



*Universidad de Buenos Aires*



Facultad de Ciencias  
**VETERINARIAS**  
Universidad de Buenos Aires

Tesis para aspirar al título de “Magister de la Universidad de Buenos Aires  
en Medicina Deportiva del Equino”

**DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOARTRITIS EN EL EQUINO  
RELACIÓN ENTRE SIGNOS CLINICOS Y BIOMARCADORES  
PROINFLAMATORIOS EN EL LIQUIDO SINOVIAL**

**Laboratorio de Metabolismo Óseo y Mineral. Cátedra de Fisiología  
Animal  
Facultad de Ciencias Veterinaria, UBA**

**Autor: Gustavo Mario Perrone, MV, M Sc**

**Directora: Angelina Chiappe Barbará, Doctora de la Universidad de Buenos Aires**

**Codirector: Emilio De Simone. Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**2016**

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento:

A la Dra. Angelina Chicape Barbará, mi directora y su equipo. Con sus ideas y su guía fue posible llevar a cabo este proyecto.

A mi familia, que soporto mis horas de estudio y trabajo frente a la computadora

## INDICE TEMATICO

1. RESUMEN .....	6
2. ABSTRACT .....	16
3. INTRODUCCION .....	25
3. 1. Fisiopatología de la osteoartritis .....	25
3. 2. Diagnostico de la osteoartritis.....	29
3. 2. 3. Biomarcadores sinoviales .....	34
4. HIPOTESIS GENERAL .....	37
5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS.....	37
5. 1. General .....	37
5. 2. Específicos.....	37
6. MATERIALES Y METODOS .....	37
6. 3. Análisis estadístico .....	39
7. RESULTADOS .....	39
Clínico General .....	40
Clínico Particular .....	40
Definición del índice clínico utilizado.....	40
A) Grado de Claudicación:.....	40
B) Análisis macroscópico del líquido sinovial .....	40
C) Grado de alteración del perfil articular.....	41
8. DISCUSION .....	45
9. CONCLUSIONES.....	54
10. BIBLIOGRAFIA .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

1. Fig. 1. Ruta de la degradación del cartílago articular secundaria al trauma articular.....	23
2. Fig. 2. Fisiopatología del trauma articular.....	25
3. Cuadro 1. Biomarcadores del metabolismo articular osteocondral utilizados para el diagnóstico de enfermedad articular en equinos .....	31
4. Tabla 1. Valores de referencia (valor medio $\pm$ SD) de citoquinas (pg/ml) y MMP-2 y MMP-9 (% de un control interno) según edad y estado clínico.....	38
5. Fig. 3. Actividad media de MMP 9 y valores medios de IL-4.....	40
6. Tabla 2. Proteínas totales, albúminas y urea de animales sanos y enfermos.....	41

## ABREVIATURAS

**AAEP:** American Association of Equine Practitioner

**BMs:** Biomarcadores

**FO:** Fragmento osteocondral

**ICRS:** International Cartilage Repair Society

**IGF1:** Factores de crecimientos similares a insulina

**IKDC:** International Knee Documentation Committee

**IL-1  $\beta$ :** Interleuquina 1  $\beta$

**IL-4:** Interleuquina 4

**IL-6:** Interleuquina 6

**MEC:** Matriz extracelular

**MMPs:** Metaloproteinasas

**OA:** osteoartritis

**OARSI:** Osteoarthritis Research Society International

**OC:** Osteocondritis

**OCD:** Osteocondrosis disecante

**PCR:** Proteína C reactiva

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TIMs:** Inhibidores tisulaes de metaloproteinasas

**VAS:** Escala Análoga Visual (en inglés)

**WOMAC:** Indice Western Ontario y Mc Master Universities

## 1. RESUMEN

La enfermedad articular degenerativa u osteoartritis (OA) es la enfermedad articular más frecuente en el caballo y es considerada a nivel internacional como responsable del 60 % de las claudicaciones del equino deportivo.

En los deportes en los cuales la vida útil del equino es prolongada, es frecuente observar formas crónicas de esta enfermedad debidas al fracaso del cartílago articular para soportar el trauma cíclico de la actividad deportiva, sumado a los cambios propios de la edad. En animales jóvenes, las lesiones reiteradas pueden llevar al caballo al retiro de la competencia aún a edades relativamente tempranas.

Este trauma repetido, producto de la competencia deportiva, produce sinovitis y capsulitis, daño a ligamentos colaterales, fracturas intra articulares y lesión del hueso subcondral. Estos procesos llevan a las manifestaciones clínicas de la OA, tanto agudas o crónicas con reagudizaciones recidivantes características de esta enfermedad.

La OA puede ser definida como una enfermedad progresiva, degenerativa que se caracteriza por una pérdida del cartílago articular, eburnificación del hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial y aumento del líquido sinovial. Los procesos inflamatorios resultantes producen citoquinas proinflamatorias que activan metaloproteinasas (MMPs) que a su vez retroalimentan el proceso por destrucción de la matriz extracelular cartilaginosa (MEC).

El diagnóstico de la OA se basa en la semiología clínica y en métodos complementarios. En el diagnóstico clínico es de fundamental importancia la descripción estandarizada de los síntomas de una enfermedad, así como los signos de su evolución o progresión en el tiempo para unificar los criterios de diagnóstico entre los profesionales, para determinar el tipo y el nivel de gravedad de la misma, para definir las pautas de inclusión de los pacientes en trabajos de investigación, para caracterizar los modelos animales utilizados en la investigación de enfermedades que afectan al ser humano y finalmente, para poder cuantificar estadísticamente los progresos, los éxitos y los fracasos en los tratamientos.

En Medicina Humana se describen varios índices para evaluar a la OA desarrollados por organizaciones como el International Knee Documentation Committee (IKDC) y la International Cartilage Repair Society (ICRS). Estos índices incluyen evaluaciones subjetivas, con

participación del paciente, objetivas, realizadas por exámenes clínicos y complementarios, e índices que incluyen ambos tipos de evaluaciones.

En Medicina Veterinaria, la colaboración del paciente en la anamnesis es nula y la del responsable del animal puede ser incompleta o poco confiable. Por lo tanto, la elaboración de índices está basada fundamentalmente en las observaciones realizadas por el médico veterinario.

Nuestro grupo de trabajo desarrollo un índice clínico para evaluar la articulación tarso astragalina que incluye el índice de la AAEP modificado, las maniobras de palpación presión y flexión forzada, la observación del perfil articular y del grado de hidrartrosis y las características físicas del líquido sinovial.

En el análisis tradicional del líquido sinovial se ha utilizado la medición de enzimas (AST, LDH, FA), proteínas totales, urea y el recuento de leucocitos. A partir del descubrimiento de nuevos biomarcadores (BMs) y de sus efectores en la cascada inflamatoria, se han comenzado a estudiar su aplicación en el diagnóstico precoz de la OA, el desarrollo de nuevos tratamientos y el seguimiento de los mismos.

Un BM es un indicador molecular, directo o indirecto, de recambio anormal del tejido articular, que corresponde a un componente normal o a un subproducto de los procesos metabólicos del tejido articular.

