fisiológica. Se describe el rol del ligando del activador del receptor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) como una de las citoquinas más relevantes que inducen osteoclastogénesis.

Palabras clave: RANKL, osteoartritis, equinos, osteoclastogénesis, inflamación

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is one of the main conditions that affects the performance of sports horses. Early diagnosis of the disease is relevant in its clinical and therapeutic management. The evidence shows that this process has a clear relationship between osteoclasts and immune cells sharing molecules such as cytokines, receptors, signaling

¹ Núcleo de Investigaciones Aplicadas en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (NIAVA), Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía, Universidad de Las Américas, Santiago, Chile

² Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas, Universidad Bernardo O'Higgins, Santiago, Chile

³ E-Mail: dr.luisdenegri@gmail.com

Recibido: 30 de abril de 2020

Aceptado para publicación: 18 de febrero de 2021

Publicado: 24 de abril de 2021

molecules and transcription factors that influence each other where they play a crucial role in both pathological and physiological bone resorption. The role of the nuclear receptor activator ligand $\text{k}\beta$ (RANKL) is described as one of the most relevant cytokines that induce osteoclastogenesis.

Key words: RANKL, osteoarthritis, equine, osteoclastogenesis, inflammation

INTRODUCCIÓN

En equinos de deporte, la principal causa de invalidez funcional son las afecciones que comprometen el sistema músculo esquelético (Martiq *et al.*, 2014), donde la osteoartritis (OA) es una entidad patológica de gran incidencia y causa común de claudicación (Polli *et al.*, 2013), dolor y efusión sinovial que reduce el rendimiento físico (de Souza, 2016; Stefaniuk-Szmukier *et al.*, 2019) y pérdida de días de entrenamiento (Reed *et al.*, 2012). Los ejemplares afectados en forma aguda presentan signos de inflamación en la articulación carpal, metacarpo falángica y tibiotarsal (Caggiano *et al.*, 2013), no habiendo tratamiento curativo (Xie *et al.*, 2019).

El dolor es el síntoma cardinal de la artritis relacionado directamente con la función y calidad de vida, cuya patogénesis se ha retrasado en áreas como el control de la inflamación, regulación de la autoinmunidad y falta de terapéutica. Sin embargo, se investigan los mecanismos biológicos y moleculares en diferentes modelos animales (Hong *et al.*, 2020). Por décadas, las investigaciones realizadas en torno a la inflamación articular producto del trauma repetitivo (McIlwraith, 2009; Goodrich y Nelson, 2013), se han orientado a conocer el rol del cartílago articular, líquido y membrana sinovial (Frisbie, 2012; Ross *et al.*, 2012), pero no se ha estudiado debidamente lo que ocurre en el hueso subcondral de equinos con OA.

La remodelación del hueso subcondral es un proceso biológico que compromete a células residentes de la médula ósea, que in-

cluye osteoblastos, osteocitos, osteoclastos (Al- Bari y Al Mamun 2020) y células inflamatorias derivadas de células madre (*stem cells*) hematopoyéticas (Xie *et al.*, 2019), que en la patogénesis de la OA aparecen con una menor densidad mineral ósea y un incremento en los espacios del trabeculado, formando erosiones que se extienden a través del cartílago calcificado con orientación vertical en el hueso esponjoso (Lacourt *et al.*, 2012). Su alteración arquitectónica reduce su habilidad para disipar las fuerzas y distribuir el impacto generado sobre la articulación, lo que se traduce en un aumento de las fuerzas biomecánicas sobre el cartílago articular acelerando el daño (De Simone *et al.*, 2013).

Los osteoclastos que participan en la osificación endocondral, remodelación ósea subcondral, reparación ósea y su densidad, es mayor en el plato óseo cortical subcondral (0.3 mm) comparado con el trabeculado óseo más profundo de grupos de potrillos, añeros y adultos (Gilday *et al.*, 2020). Por otra parte, Zarka *et al.* (2019) detectaron en el cartílago calcificado y hueso subcondral, microfracturas y aumento de la densidad de osteocitos en rodillas de cadáveres humanos donde estas pueden reflejar una vía en que el cartílago articular puede ser protegido del trauma disipando la energía en respuesta a la carga mecánica.

En equinos, la OA se caracteriza por presentar sinovitis, alteración de la viscosidad del líquido sinovial y un lento y progresivo resquebrajamiento del cartílago hialino (Novakofsky *et al.*, 2015). Además, se describe en la etapa inicial inflamatoria el rol de

macrófagos sinoviales, macrófagos del tejido adiposo y osteoclastos (Xie *et al.*, 2019) y, por otra parte, el compromiso de tejidos, tanto articulares como periarticulares (Frisbie, 2012; Caggiano *et al.*, 2013) que en el tiempo van a presentar signos radiográficos de la enfermedad como osteofitos, esclerosis, quistes en el hueso subcondral, disminución del espacio articular y entesofitos (Milner, 2011; Lacourt *et al.*, 2012) y en estados avanzados, erosión cartilaginosa y fibrosis de la membrana sinovial (De Simone *et al.*, 2013; Goodrich y Nelson, 2013; Xie *et al.*, 2019).

Independiente de los avances en el diagnóstico, las lesiones articulares se mantienen como un problema común en caballos de carrera (Singer, 2013). Es así que en el Reino Unido, se encontró que el 24% de los caballos tuvo problemas articulares durante el entrenamiento y las carreras (Reed *et al.*, 2012). Asimismo, en Australia, se encontró que el 31% de los caballos de dos años en entrenamiento sufrió algún tipo de lesión articular en las áreas que sustentan la carga mecánica, como ocurre en la superficie proximal del tercer hueso carpiano, la superficie distal del hueso carpo radial y el borde proximal de la primera falange (Reed *et al.*, 2012).

Respecto a fracturas por estrés, asociadas con claudicación en caballos entrenados en diferentes superficies realizado en dos hospitales, uno en Toronto y otro en Pensilvania, de un total de 528 cintigramas, hubo una mayor proporción (31.7%) de caballos fracturados entrenados en una superficie sintética en comparación a los entrenados en una superficie de tierra (MacKinnon *et al.*, 2014). Es así que las afecciones músculo esqueléticas se orientan a los signos clínicos, diagnóstico y tratamiento (De Negri, 2006), pero no se cuenta con información de lo que ocurre a nivel molecular y los cambios inmunológicos que conllevan a la destrucción ósea; sin embargo, la evidencia indica que hay un sistema inmune y esquelético que comparten una serie de moléculas que regulan su función como citoquinas, receptores, molé-

culas de señalización y factores de transcripción (Okamoto y Takayanagi, 2011).

En este contexto, en la remodelación fisiológica del hueso participan dos tipos principales de células, los osteoblastos (OBs), que forman hueso nuevo y los osteoclastos (OCs) que reabsorben hueso dañado o viejo (Adamopoulos y Mellins, 2015). El desarrollo progresivo de los OBs hasta su madurez se caracteriza por una expresión secuencial de genes que identifican tres periodos de desarrollo del fenotipo osteoblástico: proliferación, maduración y síntesis de matriz extracelular (MEC) y mineralización de la matriz. Esto se hace controlando la remodelación mediante 1) osteocalcina, 2) osteopontina, y 3) sialoproteína ósea, cuya función es promover la nucleación de cristales de hidroxiapatita y diferenciación de OBs, donde la hormona calcitonina actúa sobre ellos aumentando su proliferación y la expresión de osteoprotegerina (OPG) RNAm, inhibiendo el ligando del receptor del factor nuclear kappa Beta (RANKL) (Neve *et al.*, 2011).

El proceso por el cual células madre hematopoyéticas se diferencian en OCs multinucleados con la función de reabsorber hueso, se define como osteoclastogénesis (Takanayagi, 2007). Los OCs tanto en la resorción fisiológica como patológica, tienen al ligando del factor nuclear kappa Beta (RANKL) como la citoquina clave.