Dentro de los BM indirectos se incluyen las citoquinas y las MMPs. Las citoquinas son proteínas de comunicación celular, secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a la presencia de distintos antígenos. Estas citoquinas median los procesos fisiológicos de las células inmunitarias y del tejido óseo y cartilaginoso y estimulan distintas respuestas defensivas e inflamatorias, tanto a nivel local (articular) como sistémico. En las afecciones articulares, se consideran de importancia al factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), las interleuquinas 1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), 4 (IL-4) y 6 (IL-6), presentes en el líquido sinovial pero en niveles diferentes en los animales sanos y en aquellos que presentan signos clínicos de OA

Las MMPs que tienen valor diagnóstico en la OA son, fundamentalmente, la MMPs 2 y 9, las cuales son gelatinasas, zinc y calcio dependientes, que participan en el recambio fisiológico y patológico de la MEC del cartílago, degradándola en los procesos de OA. Cuando existe un recambio óseo fisiológico, la liberación por parte de condrocitos, células sinoviales y fibroblastos

de TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$ , produce una respuesta de los osteoblastos que aumenta su producción de MMPs dentro de un rango de normalidad. La expresión de estas enzimas está altamente controlada por inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMs)

Esta tesis plantea como hipótesis general que, en los equinos, las modificaciones de los marcadores biológicos del líquido sinovial, en las fases iniciales o tempranas de la OA, anteceden a la presentación de signos clínicos manifiestos y radiológicos. Además, es factible observar modificaciones bioquímicas en los periodos de remisión de la enfermedad.

Sus objetivos son:

- Analizar el valor diagnóstico de los biomarcadores moleculares del líquido sinovial como predictores tempranos de la manifestación clínica de la osteoartritis y en el seguimiento de su evolución.
- Determinar si existe una interrelación temporal entre el diagnóstico clínico y el análisis bioquímico del líquido sinovial, en equinos con y sin signos clínicos de OA.
- Establecer un índice clínico que permita el diagnóstico y seguimiento de la evolución de la enfermedad en sus distintas fases.
- Evaluar si existe una relación entre la presencia o ausencia de signos clínicos y los cambios bioquímicos tempranos en el líquido sinovial.

Para establecer valores de índice clínico poblacional, se trabajo con 123 equinos de salto y SPC tomados al azar de edades comprendidas entre 1 y 28 años.

De este grupo inicial, se tomaron tres grupos de animales en función de su categoría etaria, para obtener valores de referencia de citoquinas y MMPs con el objetivo de caracterizar el perfil de estos biomarcadores en el líquido sinovial de equinos normales de distintas edades y en equinos con signos clínicos de OA.

Los grupos fueron: i) potrillos sanos entre 1 y 2 años (n=21), ii) adultos con edad entre 3 y 14 años (n=84) sanos y con grados variables de enfermedad articular y iii) Adultos mayores a 15 años normales pero con problemas articulares por envejecimiento (n=18).

A todos se le efectuó un examen clínico general y particular enfocado en los tarsos (articulación tibio astragalina) de ambos miembros posteriores, y se les extrajo líquido sinovial de ambos tarsos.



En el líquido sinovial, se determinaron IL-1  $\beta$ , IL-4 IL-6, TNF- $\alpha$ , MMPs 2 y 9, Proteína C reactiva (PCR), proteínas totales, albúminas y urea.

A fin de cuantificar el examen clínico de la articulación, se desarrolló el siguiente índice clínico:

A) Grado de Claudicación:

0. No perceptible.

1. Difícil de observar y no siempre aparente (dolor a la flexión forzada).

2. Difícil de observar al paso o al trote en línea recta pero aparente en ciertas circunstancias de mayor esfuerzo (trabajo en círculo).

3. Observable al trote bajo toda circunstancia

- Sensibilidad a la palpación presión (de menor a mayor): 0 (-), 1 (+), 2 (++) y 3 (+++).

- Flexión Forzada: 0 (-), 1 (+), 2 (++) y 3 (+++).

B) *Análisis macroscópico del líquido sinovial*

- *Apreciación visual del volumen:* 0. No hay

0,5. Escaso (- de 2 ml)

1. Intermedio (de 2 a 10 ml)

1,5. Abundante (+ de 10 ml)

- *Color:*

0. Claro.

0,4. Blanquecino transparente.

0,8. Amarillo fuerte.

1,2. Sanguinolento.

1,6. Rojizo hemorrágico.

2. Sangre.

- *Turbidez*: si (1) / no (0)
- *Formación de "hilo" (estiramiento)*: 0,4: 5 cm.  
0,8: 3 cm.  
1,2: 1 cm.  
1,6: Coagula

### C) *Grado de alteración del perfil articular*

1. Normal.
2. Aumento del líquido extraído.
3. Hidartrrosis leve.
4. Hidartrrosis severa con o sin fibrosis de la cápsula.
5. Inflamación articular (aumento de tamaño, dolor y calor).

Al puntaje del índice clínico propuesto le corresponde un mínimo de 2,3 puntos (sin manifestación clínica) y un máximo de 20,1 puntos, considerado de máxima severidad.

A los efectos de evaluar el valor de los diferentes niveles de BMs en relación al índice clínico, se trabajó con los valores de referencia de citoquinas y MMPs en líquido sinovial establecidos previamente en nuestro laboratorio

Los resultados de la medición de las citoquinas (pg/ml) y MMPs (% de un control interno) se dividieron en 3 categorías etarias, potrillos, adultos y mayores de 15 años, debido a que los resultados de los animales jóvenes (IL-1  $\beta$ : 120.96  $\pm$  42.49<sup>a</sup>; IL-4: 6.10  $\pm$  1.43<sup>d, g</sup>; IL-6: 115.14  $\pm$  52.49; TNF- $\alpha$ : 41.42  $\pm$  13.64<sup>a</sup>; MMP-2: 140.47  $\pm$  61.98<sup>a</sup>; MMP-9: 55.45  $\pm$  58.17<sup>a, e</sup>) y mayores (IL-1  $\beta$ : 57.12  $\pm$  8.38; IL-4: 10.83  $\pm$  4.20<sup>c</sup>; IL-6: 134.21  $\pm$  45.24; TNF- $\alpha$ : 86.35  $\pm$  43.25<sup>e</sup>; MMP-2: 49.13  $\pm$  18.50; MMP-9: 8.28  $\pm$  7.63) presentaban un comportamiento diferencial con el grupo de adultos y los adultos, entre ellos.

En el grupo de animales adultos, en la mayoría de las variables estudiadas se observó una distribución claramente definida en grupos **bajo** (IL-1  $\beta$ : 37.37  $\pm$  12.25<sup>b</sup>; IL-4: 2.94  $\pm$  0.93<sup>a, d</sup>; IL-

6:  $62.68 \pm 25.16$ ; TNF- $\alpha$ :  $30.61 \pm 6.39$ ; MMP-2:  $63.23 \pm 25.61$ ; MMP-9:  $0.34 \pm 0.15$ ), **medio** (IL-1  $\beta$ :  $61.75 \pm 7.02$ ; IL-4:  $7.41 \pm 0.71$  <sup>d, g</sup>; IL-6:  $148.66 \pm 28.86$ ; TNF- $\alpha$ :  $46.45 \pm 10.94$ ; MMP-2:  $128.27 \pm 24.80$  <sup>f</sup>; MMP-9:  $11.19 \pm 3.96$ ) y **alto** (IL-1  $\beta$ :  $171.56 \pm 132.68$ ; IL-4:  $14.61 \pm 5.37$  <sup>g</sup>; IL-6:  $363.73 \pm 123.06$  <sup>e</sup>; TNF- $\alpha$ :  $108.71 \pm 50.39$  <sup>e</sup>; MMP-2:  $354.29 \pm 174.88$  <sup>e</sup>; MMP-9:  $85.95 \pm 47.97$  <sup>e</sup>). Sin embargo, en el caso del TNF- $\alpha$  y la IL-1  $\beta$  la distribución en tres grupos no fue tan marcada no encontrándose diferencia significativa entre los valores medios del grupo bajo y medio (<sup>a</sup> P < .001 vs. Adultos mayores; <sup>b</sup> P < .05 vs. Alto; <sup>c</sup> P < .01 vs. Alto; <sup>d</sup> P < .001 vs. Alto; <sup>e</sup> P < .001 vs. los otros grupos, <sup>f</sup> P < .05 vs. Adultos mayores; <sup>g</sup> P < .01 vs Adultos mayores).

Respecto a la IL-1  $\beta$  se observó que los potrillos sanos presentaban un valor más elevado que el resto de los otros grupos. El valor medio del grupo de potrillos fue superado, aunque no significativamente ( $p > 0.005$ ), por el grupo de adultos con valores elevados.

Finalmente, utilizando el índice clínico propuesto en 123 animales y en asociación con los resultados de los niveles de citoquinas y MMPs en el líquido sinovial se clasifico a la población en los siguientes rangos o categorías:

Grupo 1: **Potrillos** Equinos jóvenes entre uno y dos años, los cuales no presentaban alteraciones clínicas articulares, ni variaciones de los biomarcadores debido a OCD.

Grupo 2: **Basal**. Equinos adultos con **índice clínico no superior a 4**. Animales clínicamente sanos, sin alteraciones en los BMs articulares inflamatorios o con leves alteraciones de los mismos.

Grupo 3: Equinos adultos con **índice clínico 4-6** con leve sintomatología clínica de OA.  
**3a forma no activa** con disminución de IL-4  
**3b forma activa** con aumento de varios BMs.

Grupo 4: Equinos adultos con **índice clínico 6-10** con sintomatología de OA con/sin deformaciones articulares.  
**4a forma no activa** con leve aumento general de BMs  
**4b forma activa** con aumento de MMP 2, expresión de MMP9 y elevada la IL-6 y otros BMs.

Grupo 5: **Gerontes**. Equinos adultos mayores de 15 años. Síntomas crónicos de OA por envejecimiento, con aumento de algunos BM y disminución de otros, característicos del proceso de envejecimiento.

Una vez comprobada la respuesta de las diferentes citoquinas y MMPs en cuadros de OA en sus distintos estadios agudo, en período de remisión y crónico se efectuó la correlación de esos resultados con el índice clínico para validarlo y poder utilizarlo sistemáticamente en el diagnóstico clínico de la OA, al menos en las localizaciones tarsianas ( $r^2= 0.65$  para MMP 2 y  $r^2= 0.82$  para MMP 9).

Aparentemente, la modificación o elevación de las citoquinas y MMPs es un signo precoz que antecede a la alteración del índice clínico. Por otra parte en las diferentes categorías clínicas se observaron diferentes combinaciones siendo el descenso de la IL-4 un signo incipiente de alteración en el entorno articular. Por ejemplo, en los animales del grupo 4b, se observó un perfil característico, presente en un 30 % de los animales, caracterizado por IL-4 e IL-6 elevadas acompañadas de MMP 2 elevada. En el grupo basal y grupo 3b con citoquinas elevadas en un 25 % se presentó la asociación de IL-1  $\beta$  e IL-6 elevada pero con IL-4 normal o disminuida y MMP 2 normal. Y en los índices superiores más de 13 fue muy habitual encontrar la expresión de la MMP 9, ausente en el grupo Basal y valores de MMP 2 elevados.

El seguimiento de un paciente con OA implica contar con técnicas semiológicas estandarizadas que desarrollen un examen fijo, repetible y con resultados validados por medio de métodos complementarios correlacionados, como ser artroscopías, análisis de biomarcadores, entre otros.

Para lograr este objetivo, se debe contar con un índice que contemple la mayor parte de las observaciones anamnésticas y clínicas posibles.

En esta experiencia, hemos implementado un índice utilizando una combinación de índices clínicos que recibieron un valor numérico cuya suma resultó en un puntaje máximo de 20,1 y un corte mínimo de 2,3, considerándose este valor el correspondiente al índice clínico de un animal sin alteraciones clínicas.

Aparentemente, el índice clínico aumentado será el resultado de la alteración mecánica que la enfermedad articular produce. La evolución del índice clínico en la OA en general es un proceso

paulatino, a excepción de lo que ocurre en los casos de artritis aguda, este va aumentando a medida que la función fisiológica del cartílago articular y el hueso subcondral se va alterando con el tiempo de permanencia de la enfermedad activa. Y los periodos de remisión a medida que avanza la OA son cada vez son de más corta duración.

En el caso de los gerontes, se observaron índices clínicos superiores a 7, sin signos aparentes de OA, solo de envejecimiento, y en estos casos los valores en el índice clínico fueron muy difíciles de retrotraer no obstante observar descenso en los BMs.

Los BMs indirectos del metabolismo del cartílago, estudiados en esta experiencia, han sido las IL-1  $\beta$ , IL-4, IL-6, el TNF- $\alpha$  y las MMPs 2 y 9. La IL-1 y el TNF- $\alpha$  son liberados por la membrana sinovial y los condrocitos ante una sinovitis, producto del trauma articular. Ambas citoquinas se liberan en exceso y aumentan la tasa de degradación de proteoglicanos, disminuyen su síntesis o actúan en forma conjunta en ambos procesos. Esto se logra, en parte por la liberación de MMPs y prostaglandina E<sub>2</sub>.

La IL-6 puede ser producida por fibroblastos sinoviales y condrocitos articulares, inducida por la síntesis de IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$ . A su vez, la IL-6 estimula a nivel hepático la síntesis de proteínas de fase aguda como la PCR.

En los grupos clínicos de mayor grado, la IL-4 vuelve a aumentar a los niveles basales e incluso en algunos casos aumentar al doble del basal, pero en forma asociada con niveles elevados de IL-6. Por otra parte, pareciera observarse que los niveles elevados de biomarcadores se presentan más asiduamente en la categoría de mayor índice clínico y que, generalmente, comprenden a animales de mayor edad con alteraciones de mayor cronicidad.

Los resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo mostraron la ausencia de BMs en animales sanos o en periodos de remisión y su presencia en animales con OA activa. Sin embargo, nosotros hemos aportado el conocimiento que en animales con ausencia de síntomas clínicos es dable encontrar BMs elevados como indicador precoz de futuras OA.