Debido a la corta vida de los OCs, estos deben ser continuamente generados en o cerca del sitio de la resorción ósea donde OPG puede ser producida en la misma cercanía de RANKL, por lo que su relación con OPG, es el mayor determinante de la magnitud de formación de OCs y resorción ósea en ese lugar (O'Brien *et al.*, 2013). Por otra parte, el esqueleto se adapta a las cargas mecánicas mediante la remodelación y los OCs que se encuentran cerca de las zonas de microdaño, donde se cree que inician la resorción ósea; sin embargo, la carga local mecánica como flujo de fluido regula el reclutamiento y diferenciación de los precursor-

res de osteoclastos en el sitio de la resorción ósea a través de canales de calcio (Gao *et al.*, 2019).

Dos factores son esenciales y suficientes para promover la osteoclastogénesis: el factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1) y el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa Beta (RANKL). Así, CSF-1 sustenta la proliferación de OCs y su sobrevivencia, mientras que RANKL induce la activación de la diferenciación de OCs, incluyendo la activación de genes necesarios para la resorción ósea y genes requeridos para la fusión de células progenitoras de monocitos (Levaot *et al.*, 2015).

Independiente de las actividades que ocurren en el hueso, la sinovia por su parte, se divide en dos compartimientos, donde la más externa (sub-íntima) con macrófagos especializados (sinoviocitos) y fibroblastos mantienen la homeostasis articular interna, donde estas últimas producen metaloproteinasas de la matriz en los estados tempranos de la OA (Xie *et al.*, 2019), y la más interna (íntima), que provoca dolor y alteración de la función, caracterizada por infiltración de neutrófilos, linfocitos T y monocitos, junto con aumento de la hiperplasia y vascularización de la membrana sinovial que incrementa la expresión de citoquinas catabólicas como interleuquina uno (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) secretadas por los condrocitos y aumento de la producción y liberación de metaloproteinasas (MMPs) por condrocitos y sinoviocitos que degradan los componentes de la matriz extracelular (MEC) del cartílago (Frisbie, 2012).

La presencia de Interleuquina uno Beta (IL-1 β), se describe como una las citoquinas proinflamatorias más poderosas que estimula *in vitro* e *in vivo* la resorción ósea, regula la producción de OPG, aumenta la síntesis de prostaglandina E2 (PG_{E2}), regula la diferenciación, activación y sobrevivencia de los osteoclastos, incrementa la producción del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), e inhibe la apoptosis de osteoclastos

y los efectos de TNF en la osteoclastogénesis, de manera que sus efectos conducen a la resorción ósea y osteoporosis (Ruscitti *et al.*, 2015).

Los radicales libres por su parte, juegan un rol en la degradación del ácido hialurónico y del colágeno, donde la PG_{E2} está aumentada en el líquido sinovial de caballos con OA. Esto se ha correlacionado con sinovitis y claudicación clínica, los cuales pueden reaccionar con el óxido nítrico en las articulaciones dañadas provocando destrucción de la MEC y apoptosis de condrocitos, disminución de la deposición de sulfato dentro de las cadenas de glicosaminoglicanos, síntesis de colágeno y expresión de una importante citoquina antiinflamatoria, la antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007).

Abdelmagid *et al.* (2015) estiman que la inflamación crónica durante el envejecimiento de una articulación se caracteriza por aumento de citoquinas proinflamatorias, pérdida de hueso y disminución de la capacidad de reparación, lo que se asocia a un incremento de la osteoclastogénesis con profundos cambios metabólicos, estructurales y funcionales en el hueso, orientando el balance de la remodelación ósea hacia la resorción mediada por OCs. En este contexto, utilizando un modelo animal, se demostró que una vez instalada la artritis crónica, hay una reducción de la densidad ósea y un deterioro de las propiedades mecánicas del hueso como rigidez, ductilidad y resistencia; lo que refuerza la hipótesis de que una desregulación del sistema inmune afecta fuertemente el metabolismo del hueso, estructura y función (Caetano-Lopes *et al.*, 2010).

Por lo tanto, lo más importante en esta enfermedad, es realizar un diagnóstico y tratamiento precoz, para evitar la progresión de la OA (Kamm *et al.*, 2013). Sin embargo, en los estados tempranos, el examen radiográfico se considera que tiene una baja sensibilidad (McIlwraith, 2009) y, por este motivo, las lesiones son diagnosticadas cuando ya se ha

producido un daño articular significativo (McIlwraith *et al.*, 2012). En la actualidad, se cuenta con alternativas de diagnóstico, como es el uso de la ultrasonografía y resonancia magnética, las cuales pueden ser más precisas y sensibles en la detección de lesiones articulares, ya que permiten evaluar tejidos blandos (Goodrich y Nelson, 2013), pasando a ser un buen complemento en el diagnóstico.

Rol de RANKL en la Osteoartritis y Osteoclastogénesis

La homeostasis ósea es controlada en forma bien balanceada y dinámica entre osteoclastos, osteoblastos y osteocitos, donde osteoclastos son células multinucleadas que degradan la matriz ósea. Si este balance implica una mayor resorción por osteoclastos sobre la formación de hueso por osteoblastos se traduce en una disminución de la matriz ósea (Al-Bari y Almamun, 2020). Es así, que la inflamación crónica determina cambios metabólicos estructurales y funcionales en el hueso orientando el balance de la remodelación ósea hacia la resorción mediada por osteoclastos. En este contexto, utilizando un modelo animal se demostró que una vez instalada la artritis crónica hay una reducción de la densidad ósea y un deterioro de las propiedades mecánicas del hueso como rigidez, ductilidad y resistencia (Caetano-Lopes *et al.* 2010).

La diferenciación de OCs es regulada por el factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF) y el ligando del factor nuclear kappa beta (RANKL), una citoquina de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Asagiri y Takayanagi 2007), expresado por osteoblastos que forman hueso y sustentan la osteoclastogénesis (Adamopoulos y Mellins 2015).

En el hueso, la expresión de RANKL, que es una proteína de membrana tipo II, perteneciente a la superfamilia TNF localizada en la capa medias y profunda del cartí-

lago hialino, correlaciona con la degeneración y densidad de osteoclastos (Bertuglia *et al.*, 2016), permite la maduración, diferenciación y activación de estos mediante unión a su agonista el receptor del factor nuclear kappa Beta (RANK), que traduce sus señales reclutando moléculas adaptadoras como el factor asociado al receptor TNF (TRAF), donde TRAF-6 es el principal adaptador molecular que conecta RANK a la diferenciación y función de OCs (Nakashima *et al.*, 2012).

RANKL es expresado en condrocitos y fibroblastos sinoviales (Adamopoulos y Mellins, 2015), contribuyendo directamente en la destrucción del hueso (Nakashima *et al.*, 2012); sin embargo, otros autores estiman que RANKL es exclusivamente expresado en el tejido sinovial por linfocitos T activados y fibroblastos sinoviales (Izquierdo y Pablos, 2013). RANKL es también expresado por otras células como monocitos, neutrófilos, células dendríticas, linfocitos B y T (Liu y Zhang, 2015). En consecuencia, determinar el origen de RANKL en la osteoartritis de equinos, probablemente constituiría un gran desafío en estudios prospectivos.

Por otra parte, los OBs juegan un rol crucial en la regulación de la resorción ósea por OCs mediante RANKL (Zupan *et al.*, 2013). Los OBS, células gigantes multinucleadas son diferenciadas de precursores de stem cell hematopoyéticas en presencia de factores esenciales como: el receptor activador del factor nuclear κ B (NF- κ B) ligando (RANKL), el cual es una citoquina factor de la familia de necrosis tumoral (TNF) (Boyce *et al.*, 2015) y OPG, un factor que ejerce un efecto protector en el hueso, la cual es una proteína soluble que tiene una alta similitud con RANK y es un receptor miembro de la superfamilia TNF, con un importante rol en el sistema esquelético actuando como señuelo para el enlace RANK-RANKL (Neve *et al.*, 2011).