El TNF- $\alpha$  es el principal mediador de la respuesta aguda que desencadena el proceso osteoartrítico. El aumento del TNF- $\alpha$  se produce en los primeros momentos del proceso inflamatorio, por lo que es muy probable no encontrarlo en niveles elevados en el líquido

sinovial. En nuestra experiencia, el TNF- $\alpha$  se encontró en poca cantidad de caballos tanto clínicamente sanos como en fase no activa de la OA. Por lo tanto, su valor radica en encontrarlo presente en niveles elevados para confirmar el proceso inflamatorio agudo.

Pero a la inversa, su ausencia no tiene valor diagnóstico para determinar la no existencia de la enfermedad. En este punto también es importante mencionar la relación existente entre TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$  ya que la liberación del TNF- $\alpha$  produce un aumento en la liberación de IL-1  $\beta$  y ésta tiene mayor capacidad de activación de los tipos celulares antes descritos para la liberación de MMPs.

La IL-1  $\beta$  se presentó elevada en los animales que se encontraban en fase activa de la OA como puede observarse en la sub clasificación “b” de las distintas categorías del índice clínico presentado en esta tesis. A su vez se debe considerar que para reducir la liberación de MMPs, habría que inhibir también la IL-6 porque se plantea un efecto redundante en el cual ante la ausencia de una, la otra llevaría a cabo las acciones, por lo tanto si se inhibe solamente una de las dos, la actividad enzimática no se vería reducida.

En equinos clínicamente sanos, pero con elevación de IL-6, dado que es una citoquina proinflamatoria se podría considerar que estos animales estaban en período de remisión o que ya existía una destrucción del cartílago articular.

Las MMPs 2 y 9 se encuentran aumentadas en proceso patológicos osteoarticulares, superando las concentraciones de TIMs. Sin embargo, la MMP 2 no presenta valores tan elevados como la MMP 9 en estos cuadros y puede considerarse que presenta una acción homeostática al remover el cartílago anormal o envejecido. Por otro lado, la MMP 9 o bien no se puede detectar en condiciones normales o se encuentra en valores basales muy bajos, aumentando notablemente en cuadros de OA, artritis sépticas de evolución lenta y artritis reumatoidea en el ser humano. Por lo tanto, según el perfil de MMPs presentes, se puede inferir que se está ante un cuadro de remodelación normal mediada por la MMP 2 o ante una intensa degradación del cartílago con expresión aumentada de la MMP 9.

En nuestros trabajos hemos observado valores bajos de MMP 2 y ausencia de MMP 9 en animales clínicamente sanos. En animales con OA en período activo, la MMP 2 aumentó significativamente ( $p < 0.001$ ) sobre los valores de referencia en equinos sanos. La MMP 9

aumentó levemente en equinos en fase de remisión no activa y en valores superiores en fase crónica de la enfermedad.

En conclusión, los equinos que presentaron sintomatología clínica compatible con OA, tuvieron alteraciones en los valores de citoquinas, MMPs y perfiles proteómicos en líquido sinovial, mientras aquellos libres de síntomas, presentaron valores compatibles con articulaciones normales. Sin embargo, animales sin síntomas clínicos evidentes o subclínicos presentaron alteraciones en el perfil de citoquinas y MMPs como un signo precoz de alteración del medio intraarticular o como indicador del estadio de remisión clínica.

El índice clínico presentó alta correlación con las modificaciones bioquímicas agudas, crónicas o recidivantes en equinos con OA o en equinos sin presencia de la enfermedad. Por lo tanto, este índice puede ser utilizado en el diagnóstico clínico de OA ya que los BMs sinoviales validan su evolución tanto positiva como negativa. De la misma manera, los BMs estudiados en esta experiencia pueden ser utilizados como métodos complementarios precoces en la detección, seguimiento y evolución terapéutica de OA.

Palabras Clave: osteoartritis, diagnóstico, índice clínico

## 2. ABSTRACT

Degenerative joint disease or osteoarthritis (OA) is the most frequent disease in the horse and it is considered, internationally, as responsible for 60% of the sport horse lameness problems.

In sports in which the horse life is prolonged, in addition to the changes of age chronic forms of the disease due to the failure of the cartilage joint to withstand cyclical sport trauma are frequently observed. In young animals, the repeated injuries can lead to the removal of the horse from competition, even at relatively early ages.

This repeated trauma, product of the sports competition, produces synovitis and capsulitis, damage to collateral ligaments, intra articular fractures and subchondral bone lesions. These processes lead to the clinical manifestations of OA, either acute or chronic with recurrent relapses characteristic of this disease.

OA can be defined as a progressive, degenerative disease that is characterized by a loss of cartilage joint, subchondral bone eburnification and inflammation of the synovial membrane and synovial fluid increased. The resulting inflammatory processes produce proinflammatory cytokines that activate matrix metalloproteinases (MMPs) which in turn feedback the process by destruction of cartilage extracellular matrix (CEM).

The diagnosis of OA is based on the clinical semiology and complementary methods. In the clinical diagnosis is of fundamental importance the standardized description of the symptoms of a disease, as well as signs of their evolution or progression in time to unify the criteria of diagnosis among professionals, to determine the type and severity of the disease, to define guidelines for the inclusion of patients in research trials, to characterize the animal models used in the research of diseases affecting human beings and finally, for statistically quantify the progress, successes and failures in the treatments.

Several scores for evaluating OA developed by organizations such as the International Knee Documentation Committee (IKDC) and the International Cartilage Repair Society (ICRS) are described in human medicine. These scores include subjective assessments, with participation of the patient, objective, carried out by clinical and complementary examinations, and scores



that include both types of evaluations. In veterinary medicine, the collaboration of the patient in the anamnesis is null and that obtained from the person in charge of the animal can be incomplete or unreliable. Therefore the preparation of scores is fundamentally based on the observations made by the veterinarian.

Our working group developed a clinical score for evaluating the tarsus astragalin joint comprising the AAEP modified score, manoeuvres of palpation pressure and forced flexions, observation of the profile joint and the degree of hydrarthrosis and physical characteristics of synovial fluid.

The traditional analysis of synovial fluid included evaluation of enzymes (AST, LDH, FA), total protein, urea and the white blood cell count. Following the discovery of new biomarkers (BMs) and its effectors in the inflammatory cascade, their application in early diagnosis of OA, the development of new treatments and the monitoring thereof, have begun to be studied.

A BM is a direct or indirect molecular indicator of abnormal joint tissue replacement, which corresponds to a normal component or a byproduct of the metabolic processes of the articular tissues.

The indirect BMs include cytokines and MMPs. Cytokines are proteins of cellular communication, secreted by the cells of the innate and adaptive immune system in response to the presence of different antigens. These cytokines mediate the physiological processes of immune cells and bone and cartilaginous tissues and stimulate different defensive and inflammatory responses, both at the local level (joint) or systemic. In articular diseases, tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukins 1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), 4 (IL-4) and 6 (IL-6), present in the synovial fluid, but at different levels in healthy animals and those who have clinical signs of OA, are considered of importance.