OPG se une a RANK con alta especificidad y de esta manera impide la diferenciación y activación de osteoclastos y promueve su apoptosis y, por lo tanto, el balance entre RANKL y OPG determina la resorción ósea (Adamopoulos y Mellins, 2015). Es así, que la unión de RANKL a RANK es inhibida por el receptor señuelo OPG (Okamoto y Takayanagi, 2011), donde el sistema RANKL/RANK/OPG juega un rol clave en la formación, activación y sobrevivencia de OCs (Liu y Zhang, 2015). En estudios realizados en ratones con bloqueo de RANK o RANKL se produce una severa osteopetrosis con defectos en la erupción dental como consecuencia de la falta de osteoclastos. Por otra parte, ratones sin OPG presentan una severa osteoporosis causada por el aumento en número y actividad de osteoclastos (Liu y Zhang, 2015).

Se ha sugerido que OPG puede regular el tráfico intracelular de RANKL y, según esta hipótesis, cuando hay abundante OPG hace que la mayor parte de RANKL sintetizado se mantenga en el interior de vesículas intracelulares y, en consecuencia, inactivo. Por el contrario, en ausencia de OPG, RANKL se localizaría preferentemente en la membrana, donde es capaz de interactuar con los precursores osteoclasticos (Riancho y Delgado-Calle, 2011). La evidencia ha demostrado, que desórdenes del sistema RANKL/RANK/OPG están asociados a enfermedades del humano entre las que se incluyen osteoporosis, artritis reumatoide y tumores óseos (Liu y Zhang, 2015). En un estudio realizado para evaluar RANKL, la quimocina CXCL16 sobre-regula su expresión en artritis reumatoide y fibroblastos de la sinovia (Li *et al.*, 2016).

Por otra parte, las citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-1, IL-6, IL-7, las cuales son abundantes en el líquido sinovial y sinovia de pacientes con artritis reumatoide, tienen una gran capacidad de inducir RANKL por los fibroblastos, por lo que aceleran su señalización contribuyendo al proceso de destrucción

ósea (O'Brien *et al.*, 2013). Las dos formas de RANKL, tanto la unida a membrana como la soluble, actúan como ligando agonistas de RANK donde RANKL se expresa en células mesenquimales como OBs y células estromales de la médula ósea (Ariyoshi *et al.*, 2014).

En el hueso, la expresión de RANKL que es una proteína de membrana tipo II pertenece a la superfamilia TNF, permite la maduración, diferenciación y activación de osteoclastos mediante unión a su agonista RANK, que es que es una proteína de membrana tipo I expresada en células precursoras de osteoclastos que traduce sus señales reclutando moléculas adaptadoras como el factor asociado al receptor TNF (TRAF) (Nakashima *et al.*, 2012).

RANK por su parte, es una molécula transmembrana expresada en células precursoras de osteoclastos y osteoclastos maduros que carece de actividad enzimática intrínseca en su dominio intracelular y genera señales por su unión a moléculas como factor asociado al receptor TNF (TRAF) (Ariyoshi *et al.*, 2014). En este contexto, TRAF6 es el principal adaptador molecular que liga RANK a la diferenciación y función de los OCs activando al complejo I κ B kinasa (IKK) que induce fosforilación y degradación de I κ B (Boyce *et al.*, 2015). La señalización intracelular de RANK con su interacción con RANKL induce la activación de su adaptador TRAF 6 y su inhibición de kinasas (IKKs) I κ B (I κ B) NF- κ B (Boyce *et al.*, 2015). Esto se basa en las observaciones en ratones deficientes en TRAF6 que fallaron en diferenciarse al estado maduro *in vitro* en presencia de CSF-1 como de RANK-L desarrollando osteopetrosis (Liu y Zhang, 2015) y por un mecanismo que aún no se conoce, el complejo RANKL-RANK, induce la trimerización con TRAF6 conduciendo a la activación del NF- κ B.

RANK a su vez, es expresado por células del linaje monocito macrófago entre las cuales se incluyen: células pre osteoclasticas,

células B y T, células dendríticas y fibroblastos y es altamente expresado en la superficie de progenitores de OCs y OCs maduros, capaces de inducir la osteoclastogénesis, mediada por la señal de RANKL, y que al carecer de capacidad de activación proteína quinasa intrínseca para mediarla, requiere de moléculas adaptadoras de unión al dominio intra citoplasmático de RANK donde se incluyen a factores asociados a receptores TNF (TRAFs), que se unen a sitios específicos del dominio de RANK que activan moléculas en la cascada hacia el núcleo (Liu y Zhang, 2015).

La cola citoplasmática de RANK contiene tres dominios de unión a TRAF6 y la unión de esta proteína a RANK induce la trimerización de TRAF6, el cual conduce a la activación de NF- κ B vía fosforilación e inactivación de kinasas K (IKK) (Liu y Zhang, 2015). Así, en pre-osteoclastos, TRAF6 actúa induciendo la expresión de la proteína activadora de los genes diana (API) y el Factor de células T activado y calcineurina-1 dependiente (NFATc1), conducente a la fusión y diferenciación de pre-osteoclastos (Ng Kong y Martin, 2012; Stefaniuk-Szmukier *et al.*, 2019).

RANKL y algunas citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral, activan el factor nuclear kappa beta (NF- κ B) el cual es un factor de transcripción que regula la expresión de muchos genes involucrados en la inflamación para lo cual necesita varias etapas de activación que requiere ubiquitinación (marcación de proteínas celulares para su proteólisis en el proteosoma) donde participa el factor de células T activador citoplasmático 1 (NFATc1) regulando la formación de los OCs y sus funciones, fundamentalmente orientadas a la resorción ósea (Boyce *et al.*, 2015; Levaot *et al.*, 2015). La activación del NFATc1 es mediada por una fosfatasa específica, la calcineurina, la cual es activada por la señalización calcio-calmodulina (Nakashima *et al.*, 2012).

TNF- α es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda y posee dos receptores (TNF-RI y TNF-RII), los cuales, al ser activados activan varios factores de transcripción, fundamentalmente al NF- κ B, importante para la transcripción de numerosos genes (Caggiano *et al.*, 2013). De hecho, MCSF, NF- κ B, RANKL y TNF son citoquinas expresadas/secretadas por células inmune que también regulan la osteoclastogénesis (Cuming *et al.*, 2018). Por lo tanto, la vía de señalización RANKL-RANK-NF- κ B es la más importante (Figura 1), y permite la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo, liberándolo de los complejos IKK que lo retienen en el citoplasma, donde es inactivo (Boyce *et al.*, 2015).

El esquema básico de la señalización de NF- κ B consiste en una serie de elementos reguladores positivos y negativos induciendo estímulos que gatillen la activación de IKK conducentes a la fosforilación, ubiquitinación y degradación proteínas I κ B, donde liberados los dímeros NF- κ B son activados y trasladados al núcleo donde se unen a secuencias específicas de DNA y promueven la transcripción de genes (Hayden y Gosh, 2008).

El NF- κ B pertenece a una familia que expresa factores de transcripción, jugando un rol esencial en la mayoría de las respuestas inmunes e inflamatorias. En mamíferos, el NF- κ B consiste en seis miembros: Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NF- κ B 1 (p50 y su precursor p105), y NF- κ B 2 (p52 y su precursor p100) (Nakashima *et al.*, 2012). Entonces, para que la señalización del NF- κ B se produzca en el OC, se requiere de ubiquitinación y degradación proteosomal o procesamiento de proteínas inhibitorias I κ Bs (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ), que les permiten unirse al NF- κ B. Así, I κ B α , que se une a los heterodímeros RelA/p50, es degradado, lo que permite, a través de estudios realizados en ratones knock-out, o con bloqueadores de RANKL, haber determinado que estos entren al núcleo (Boyce

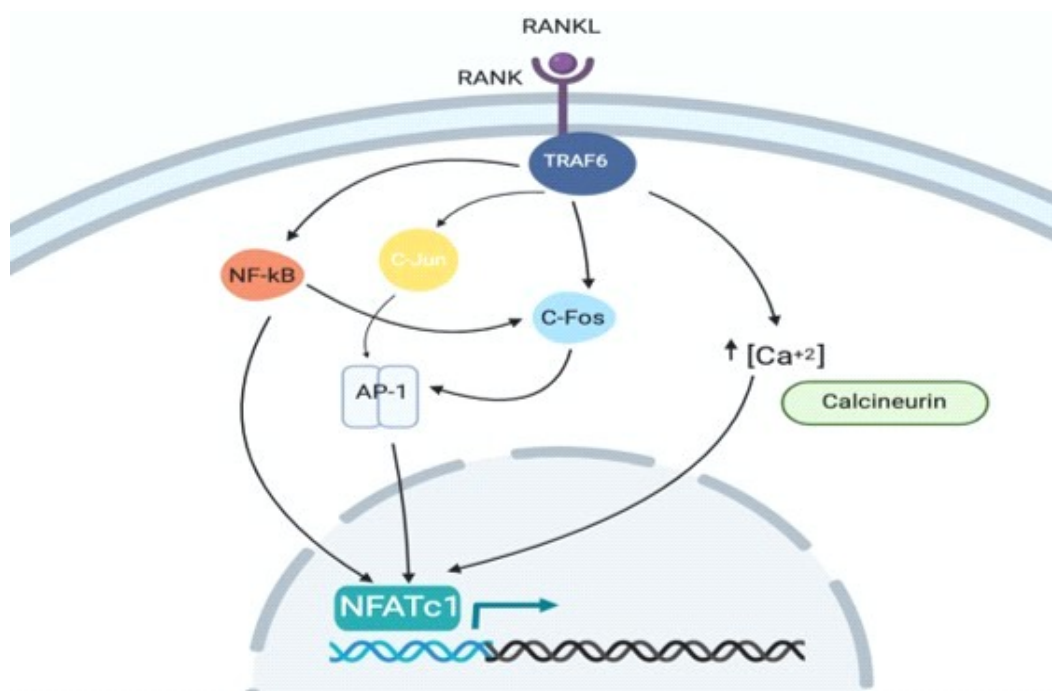


Figura 1. Cascada de señalización durante la osteoclastogénesis. El receptor activador del ligando del factor nuclear kB (RANKL) y su unión a RANK tiene como consecuencia el reclutamiento de factores de necrosis tumoral asociados a receptores como TRAF6 que activa al factor nuclear kB (NF-kB) y proteínas quinasas mitógeno activadas. RANKL también estimula la inducción de c-Fos a través de NF-kB y calcio/calmodulina. NF-kB y c-Fos son importantes para la fuerte inducción del factor nuclear de células T citoplasmáticas 1 (NFATc1)

et al., 2015). Al utilizar ratones knock-out o con bloqueadores de RANKL (ej. OPG), se sugirió que la formación de OCs asociada con inflamación es enteramente RANKL dependiente, aun cuando otros factores pueden exacerbar la acción de RANKL y donde la mayor fuente de RANKL son las células estromales locales y por reclutamiento, activación de macrófagos y células T presentes en el foco inflamatorio, lo cual se traduce en la producción local de citoquinas pro inflamatorias tales como TNF- α , Il-1 e Il-6 que estimulan la expresión de RANKL en OBs (Ng Kong y Martin, 2012).

La traslocación al núcleo de NF-kB requiere la liberación previa de los complejos IKK que lo retienen en el citoplasma donde es inactivo, de manera que en el núcleo activa la transcripción génica y la formación de productos que van a degradar el hueso (Boyce *et al.*, 2015).

La migración de precursores de osteoclastos al sitio de resorción ósea y su fusión en osteoclastos multinucleados maduros no está del todo resuelto, donde los osteocitos apoptóticos cercanos al microdaño liberan citoquinas como RANKL, demostrando

do que los osteoclastos podrían migrar hacia las zonas de fluido con microdaño a través de canales de calcio determinando un nuevo mecanismo de reclutamiento y diferenciación de osteoclastos durante la resorción ósea y remodelación (Gao *et al.*, 2019).

Una vez que los osteoclastos finalizan la resorción ósea en una unidad de remodelación, desaparecen por apoptosis donde los osteoblastos también sufren apoptosis y en parte se transforman en osteocitos, por lo que se presume que pueden ser los sensores del remodelado en microfracturas o cuando hay modificación de las fuerzas mecánicas (Riancho y Delgado-Calle, 2011).

Por otra parte, la estimulación de la vía JNK promueve la formación y activación del complejo AP-1, formado por c-Fos y c-Jun que junto con AP-1 y NF- κ B, son capaces de inducir la expresión del factor de transcripción NFATc1 (Riancho y Delgado-Calle, 2011), que para translocarse al núcleo y llevar a cabo su función, requiere de un aumento del Ca^{+2} intracelular que provoca la activación de calcineurina que cataliza la eliminación de un grupo fosfato de NFATc1 (Riancho y Delgado-Calle, 2011).

En la literatura también se mencionan otros factores involucrados en la osteoclastogénesis como IL-17 (Zupan *et al.*, 2013), la cual induce la síntesis de RANKL en células mesenquimales, tales como OBs y fibroblastos sinoviales incrementando la inflamación local. Además, factores de crecimiento en el microambiente del hueso, donde la señalización del factor transformante beta 1 (TGF- β 1) promueven la diferenciación de linfocitos T helper 17 (Th17) implicados en la destrucción ósea (Morita *et al.*, 2016) y, que actuando directamente sobre macrófagos de la médula ósea, promueven la osteoclastogénesis vía RANKL (Tanaka, 2017).

Una vez finalizados los procesos de señalización y que indujeron la osteoclastogénesis como resultado de la interacción de RANKL con su receptor RANK, se acti-

va la señalización de NF- κ B en precursores de osteoclastos y en osteoclastos maduros (Neyro *et al.*, 2011), los que sufren cambios estructurales desarrollando un borde irregular adosándose al hueso, formando una vacuola externa dentro de la cual son secretados iones de hidrógeno que acidifican el medio (Zupan *et al.*, 2013), fosfatasa ácida tartrato resistente que decalcifica el hueso y catepsina K que destruye colágeno tipo I y MMP-9 que degrada otros componentes orgánicos (Okamoto y Takayanagi, 2011). Esta actividad, es amplificada por la expresión en los osteoclastos por canales de cloro y H^+ -ATPasa, acidificando el espacio extracelular (Adamopoulos y Mellins, 2015).

De esta forma se mantiene un íntimo contacto con la superficie del hueso junto con la aparición de un anillo periférico de actina carente de organelos (zona clara o de sellado) (Boyce *et al.*, 2015). Luego, se forma una hemivacuola de resorción, donde los protones digieren el componente mineral del hueso y la hidrolasa ácida predominantemente catepsina K (proteasa lisosomal) digiere la matriz orgánica (colágeno tipo I) (Chambers y Fuller, 2011). También se libera MMP-9 que degrada otros componentes orgánicos del hueso cuyos productos, son tomados por el osteoclasto y liberados en su superficie apical hacia la circulación.

Así, bombas de protones e hidrolasas, son insertadas en la superficie de la membrana formando una zona de sellado regulada por la integrina β 3 y de podosomas interconectados con filamentos de actina que concentran las enzimas y iones de hidrógeno en la zona de la resorción, formándose una hemivacuola de resorción entre la célula y el hueso, donde los protones digieren el componente mineral del hueso (Chambers y Fuller, 2011).

Los osteoclastos también secretan fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), dentro del espacio de sellado, donde su función es decalcificar hueso (Mensah *et al.*, 2009). El medio ácido creado por la secre-

ción de iones de hidrógeno y TRAP ayudan a movilizar el contenido mineral del hueso. Así, los osteoclastos se mueven a lo largo de las superficies del hueso aumentando las lagunas de resorción hasta que el proceso se haya completado (Boyce *et al.*, 2015).

En el contexto descrito, al entender y extrapolar la información que se tiene de humanos, es dable pensar que en equinos puede suceder algo similar en los procesos donde la excesiva actividad de OCs implica una resorción ósea patológica donde la evidencia demuestra que los OCs y células inmunes (Okamoto y Takayanagy, 2011) comparten una serie de moléculas moduladoras como citoquinas, receptores, moléculas de señalización y factores de transcripción que se influyen unos a otros.