The MMPs that have diagnostic value in OA are, fundamentally, the MMPs 2 and 9 which are proteases, zinc and calcium dependent, involved in physiological and pathological replacement of the MEC, degrading it in an OA processes. When there is a physiological bone turnover, the TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  released by chondrocytes, synovial cells and fibroblasts, produces a response of osteoblasts which increases the production of MMPs within a normal range. The expression of these enzymes is highly controlled by tissue inhibitors of metalloproteases (TIMs).

This thesis rises as a general hypothesis that, in horses, the modifications of the synovial fluid biological markers, in the initial or early stages of OA, precede the presentation of clinical and radiological signs. In addition, it is possible to observe biochemical changes in periods of remission of the disease.

Its objectives are to:

- Analyze the diagnostic value of synovial fluid molecular biomarkers as early predictors of clinical manifestation of osteoarthritis and in the monitoring of their evolution.
- Determine if there is a temporal relationship between clinical diagnosis and synovial fluid biochemical analysis, in horses with and without clinical signs of OA.
- Establish a clinical score that allows the diagnosis and monitoring of the evolution of the disease in its various phases.
- To assess whether there is a relationship between the presence or absence of clinical signs and early biochemical changes in the synovial fluid.

To establish population clinical score values, 123 show jumping and Thoroughbred horses, aged between 1 and 28 years taken randomly were evaluated.

From this initial group, three groups of animals were differentiated, according to their age category, to obtain reference values of cytokines and MMPs in order to characterize the profile of these biomarkers in the synovial fluid of healthy horses of different ages and horses with clinical signs of OA.

The groups were: i) healthy foals between 1 and 2 years (n = 21), ii) healthy adults and with varied degrees of OA, aged between 3 and 14 years (n = 84) and iii) healthy adults over 15 years but with articular problems due to aging (n = 18).

A general clinical examination and a particular one focused on the tarsal joint of both hind limbs were made, and synovial fluid was sampled from both tarsi. From these samples, IL-1  $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , MMPs 2 and 9, reactive protein C (RPC), total protein, albumin, and urea were determined.

In order to quantify the clinical examination of the joint, the following clinical score was developed:

## A) Score of lameness:

0. No detectable.

1. Difficult to observe and not always apparent (forced flexion pain).

2. Difficult to observe on walking or trotting in straight line but apparent in certain circumstances of greater effort (work in circle).

3. Always observable on trotting.

- Sensitivity to palpation pressure (minor to major): 0 (-), 1 (+), 2 (++) and 3 (+++).

- Forced flexion: 0 (-), 1 (+), 2 (++) and 3 (+++).

## B) Macroscopic analysis of synovial fluid

- *Visual appreciation of volume:*
  - 0. No fluid
  - 0.5. Scarce (- 2 ml)
  - 1. Intermediate (from 2 to 10 ml)
  - 1.5. Abundant (+ 10 ml)
- *Colour:*
  - 0. Transparent.
  - 0.4. Transparent whitish.
  - 0.8. Strong yellow.
  - 1.2. Blood stained.
  - 1.6. Reddish bleeding.
  - 2. Blood.
- *Turbidity:*
  - yes (1) / no (0)

- Formation of 'thread' (stretch):	0.4: 5 cm.
	0.8: 3 cm.
	1.2: 1 cm.
	1.6: Clot

### C) Score of profile joint damage

1. Normal.
2. Increase of fluid.
3. Slight hydrarthrosis.
4. Severe hydrarthrosis with or without capsule fibrosis.
5. Joint inflammation (increased size, pain, and heat).

The proposed clinical score corresponds to a minimum of 2.3 points (no clinical manifestation) and a maximum of 20.1 points, considered of maximum severity.

To assess the value of different levels of BMs in relation to the clinical score, we worked with the cytokines and MMPs reference values in synovial fluid previously set in our laboratory.

Results from the measurement of cytokines (pg/ml) and MMPs (% of an internal control) were divided into 3 age categories, foals, adults and adults older than 15 years because results of the young animals (IL-1  $\beta$ :  $120.96 \pm 42.49^a$ ; IL-4:  $6.10 \pm 1.43^{d, g}$ ; IL-6:  $115.14 \pm 52.49$ ; TNF- $\alpha$ :  $41.42 \pm 13.64^a$ ; MMP-2:  $140.47 \pm 61.98^a$ ; MMP-9:  $55.45 \pm 58.17^{a, e}$ ) and adults older than 15 years (IL-1  $\beta$ :  $57.12 \pm 8.38$ ; IL-4:  $10.83 \pm 4.20^c$ ; IL-6:  $134.21 \pm 45.24$ ; TNF- $\alpha$ :  $86.35 \pm 43.25^e$ ; MMP-2:  $49.13 \pm 18.50$ ; MMP-9:  $8.28 \pm 7.63$ ) had a differential performance between them and the group of adults and adults, among them.

In the adult animals group, a clearly defined group distribution was observed in most of the variables studied in groups **low** (IL-1  $\beta$ :  $37.37 \pm 12.25^b$ ; IL-4:  $2.94 \pm 0.93^{a, d}$ ; IL-6:  $62.68 \pm 25.16$ ; TNF- $\alpha$ :  $30.61 \pm 6.39$ ; MMP-2:  $63.23 \pm 25.61$ ; MMP-9:  $0.34 \pm 0.15$ ), **medium** (IL-1  $\beta$ :  $61.75 \pm 7.02$ ; IL-4:  $7.41 \pm 0.71^{d, g}$ ; IL-6:  $148.66 \pm 28.86$ ; TNF- $\alpha$ :  $46.45 \pm 10.94$ ; MMP-2:  $128.27 \pm 24.80^f$ ;

MMP-9:  $11.19 \pm 3.96$ ) and **high** (IL-1  $\beta$ :  $171.56 \pm 132.68$ ; IL-4:  $14.61 \pm 5.37$ <sup>g</sup>; IL-6:  $363.73 \pm 123.06$ <sup>e</sup>; TNF- $\alpha$ :  $108.71 \pm 50.39$ <sup>e</sup>; MMP-2:  $354.29 \pm 174.88$ <sup>e</sup>; MMP-9:  $85.95 \pm 47.97$ <sup>e</sup>). However, the distribution of TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  in the three groups was not so marked, founding no significant differences between the average values of the low and medium group (<sup>a</sup> P < .001 vs. older adults; <sup>b</sup> P < .05 vs. High; <sup>c</sup> P < .01 vs. High; <sup>d</sup> P < .001 vs. High; <sup>e</sup> P < .001 vs. the other groups, <sup>f</sup> P < .05 vs. older adults; <sup>g</sup> P < .01 vs. older adults).

IL-1  $\beta$  of healthy foals had a higher value than the rest of the other groups. The IL-1  $\beta$  average value of the foals group was overcome, albeit not significantly ( $p > 0.005$ ), by the adults group with high values.

Finally, using the proposed clinical score in 123 animals and associated with the results of the levels of cytokines and MMPs in the synovial fluid, the population was qualified in the following ranges or categories:

Group 1: **Foals** young horses between one and two years, with no clinical alterations of the joints, or variations of biomarkers due to OCD.