Kim *et al.* (2015) estima que la proteína C reactiva puede jugar un importante rol en el proceso de destrucción ósea en artritis reumatoide a través de la inducción de la expresión de RANKL y una directa diferenciación de precursores de osteoclastos en osteoclastos maduros. Así, pacientes tratados con artritis reumatoide tienen posibilidad de reducir los niveles séricos de PCR puede prevenir la destrucción ósea (Kim *et al.*, 2015).

Recientemente, se encontró una mayor densidad de OCs en muestras de OA postraumática localizada en carpo de equinos de carrera comparadas con controles, los cuales de preferencia se localizaron en el plato subcondral y que RANKL correlacionaba positivamente con la degeneración del cartílago y la densidad de osteoclastos. Esto plantea que RANKL del cartílago puede tener un rol en el reclutamiento de osteoclastos y en el cartílago articular calcificado, lo que correlacionó con el número de microfracturas, sugiriendo que el reclutamiento de OCs por RANKL puede contribuir en la degeneración de cartílago articular calcificado (Bertuglia *et al.*, 2016).

También la alteración del paso de fluido entre el cartílago a través de la interfase hueso-cartílago, podría afectar el medio mecánico y químico promoviendo la progresión de la OA, sugiriendo que hay un aumento de la porosidad del plato subcondral, lo cual aumenta la interacción entre los compartimientos del hueso y del cartílago (Findlay y Kuliwaba, 2016).

En este contexto se ha logrado inhibir selectivamente catepsina K, logrando un promisorio potencial terapéutico en OA, específicamente en equinos que cursan con dolor óseo, e inflamación que resultan en excesiva resorción ósea y periostitis mediante un selectivo inhibidor VEL-O230 que disminuye la resorción ósea y aumenta la formación de biomarcadores óseos (Hussein *et al.*, 2017).

Por otra parte, la secreción de fosfatasa ácida resistente al tartrato, dentro del espacio de sellado, donde su función es decalcificar hueso (Mensah *et al.*, 2009), utilizando doxiciclina y eritromicina las cuales tiene efectos inhibidores de la resorción ósea en el saco alveolar de ratas, se encontró una expresión génica de RANKL significativamente disminuida y un menor número de células productoras de TRAP lo que implicó una menor actividad osteoclastogénica (Naghsh *et al.*, 2016).

También se ha establecido que la inhibición de las vías moleculares intracelulares por efectos directos de crocina sobre OCs *in vitro*, la osteoclastogénesis al ser suprimida, puede contribuir al desarrollo futuro de un tratamiento anti-resorción ósea (Fu *et al.*, 2016). Es así que, la supresión de la resorción ósea excesiva es una de las estrategias para tratar la enfermedad ósea, para lo cual la utilización de fumitremorgin C (micotoxina extraída de *Aspergillus fumigatus*) suprime las vías de señalización de RANKL (Yuan *et al.*, 2020).

Uso de Antiinflamatorios en Osteoartritis

En la práctica, el manejo clínico y terapéutico de la OA es diverso, donde la mayoría de los tratamientos convencionales consideran el uso de antiinflamatorios no esteroideos conducentes a disminuir la inflamación y las claudicaciones (Barton, 2016; Orsini *et al.*, 2012), y corticoides con el objetivo de mitigar el dolor, las alteraciones tisulares en el hueso subcondral, cartílago articular y membrana sinovial (Lacourt *et al.*, 2012; de Souza, 2016; McIlwraith y Lattermann, 2019) inducidos por la acción de IL-1, MMPs, agreganasas, PG_{E2} y radicales libres. Un seguimiento clínico comparativo en 80 equinos con claudicación, tres semanas pos-administración de triamcinolona intra-articular fue exitoso en un 87.8%, mientras que a los que se les administró triamcinolona con ácido hialurónico fue de 64.1% (de Grauw *et al.*, 2014).

La actividad antiinflamatoria de los corticoides resulta de la transcripción/trans-represión sobre al menos 200 genes y el mecanismo es la inducción de lipocortín que inhibe fosfolipasa 2, enzima responsable en la cascada del ácido hialurónico y, finalmente, la producción de mediadores proinflamatorios tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas (Cuming *et al.*, 2018). Por el contrario antiinflamatorios no esteroideos solo inhiben la vía ciclooxigenasa (Bentz, 2015).

Los esteroides, además son inhibidores importantes de la inflamación que actúan en la vía de señalización del factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$); sin embargo, su inhibición puede ser desfavorable porque este factor regula la expresión de genes inflamatorios y matriz extracelular (expresión de colágeno tipo II y agregano) (de Souza, 2016). Es así que el medir la expresión génica utilizando métodos farmacogenómicos se proporciona una evaluación más global de todas las respuestas farmacodinámicas después de una administración intraarticular de corticoides (McIlwraith, 2011).

En humanos, la terapia crónica con corticoides es conocida como una de las mayores causas de osteoporosis (Neve *et al.*, 2011) al inhibir la proliferación y actividad de osteoblastos, incrementando su apoptosis junto a la de osteocitos. Además, incrementan la expresión de RANKL, la diferenciación y proliferación de osteoclastos y disminuyen la síntesis de OPG (Liu y Zhang, 2015).

Los corticoides que se utilizan vía intraarticular con mayor frecuencia son triamcinolona, dexametasona, metilprednisolona, betametasona y prednisolona (de Souza, 2016), que se recomiendan con base a los efectos directos sobre el dolor, como en la liberación de IL-1, metaloproteinasas, agreganasas, prostaglandinas E2 (PGE_2) y radicales libres que pueden ser conducentes a la degradación del cartílago articular y consecuente OA (McIlwraith, 2011). En este contexto, Whitton *et al.* (2014) describen que un 47% de los caballos a los cuales se les administró corticoides en carpo presentaron lesiones pos-administración, y Smith *et al.* (2018) describen que de 1488 caballos que recibieron medicamentos intra-articulares en un periodo de cinco años en 8692 espacios intraarticulares tratados en 3925 sesiones, ocurrieron 96 fracturas dentro de los primeros 56 días de tratamiento.

El beneficio animal *in vivo* de triamcinolona ocurre a dosis usualmente de 8-12 mg como dosis total para el crecimiento de células y recuperación del daño (Wernecke *et al.*, 2015). Por otra parte, de Souza (2016) describe dosis condroprotectivas de 6-18 mg en articulaciones altamente móviles.

Las evidencias han demostrado lo descrito como «artropatía esteroidea», caracterizada por inestabilidad articular, disminución del espacio articular, crepitación, osteonecrosis con mayor incidencia de lesiones en caballos de carrera, (Bentz, 2015).

En casos humanos, donde se ha utilizado triamcinolona acetona de liberación prolongada intraarticular en el manejo del dolor de rodilla permite una larga presencia en sinovia, produce bajos niveles de glucosa sanguínea, disminuye el dolor en los pacientes y es generalmente bien tolerada (Paik *et al.*, 2019). Además del alivio del dolor, hay una mejora funcional mediante una dosis intraarticular de 40 mg (Borkar *et al.*, 2018) de preferencia a dosis bajas (Bentz, 2015). Sin embargo, los glucocorticoides al disminuir la actividad de los osteoblastos inducen una pérdida ósea condicionando una osteoporosis secundaria, acción mediada en parte por la PTH y 1,25 OH colecalciferol (Neyro *et al.*, 2011). Para evitar múltiples administraciones y riesgos desbalances hormonales, se han utilizado microesferas de una plataforma de poliéster cargada con triamcinolona acetona (Rudnik-Jansen *et al.*, 2017).

Como alternativas complementarias en equinos se utiliza ácido hialurónico, parcialmente responsable de la lubricación y viscoelasticidad del fluido sinovial, cuyo peso molecular disminuye con la edad (Gupta *et al.*, 2019) y en tratamientos no quirúrgicos (Ariyoshi *et al.*, 2014). Una combinación de N-acetil D-glucosamina y condroitín sulfato de sodio utilizando un modelo equino resultó en una mejora de 16% en el dolor clínico basado en scores de claudicación. En este modelo, la reducción clínica en claudicación con acetidrona acetona fue de 56% (Frisbie *et al.*, 2013).