Group 2: **Basal** Equine adults with a clinical score no more than 4. Clinically healthy animals, without alterations in the articular inflammatory BMs or with slight alterations of them.

Group 3: **Adult horses** with a clinical score of 4-6 with mild clinical symptoms of OA.

**3a** non active form with a decrease in IL-4

**3b** active form with several increased BMs.

Group 4: **Adult horses** with a clinical score of 6-10 with OA symptoms and with or without changes in articular shape.

**4a** non activate form with slight overall increase of BMS

**4b** is active with rising 2 MMP, MMP9 expression and high IL-6 and other BMs.

Group 5: **Elderly horses**. Adults horses more than 15 years old. Chronic symptoms of OA by aging, with increases in some BMs and decreases in others, characteristic of the aging process.

Once the response of different Cytokines and MMPs in OA cases was proved, in acute, remission or chronic stages, those results were correlated with the clinical score to validate it,

and use it consistently in the clinical diagnosis of OA, at least in the tarsal locations ( $r^2 = 0.65$  for MMP-2 and  $r^2 = 0.82$  for MMP-9).

Apparently, the modification or elevation of cytokines and MMPs is an early sign that precedes the alteration of clinical index. On the other hand, in the different clinical categories different combinations were observed, being the decrease of IL-4 an incipient sign of disturbance in the articular environment. For example, in the 4b group, a characteristic profile, present in 30% of the animals, was characterized by a high IL-4 and IL-6 accompanied by high MMP 2. In the basal group and group 3b, with a 25% elevation in cytokines, an association of IL-1  $\beta$  and IL-6 high but with normal or decreased IL-4 and MMP 2 normal. And at higher scores more than 13, was very common to find the expression of MMP 9, absent in the Basal group and elevated MMP 2 values.

The follow-up of a patient with OA involves standardized semiologic techniques that can develop a fixed test, repeatable and with results validated by means of correlated complementary methods, such as arthroscopy, analysis of biomarkers, among others.

To achieve this goal, a score that covers most of the possible anamnestic and clinical observations must be achieved.

In this experience, we have implemented a score using a combination of clinical scores, which received a numerical value whose sum resulted in a maximum score of 20.1 and a minimum cut of 2.3, whereas this value correspond to the clinical score of an animal without clinical alterations.

Apparently, the increased clinical score will result from the mechanical alteration that the articular disease produces. In general, the clinical score evolution of OA is a gradual process, with the exception of what happens in cases of acute arthritis, with an increase, as the physiological function of the cartilage and subchondral bone begins to be modify, as the active disease stays in time. And periods of remission as OA progresses are increasingly shorter.

In the case of the elderly, were observed clinical scores higher than 7, no apparent signs of OA, only of aging, and in these cases the clinical score values were very difficult to roll back although the drop in the BMs.

The indirect BMs of the cartilage metabolism, studied in this experience, were IL-1  $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  and MMPs 2 and 9. IL-1 and TNF- $\alpha$  are released by the synovial membrane and articular chondrocytes with synovitis, product of the trauma. Both cytokines are released in excess and increase the rate of degradation of proteoglycan, decreases their synthesis or act together in both processes. This is partially accomplished by the release of MMPs and prostaglandin E2.

IL-6 can be produced by articular chondrocytes and synovial fibroblasts, induced by the synthesis of IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$ . At the same time, IL-6 stimulates at hepatic level acute phase protein synthesis, like RCP.

In clinical groups of higher scores, IL-4 increase to basal levels and even in some cases increases twice the basal, but associated with elevated levels of IL-6. On the other hand, it seems that elevated levels of biomarkers occur more regularly in the category of greatest clinical score and that, generally, they include older animals with higher chronic changes.

Preliminary results obtained by our working group showed the absence of BMs in healthy animals or in periods of remission and its presence in animals with active OA. However, we have provided the knowledge that in animals with no clinical symptoms increased BMs act as an early indicator of future OA.

The TNF- $\alpha$  is the main mediator of the acute response that triggers the osteoarthritic process. The TNF- $\alpha$  increase occurs in the first moments of the inflammatory process, so it is very likely not found it in high levels in the synovial fluid. In our experience, the TNF $\alpha$  was found in little amount in horses both clinically healthy and in a non active phase of the OA. Therefore, its value lies in finding it present in elevated levels to confirm the acute inflammatory process.

On the contrary, the absence has no diagnostic value to determine the non-existence of the disease. At this point, it is also important to mention the relationship between TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  since the release of TNF- $\alpha$  cause an increase in the release of IL-1  $\beta$ , causing a greater activation of the previously described cell types for the release of MMPs.

In active OA, IL-1  $\beta$  is elevated as it can be seen in animals in the sub "b" classification of the various categories of the clinical score presented in this thesis. At the same time, to reduce the release of MMPs, IL-6 should also been inhibit, because there is a redundant effect in which in

the absence of one, the other would carry out the same actions. Therefore if only one of the two is inhibited, the enzyme activity would not be reduced.

In clinically healthy horses, with high IL-6, since this pro-inflammatory cytokine, it could be considered that these animals were in a remission period or that it already existed a destruction of articular cartilage.

MMPs 2 and 9 are increased in bone pathological process, surpassing the concentrations of TIMs. However, in these cases the MMP 2 presents values not as high as the MMP-9 and can be causing an homeostatic action, removing aged or abnormal cartilage. By other side, MMP 9 either it cannot be detected in normal joints or are in very low baseline, increasing significantly in cases of OA, septic slow-onset arthritis and rheumatoid arthritis in human beings. Therefore, according to this MMPs profile, it can be inferred that we are in front of a MMP-2-mediated normal remodelling processor or in front of an intense degradation the of cartilage with increased MMP 9 expression.

In our work, in clinically healthy animals we observed low levels of MMP-2 and absence of MMP-9. In animals with active OA, the MMP-2 significantly increased ( $p < 0.001$ ) over the reference values of healthy horses. In horses in non active remission phase, the MMP-9 increased slightly and in horses in the chronic phase of the disease, the values were higher.

In conclusion, in horses who presented clinical symptoms compatible with OA, cytokines and BMs values and synovial fluid proteomic profiles were modified, while those free of symptoms, presented values compatible with normal joints. However, animals without clinical symptoms or subclinical showed alterations in the cytokines and MMPs profile of as an early sign of alteration of the intra-articular medium or as an indicator of a clinical remission stage. The clinical score presented high correlation with acute, chronic or recurrent biochemical modifications in OA horses or horses without the presence of the disease.

Therefore, this score can be used in the clinical diagnosis of OA since the synovial BMs validated its evolution both positive and negative. In the same way, the BMs studied in this experience can be used as early complementary method in the detection, monitoring and therapeutic evolution of OA.