El uso de terapias regenerativas, basadas en plasma rico en plaquetas (McCarrel y Fortier, 2009; Sundman *et al.*, 2011), células madre o suero autólogo, presentan resultados controversiales en su utilización (Frisbie, 2011; Monteiro *et al.*, 2015) debido a la escasa casuística clínica y ausencia de publicaciones relacionadas con el tratamiento de la enfermedad articular en equinos (Fortier, 2011). En humanos se describe algo similar (Grassel y Lorenz, 2014).

En modelo equino, se han provocado defectos de 15 mm en la patela aplicándose células madre embebidas en fibrina autóloga, encontrándose en las biopsias a los 30 días posteriores un aumento de colágeno tipo II (Grassel y Lorenz, 2014). McIlwraith *et al.* (2012) solo mostraron un cambio significativo en los niveles de PG_{E2} en el líquido sinovial, lo que no fue considerado suficiente para recomendar su uso en OA. También se ha evaluado el uso de Stanozolol en 60 equinos con OA con resultados positivos, obteniéndose 82% de mejoría en casos agudos y crónicos (Spadari *et al.*, 2015).

El uso de Tiludronato o Clodronato bifosfonatos no nitrogenados, que se unen a los cristales de fosfato de calcio inhibiendo la resorción ósea (Xie *et al.*, 2019), son devueltos a circulación por resorción osteoclástica para finalmente adherirse nuevamente al hueso en un proceso llamado «reattachment» (Soto y Chiappe, 2014). En casos de enfermedad navicular, disminuye los signos de claudicación (Dusterdieck-Zellmer, 2018). La medicación con bisfosfonatos en caballos de carrera jóvenes y adultos es materia de discusión debido a que esas moléculas se mantienen unidas a la matriz mineralizada del hueso, pudiendo interferir con su crecimiento, adaptación al ejercicio y la reparación del microdaño del hueso (Gilday *et al.*, 2020).

Otra opción es el suero autólogo de proteína antagonista del receptor de IL-1 (IRAP), donde IRAP II está siendo evaluado (Monteiro *et al.*, 2015). IRAP e IRAP II tienen significativas concentraciones para el receptor de la citoquina inflamatoria (IL-1 Ra) y de los factores de crecimiento IGF-1 y TGF-B (McIlwraith, 2015).

Nakashima *et al.* (2012) consideran que terapias anti-RANKL son beneficiosas en la inhibición de la pérdida de hueso sin afectar el sistema inmune en ensayos clínicos en el modelo animal con OA. Así, se describe que ratones deficientes en RANKL son resistentes

tes a la pérdida de hueso inducida por la inflamación. A futuro, las posibilidades de recuperación articular y obtener la capacidad de respuesta a un tratamiento, RANKL y su receptor RANK bloqueando RANKL, se inhibe la vía de NF- κ B disminuyendo la inflamación (Hamoudi *et al.*, 2019). Por otra parte, Chen *et al.* (2019) estiman que los niveles séricos de OPG y RANKL también pueden ser usados como potenciales biomarcadores.

Facilitar el diagnóstico precoz de OA puede ser crítico en el tratamiento y progresión de la enfermedad (Kamm *et al.*, 2013), evitando alteraciones metabólicas del tejido articular, ofreciendo una anticipada información de utilidad en la clínica equina (Chávez *et al.*, 2010) y podría ser un medio ideal de monitoreo del progreso o control del cuadro articular. En este contexto, la inhibición selectiva de Cathepsina K también tiene un potencial terapéutico en la pérdida de hueso e inflamación en los casos de osteoartritis (Hussein *et al.*, 2017).

En la actualidad, el uso de biomarcadores son un desafío para identificar el daño articular precoz, medición que se pueda realizar en sangre, suero, plasma, orina o fluido sinovial. Sin embargo no hay un biomarcador conocido de alta precisión que indique el grado de enfermedad del cartílago y hueso en una articulación (Stefaniuk-Szmukier *et al.*, 2019).

Independiente de las investigaciones realizadas al respecto, la evaluación de RANKL *in vivo* como activador de la diferenciación y activación de osteoclastos, se cuantificó por primera vez en líquido sinovial equinos fina sangre de carrera en la articulación carpal de caballos clínicamente sanos y con osteoartritis encontrándose diferencias significativas de los valores de RANKL en caballos sanos vs caballos con OA (De Negri *et al.*, 2019).

En este contexto, poder detectar daño articular en una etapa incipiente antes que los métodos convencionales, y su progresión, se podrían predecir a futuro las posibilidades de la recuperación articular y/o tener la capacidad de evaluar la respuesta a un tratamiento.

LITERATURA CITADA

1. **Abdelmagid SM, Barbe MF, Safadi FF. 2015.** Role of inflammation in the aging bones. *Life Sci* 123: 111-120. doi: 10.1016/j.lfs.2014.11.011
2. **Adamopoulos IE, Mellins ED. 2015.** Alternative pathways of osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 11: 189-194. doi: 10.1038/nrrheum.2014.198
3. **Al-Bari A, Al Mamun A. 2020.** Current advances in regulation of bone homeostasis. *FASEB Bioadv* 2: 668-679. doi: 10.1096/fba.2020-00058.
4. **Ariyoshi W, Okinaga T, Knudson CB, Knudson W, Nishihara T. 2014.** High molecular weight hyaluronic acid regulates osteoclast formation by inhibiting receptor activator of NF- κ B ligand through Rho kinase. *Osteoarthr Cartilage* 22: 111-120. doi: 10.1016/j.joca.2013.-10.013
5. **Asagiri M, Takayanagi H. 2007.** The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40: 251-264. doi: 10.1016/j.bone.2006.09.023
6. **Barton M. 2016.** Non-steroidal anti-inflammatories. In: *Equine clinical immunology*. Wiley Blackwell. p 213-230.
7. **Bentz B. 2015.** Equine pharmacology. In: Cole C, Bentz B, Maxwell L (eds). *Clinical pharmacology of the equine musculoskeletal system*. p 218-253
8. **Bertuglia A, Lacourt M, Girard C, Beauchamp G, Richard H, Laverty S. 2016.** Osteoclasts are recruited to the subchondral bone in naturally occurring