Key Words: Osteoarthritis, diagnose, clinical score



### 3. INTRODUCCION

La OA es la enfermedad articular más frecuente en el caballo y es considerada a nivel internacional como responsable del 60 % de las claudicaciones del equino deportivo. En la República Argentina no se tiene registros estadísticos sobre la prevalencia real de la enfermedad. Sin embargo, la amplia casuística registrada por los veterinarios dedicados a la práctica equina y sus esfuerzos en obtener nuevos medicamentos para el tratamiento de la OA, sumado al interés de la industria farmacéutica internacional, reflejan la importancia de esta entidad clínica para la medicina deportiva equina (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Carmona y col., 2009a) (Chávez y col., 2010) (Heinegård, 2005) (McIlwraith, 2005) (Oke y McIlwraith, 2010) (Polli y col., 2013) (Trumble y col., 2001).

#### **3. 1. Fisiopatología de la osteoartritis**

Las enfermedades articulares del caballo son múltiples e incluyen la OA, la osteocondritis (OC) y la osteocondrosis disecante (OCD) o fragmento osteocondral (FO). Todas ellas están caracterizadas por una reacción sinovial con progresiva degradación del cartílago articular y del hueso subcondral.

La OA puede presentarse en forma primaria o secundaria (Carmona y Giraldo-Murillo 2007). La forma primaria es rara y se define como un trastorno *per se*, inherente a la articulación, sin una etiología aparente. La OA secundaria está asociada con trauma, sobreuso e inestabilidad articulares. Otros autores, definen la OA primaria como resultado de un estrés articular acumulado y la secundaria debido a una anomalía estructural preexistente, como sepsis intra articular, OC, OCD o fracturas intra articulares (Trumble y col., 2001).

La OC y la OCD se deben a defectos en el proceso de osificación endocondral, producto de alteraciones nutricionales, desbalances hormonales e interacciones acompañantes de diferentes citoquinas y metaloproteinasas (MMPs). La osificación endocondral ocurre en dos sitios: el complejo articular/epifisial y el complejo metafisial. Este proceso se desarrolla en una serie de pasos que comprenden la proliferación de condrocitos, producción de MEC, hipertrofia de los condrocitos y finalmente, mineralización de la MEC. A medida que los condrocitos maduran, producen y mantienen la MEC, compuesta de agua, proteoglicanos y colágenos,

predominando el *tipo II*, a diferencia del hueso en donde predomina el de tipo *I* abundante en el aminoácido hidroxiprolina. La relación etiológica entre dieta, desbalances hormonales y citoquinas se pone de manifiesto en los casos en que los caballos son alimentados con dietas altamente energéticas que derivarían en la producción de altos niveles crónicos de insulina y factores de crecimiento similares a insulina (IGF1), que acelerarían el proceso de diferenciación y apoptosis de condrocitos, quedando desincronizado de la mineralización adecuada de la MEC (Henson y col., 1996 y 1997).

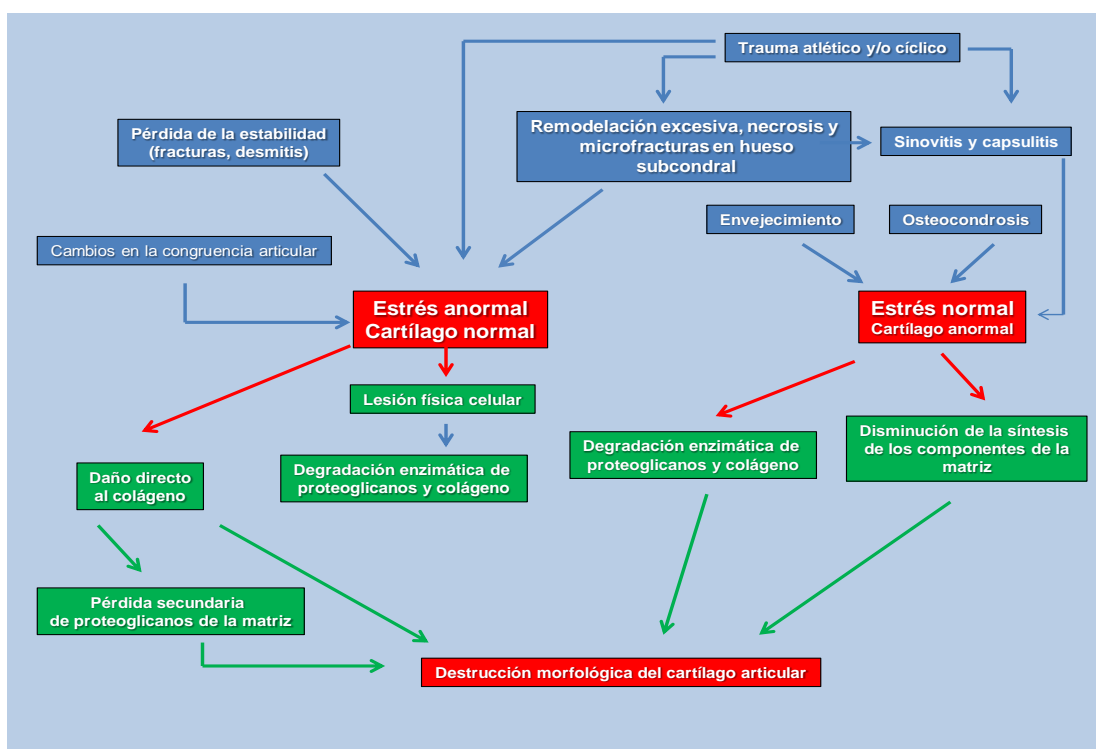
Si bien la OC y la OCD pueden predisponer a la OA, es generalmente el trauma repetido, producto de la competencia deportiva, el que produce sinovitis y capsulitis, daño intra articular y ligamentos colaterales, fracturas intra articulares, enfermedad del hueso subcondral y lesión de meniscos, especialmente en la articulación de la babilla. Estos procesos llevan a la manifestación en forma aguda o crónica con reagudizaciones recidivantes características de la OA. Según diversos autores, (Brama y col., 1998) (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007) (Carmona y col., 2009a) (Chiaradia y col., 2012) (Ekman, 2005) (Goodrich y Nelson, 2013) (Heinegård, 2005) (Jeffcott, 1996) (McIlwright, 2009a) (Polli y col., 2013) (Trumble y col., 2001) estas lesiones permiten clasificar la OA en *tipo I*: sinovitis y capsulitis sin daño al cartílago o a tejidos blandos periarticulares, *tipo II*: daño al cartílago articular o ruptura completa de estructuras de sostén como ligamentos colaterales y *tipo III*: artritis postraumática con deterioro progresivo del cartílago articular y cambios secundarios en el hueso y tejidos blandos (Fig.1).

Por otra parte, el tipo de deporte (turf, salto, polo y otros), la inmadurez del aparato locomotor a la temprana edad a la que se inicia la práctica junto con las presiones deportivas y económicas del medio hípico de mantener los ejemplares en actividad permanente, llevan a la utilización de protocolos de tratamiento que no promueven la curación definitiva del trauma agudo, sino solamente buscan paliar su sintomatología en forma inmediata, predisponiendo de este modo a la instalación de la forma crónica (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007) (Polli y col., 2013).