- post-traumatic equine carpal osteoarthritis and may contribute to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 24: 555-566. doi: 10.1016/j.joca.2015.10.008
9. **Borkar S, Bhise S, Raghute S, Thosar S and Godbole S. 2018.** Clinical outcome of single intra articular injection of triamcinolone acetonide depot preparation on knee osteoarthritis. *Int J Orthop Sci* 4: 161-163. doi: 10.22271/ortho.2018.-v4.i4c.28
 10. **Boyce B, Xiu Y, Li j, Xing L, Yao Z. 2015.** NF-KB-mediated regulation of osteoclastogenesis. *Endocrinol Metab* 30: 35-44. doi: 10.3803/EnM.2015.30.1.35
 11. **Caetano-Lopes J, Nery AM, Henriques R, Canhao H, Duarte J, Amaral PM. 2010.** Chronic arthritis induces quantitative and qualitative bone disturbances in the bone collagen network. *Arthritis Res Ther* 12: R9.
 12. **Caggiano N, Rolando J, Polli M, Perrone, Marino M, De Simone E, Chiappe MA. 2013.** Citokines, metalloproteinases and bisphosphonates: control keys for degenerative joint disease in horses. *REDVET* 14(7). [Internet]. Available in: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070713/071305.pdf>
 13. **Carmona J, Giraldo-Murillo. 2007.** Fisiopatología y tratamiento convencional de osteoartritis en el caballo. *Vet Zootec* 1: 60-73.
 14. **Chambers TJ, Fuller K. 2011.** How are osteoclasts induced to resorb bone? *Ann NY Acad Sci* 1240: 1-6. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06249.x
 15. **Chávez H, Araya O, Folch H, Morán G. 2010.** Uso de biomarcadores para el diagnóstico de enfermedad articular en el caballo. *Arch Med Vet* 42: 1-10. doi: 10.4067/S0301-732X2010000100002
 16. **Chen M, Hu X, Wu M, Yang J, Han R, Ma Y, Zhang X, et al. 2019.** Serum levels of *OPG*, *RANKL*, and *RANKL/OPG* ratio in patients with ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Immunol Invest* 48: 490-504. doi: 10.1080/08820139-2019.-1567531
 17. **Cuming RS, Groover ES, Wooldridge AA, Caldwell FJ. 2018.** Review of glucocorticoid therapy in horses. Part 1: Pharmacology. *Equine Vet Educ* 30: 141-150. doi: 10.1111/eve.12555
 18. **de Grauw JC, Visser-Meijer MC, Lashley F, Meeus P, van Weeren, PR. 2014.** Intra-articular treatment with triamcinolone compared with hyaluronate. A randomised open-label multicentre clinical trial in 80 lame horses. *Equine Vet J* 48: 152-158. doi: 10.1111/evj.12383
 19. **De Negri L, Olguín L, Pavez L. 2019.** Osteoartritis: cuantificación del ligando del receptor nuclear kappa-β (RANKL) en líquido sinovial de equinos Fina Sangre de Carrera. *Rev Inv Vet Perú* 30: 810-817. doi: 10.15381/rivep.v30i2.16084
 20. **De Negri L. 2006.** Manual de referencia en clínica de equinos. Santiago: Ed Universidad Mayor. 91 p.
 21. **De Simone E, Caggiano N, Polli M, Rolando J, Lastra Y, Gullace F, Ritacco E, et al. 2013.** Efecto del alendronato sobre el perfil de citoquinas y metalloproteinases 2 y 9 en un modelo murino de artritis experimental. *Rev Colomb Reumatol* 20: 202-210. doi: 10.1016/S0121-8123(13)70134-8
 22. **de Souza MV. 2016.** Osteoarthritis in horses - Part 2: a review of the intra-articular use of corticosteroids as a method of treatment. *Braz Arch Biol Techn* 59: e6150025. doi: 10.1590/1678-4324-2016150025
 23. **Dusterdieck-Zellmer KF. 2018.** Use of bisphosphonates in horses-a review. *Tierarztl Prax G N* 46: 323-333. doi: 10.15653/TPG-170804.13.
 24. **Findlay DM, Kuliwaba JS. 2016.** Bone-cartilage: crosstalk: a conversation for understanding osteoarthritis. *Bone Res* 4: 16028. doi: 10.1038/boneres.-2016.28
 25. **Fortier L. 2011.** Maintaining cartilage integrity. In: *Proc 50th British Equine Veterinary Association Congress*. UK.

26. **Frisbie DD, McIlwraith CW, Kawcak CE, Werpy NM. 2013.** Evaluation of intra-articular hyluronan, sodium chondroitin sulfate and N-acetyl-D-glucosamine combined versus saline (0,9% Na Cl) for osteoarthritis using an equine model. *Vet J* 197: 824-829. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.05.033
27. **Frisbie D. 2012.** Synovial joint biology and pathobiology. In: Auer JA, Stick JA (eds). *Equine surgery*. 4th ed. WB Saunders. p 1096-1114.
28. **Frisbie D. 2011.** Stem cells for equine joint disease. In: American Association of Equine Practitioners – AAEP Proceedings. USA.
29. **Fu L, Pan F, Jiao Y. 2016.** Crocin inhibits RANKL-induced osteoclast formation and bone resorption by suppressing NF-kB signaling pathway activation. *Immunobiology* 222: 597-603. doi: 10.1016/j.imbio.2016.11.009
30. **Gao Y, Li T, Sun Q, Ye C, Guo M, Chen Z, Chen J, Huo B. 2019.** Migration and differentiation of osteoclast precursors under gradient fluid shear stress. *Biomech Model Mechan* 18: 1731-1744. doi: 10.1007/s10237-019-01171-z
31. **Gilday R, Richard H, Beauchamp G, Fogarty U, Laverty S. 2020.** Abundant osteoclasts in the subchondral bone of the juvenile Thoroughbred metacarpus suggest an important role in joint maturation. *Equine Vet J* 52: 733-742. doi: 10.1111/evj.13235
32. **Goodrich L, Nelson B. 2013.** Joint disease treatment. In: 13th International Congress of World Equine Veterinary Association. Budapest, Hungary.
33. **Grassel S, Lorenz J. 2014.** Tissue-engineering strategies to repair chondral and osteochondral tissue in osteoarthritis: use of mesenchymal stem cells. *Curr Rheumatol Rep* 16: 452. doi: 10.1007/s11926-014-0452-5
34. **Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. 2019.** Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory. *Front Vet Sci* 6: 192. doi: 10.3389/fvets.2019.00192
35. **Hayden MS, Gosh S. 2008.** Shared principles in NF-kappB signaling. *Cell* 132: 344-362. doi:10.1016/j.01.020
36. **Hamoudi D, Marcadet L, Piette AB, Yagita H, Bouredji Z, Argaw A, Frenette J. 2019.** An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice. *Hum Mol Genet* 18: 3101-3112. doi: 10.1093/hmg/ddz124
37. **Hong J, Park I, Kim H. 2020.** Understanding the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of arthritis pain using animal models. *Int J Mol Sci* 21: 533. doi: 10.3390/ijms21020533
38. **Hussein H, Dulin J, Smanik L, Drost W, Russell D, Wellman M, Bertone A. 2017.** Repeated oral administration of a cathepsin K inhibitor significantly suppresses bone resorption in exercising horses with evidence of increased bone formation and maintained bone turnover. *J Vet Pharmacol Ther* 40: 327-334. doi: 10.1111/jvp.12368
39. **Izquierdo E, Pablos JL. 2013.** Fibroblastos sinoviales. *Semin Fund Esp Reumatol* 14: 121-128. doi: 10.1016/j.semreu.2013.06.001
40. **Kamm JL, Frisbie DD, McIlwraith CW, Orr KE. 2013.** Gene biomarkers in peripheral white blood cells of horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* 74: 115-121. doi: 10.2460/ajvr.74.1.115
41. **Kim KW, Kim BM, Moon HW, Lee SH, Kim HR. 2015.** Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 17: 41. doi: 10.1186/s13075-015-0563-z
42. **Lacourt M, Gao C, Li A, Girard C, Beauchamp G, Henderson JE, Laverty S. 2012.** Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 20: 572-583. doi: 10.1016/j.joca.2012.02.004.

43. **Levaot N, Ottolenghi A, Mann M, Guterman-Rama G, Kamc Z, Geiger B. 2015.** Osteoclast fusion is initiated by a small subset of RANKL-stimulated monocyted progenitors, which can fuse to RANKL-unstimulated progenitors. *Bone* 79: 21-28. doi: 10.1016/j.bone.2015.05.021
44. **Li CH, Xu LL, Zhao JX, Sun L, Yao ZQ, Deng XL, Liu R, et al. 2016.** CXCL16 upregulates RANKL expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the JAK2/STAT3 and p38/MAPK signaling pathway. *Inflamm Res* 65: 193-202. doi: 10.1007/s00011-015-0905-y
45. **Liu Wei, Zhang X. 2015.** Receptor activator of nuclear factor KB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol Med Rep* 11: 3212-3218. doi: 10.3892/mmr.2015.3152
46. **McCarrel T, Fortier LA. 2009.** Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res* 27: 1033-1042. doi: 10.1002/jor.20853
47. **MacKinnon MC, Bonder D, Boston RC, Ross MW. 2014.** Analysis of stress fractures associated with lameness in Thoroughbred flat racehorses training on different track surfaces undergoing nuclear scintigraphic examination. *Equine Vet J* 47: 296-301. doi: 10.1111/evj.12285
48. **Martig S, Chen W, Lee PV, Whitton RC. 2014.** Bone fatigue and its implications for injuries in racehorses. *Equine Vet J* 46: 408-415. doi: 10.1111/evj.12241
49. **McIlwraith CW, Lattermann C. 2019.** Intra-articular corticosteroids for knee pain-what have we learned from the equine athlete and current best practice. *J Knee Surg* 32: 9-25. doi: 10.1055/s-0038-1676449
50. **McIlwraith CW. 2015.** New biologic therapies for joint disease. In: Proc Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practitioners AAEP. Hawaii, USA.
51. **McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. 2012.** The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res* 1: 297-309. doi: 10.1302/2046-3758.111.2000132
52. **McIlwraith CW. 2011.** Use of corticosteroids. In: Proc of the American Association of Equine Practitioners AAEP. Oklahoma City, USA.
53. **McIlwraith CW. 2009.** Advances in the diagnosis of joint disease. In: Proc XI International Congress of World Equine Veterinary Association. Guarujá, SP, Brazil.
54. **Mensah KA, Li J, Schwarz EM. 2009.** The emerging field of osteoimmunology. *Immunol Res* 45: 100-113. doi: 10.1007/s12026-009-8093-x
55. **Milner P. 2011.** Cartilage imaging - what the future holds. In: Proc 50th British Equine Veterinary Association Congress. UK
56. **Monteiro S, Bettencourt E, Lepage O. 2015.** Biologic strategies for intra-articular treatment and cartilage repair. *J Equine Vet Sci* 3: 175-190. doi: 10.1016/j.jevs.2015.01.006
57. **Morita M, Yoshida S, Iwasaki R, Yasui T, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, et al. 2016.** Smad 4 is required to inhibit osteoclastogenesis and maintain bone mass. *Sci Rep* 6: 35221. doi: 10.1038/srep35221
58. **Naghsh N, Mohammad S, Minaiyan M, Shahabooei, Birang R, Behfarnia P, Hajisadeghi S. 2016.** Evaluation of the effects of two different bone resorption inhibitors on osteoclast number and activity: an animal study. *Dent Res J* 13: 500-507.
59. **Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. 2012.** New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrin Met* 23: 582-590. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.005
60. **Neve A, Corrado A, Cantatore F. 2011.** Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 343: 289-302.

61. **Neyro JL, Cano A, Palacios S. 2011.** Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Rev Osteoporos Metab Miner* 3: 105-112.
62. **Ng Kong W, Martin T. 2012.** Glucocorticoids, inflammation and bone. In: *Bone-metabolic functions and modulators*. Springer Science. p 113-120.
63. **Novakofski K, Berg L, Bronzini I, Bonnevie E, Poland S, Bonassar L, Fortier L. 2015.** Joint-dependent response to impact and implications for post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 23: 1130-1137. doi: 10.1016/j.joca.2015.02.023
64. **O'Brien C, Nakashima T, Takayanagi H. 2013.** Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone* June 54: 258-263. doi: 10.1016/j.bone.2012.08.121
65. **Okamoto K, Takayanagi H. 2011.** Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Res Ther* 13: 219. doi: 10.1186/ar3323
66. **Orsini JA, Ryan WG, Carithers DS, Boston RC. 2012.** Evaluation of oral administration of firocoxib for the management of musculoskeletal pain and lameness associated with osteoarthritis in horses. *Am J Vet Res* 73: 664-671. doi: 10.2460/ajvr.73.5.664
67. **Paik J, Duggan ST, Keam SJ. 2019.** Triamcinolone acetate extended-release: a review in osteoarthritis pain of the knee. *Drugs* 79: 455-462. doi: 10.1007/s40265-019-01083-3
68. **Polli M, Caggiano N, Rolando J, Perrone G, Marino M, De Simone E, Chiappe B. 2013.** Variación del nivel de citoquinas en líquido sinovial de equinos con enfermedad articular tratados con bisfosfonatos. *Rev Complut Cienc Vet* 7: 69-83.
69. **Reed SR, Jackson BF, McIlwraith CW, Wright IM, Pilsworth R, Knapp S, Wood JL, et al. 2012.** Descriptive epidemiology of joint injuries in Thoroughbred racehorses in training. *Equine Vet J* 44: 13-19. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00352
70. **Riancho JA, Delgado-Calle J. 2011.** Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatol Clín* 7: 1-4. doi: 10.1016/j.reuma.2011.03.003
71. **Ross TN, Kisiday JD, Hess T, McIlwraith CW. 2012.** Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. *Osteoarthr Cartilage* 20: 1583-1590. doi: 10.1016/j.joca.2012.08.008
72. **Rudnik-Jansen I, Colen S, Berard J, Plomp S, Que I, van Rijen M, Woike N, et al. 2017.** Prolonged inhibition of the inflammation in osteoarthritis by triamcinolone acetate released from polyester amide microsphere platform. *J Control Release* 253: 64-72. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.014
73. **Ruscitti P, Cipriani P, Carubbi F, Liakouli V, Di Benedetto P, Berardicurti O, et al. 2015.** The role of IL-1 β in the bone loss during rheumatizing diseases. *Mediat Inflamm* 2015: 782382. doi: 10.1155/2015/782382
74. **Singer H. 2013.** Some aspects of the pathophysiology of subchondral bone injury of the fetlock joint. In: *Proc British Equine Veterinary Association Congress*. UK.
75. **Smith LCR, Wylie CE, Palmer L, Ramzam PHL. 2018.** A longitudinal study of fractures in 1488 thoroughbred racehorses receiving intrasynovial medication: 2006-2011. *Equine Vet J* 50: 774-780. doi: 10.1111/evj.12833
76. **Soto S, Chiappe A. 2014.** Biphosphonates: pharmacology and clinical approach and their use in equine osteoarticular diseases. *J Equine Vet Sci* 34: 727-737. doi: 10.1016/j.jevs.2014.01.009
77. **Spadari A, Rinnovati R, Babbini S, Romagnoli N. 2015.** Clinical evaluation of intra-articular administration of stanozolol to manage lameness associated with acute and chronic osteoarthritis in horses. *J Equine Vet Sci* 35: 105-110. doi: 10.1016/j.jevs.2014.12.003

78. **Stefaniuk-Szmukier M, Ropka-Molik K, Piórkowska K. 2019.** The expression profile of genes involved in osteoclastogenesis detected in whole blood of Arabian horses during 3 years of competing at racetrack. *Res Vet Sci* 123: 59-64. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.12.013
79. **Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. 2011.** Growth factor and catabolic cytokine concentrations in platelets rich plasma. *Am J Sport Med* 39: 2135-2140. doi: 10.1177/0363546511417792.
80. **Takayanagi H. 2007.** Osteoimmunology: shared mechanism and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7: 292-304.
81. **Tanaka S. 2017.** RANKL-Independent osteoclastogenesis: a long-standing controversy. *J Bone Miner Res* 32: 431-433. doi: 10.1002/jbmr.3092.
82. **Wernecke C, Braun HJ, Dragoo JL. 2015.** The effect of intra-articular corticosteroids on articular cartilage: a systematic review. *Orthop J Sports Med* 3: 2325967115581163. doi: 10.1177/2325967115581163
83. **Whitton RC, Jackson MA, Campbell AJ, Anderson GA, Parkin TD, Morton JM, Boden LA. 2014.** Musculoskeletal injury following local corticosteroid injection in Thoroughbred racehorses. *Vet J* 200: 71-76. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.09.003
84. **Xie J, Huang Z, Yu X, Zhou L, Pei F. 2019.** Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee. *Cytokine Growth Factor Rev* 46: 36-44. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.03.004
85. **Yuan Y, Chen K, Chen X, Wang C, Qiu H, Cao Z, Song D, Sun Y, Guo J, Tickner J, Xu J, Zou J. 2020.** Fumitremorgin C attenuates osteoclast formation and function via suppressing RANKL-induced signaling pathways. *Front Pharmacol* 11: 238. doi: 10.3389/fphar.2020.00238
86. **Zarka M, Hay E, Ostertag A, Marty C, Chappard C, Oudet F, Engelke K, et al. 2019.** Microcracks in subchondral bone plate is linked to less cartilage damage. *Bone* 123: 1-7. doi: 10.1016/j.bone.2019.03.011
87. **Zupan J, Jeras M, Marc J. 2013.** Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Medica* 23: 43-63. doi: 10.11613/BM.2013.007