En los deportes en los cuales la vida útil del equino es prolongada, deportes ecuestres, es frecuente observar formas crónicas de artritis debidas al fracaso del cartílago articular para soportar el trauma cíclico de la actividad deportiva, sumado a los cambios propios de la edad, en otros casos en animales jóvenes las lesiones reiteradas pueden llevar al caballo al retiro de

la competencia aún a edades relativamente tempranas (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007) (Heinegård, 2005) (Polli y col., 2013) (Trumble y col., 2001).

Figura 1. Ruta de la degradación del cartílago articular secundaria al trauma articular. (Adaptado de McIlwright, 2009a)



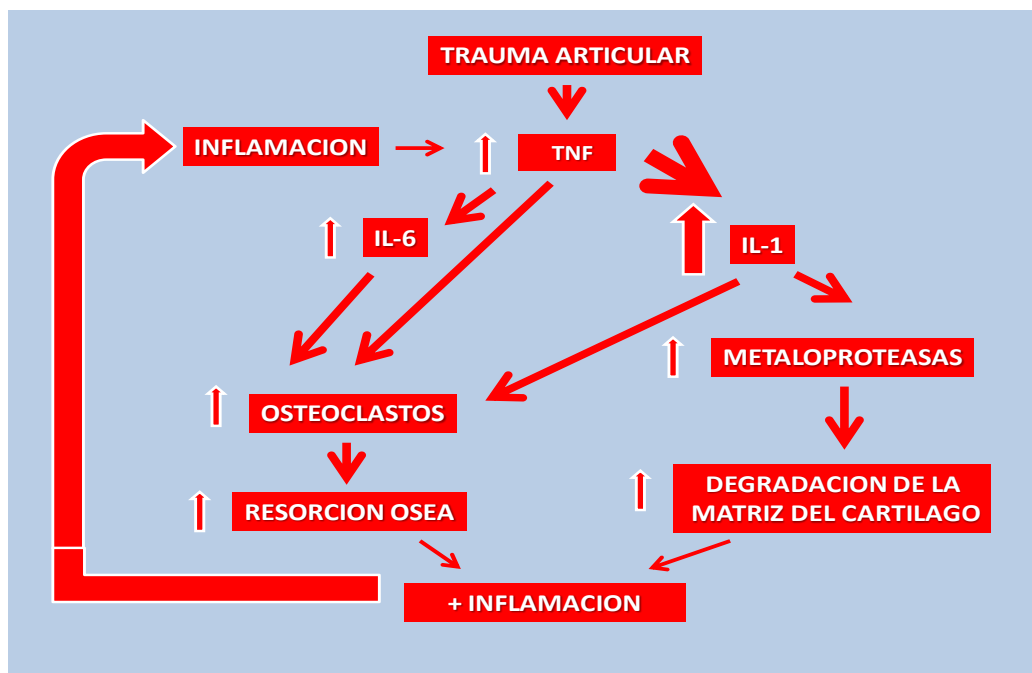
La localización topográfica de la lesión articular también depende de las características particulares del deporte. Así en el Sangre Pura de Carrera y en el American Trotter, las articulaciones generalmente más afectadas son las carpianas, metacarpofalangesamoidea y tibiotarsales. En Equinos dedicados a los Saltos Variados, Dressage, Prueba Completa, Endurance o Pruebas de Rienda, la OA afecta mayormente a las articulaciones interfalangiarias y tarsianas (Caggiano y col., 2013) (Ekman, 2005) (Polli y col., 2013).

Es así que a modo de síntesis la OA puede ser definida como una enfermedad progresiva, degenerativa que se caracteriza por una pérdida del cartílago articular, eburnificación del hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial y aumento del líquido sinovial. En estadios tempranos de la enfermedad se han observado microfracturas en el cartílago calcificado y el hueso subcondral, con áreas de baja densidad y resorción ósea, cambios producidos por el

trauma cíclico que ocurre a mayor velocidad que la capacidad de modelación del hueso. En los estadios más avanzados se observa erosión cartilaginosa y esclerosis del hueso subcondral, se generan osteofitos, fibrosis de la membrana sinovial y alteración macroscópica del líquido sinovial.

Los procesos inflamatorios resultantes llevan al aumento de mediadores inflamatorios, que producen la liberación de micro moléculas en el líquido sinovial. Estas moléculas son llamadas BMs y son indicadores directos o indirectos de un intercambio metabólico articular que, en algunos casos se presentan de forma constitutiva en niveles normales y en otros, anormales. Estos biomarcadores interactúan en el mantenimiento estructural de la matriz cartilaginosa, mantenimiento necesario para soportar la carga y la reparación post ejercicio. Sin embargo, en situaciones de estrés articular, estos marcadores pueden afectar la respuesta inflamatoria, produciendo citoquinas proinflamatorias que activan enzimas del tipo gelatinasas, como las MMPs que a su vez retroalimentan el proceso por destrucción de la matriz cartilaginosa (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007) (Carmona y col., 2009a) (Catterall y Cawston, 2002) (Chávez y col., 2010) (Chiaradia y col., 2012) (de Grauw y col., 2006) (Heinecke y col., 2010) (Heinegård, 2005) (Lacourt y col., 2012). (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2005) (Polli y col., 2013) (Trumble y col., 2001) (Fig. 2).

Figura 2. Fisiopatología del trauma articular



### **3. 2. Diagnostico de la osteoartritis**

El diagnóstico de la OA se basa en la semiología clínica y en métodos complementarios. La reseña puede orientar en la clasificación del proceso en agudo o crónico y la anamnesis va a resultar de guía respecto de las modificaciones en el desempeño deportivo. La inspección, confirmará la presencia de claudicaciones y/o cambios en la biomecánica según la articulación afectada, así como cambios en su anatomía. La palpación presión ubicará zonas álgidas en la articulación. Estos exámenes se completarán con las maniobras de flexión forzadas y las anestésicas diagnósticas tronculares e intraarticulares, La artroscopía como método invasivo permite observar el estado real de una articulación. Finalmente, los métodos complementarios imagenológicos y de laboratorio terminarán de aportar los datos que brinden el diagnóstico definitivo. (Kawcak, 2005) (Chávez y col., 2010) (Monina, 2008).

Es de fundamental importancia la descripción estandarizada de los síntomas de una enfermedad, así como los signos de su evolución o progresión en el tiempo para unificar los criterios de diagnóstico entre los profesionales, para determinar el tipo y el nivel de gravedad de la misma, para definir las pautas de inclusión de los pacientes en trabajos de investigación, para caracterizar los modelos animales utilizados en la investigación de enfermedades que

afectan al ser humano y finalmente, para poder cuantificar estadísticamente los progresos, los éxitos y los fracasos en los tratamientos.

En Medicina Humana se describen varios índices para evaluar a la OA desarrollados por organizaciones como el International Knee Documentation Committee (IKDC) y la International Cartilage Repair Society (ICRS). Estos índices incluyen evaluaciones subjetivas, con participación del paciente, objetivas, realizadas por exámenes clínicos y complementarios, e índices que incluyen ambos tipos de evaluaciones, generalmente relacionados con la articulación femoro tibio rotuliana (Baltzer y col., 2009) (Crowley y col., 2009) (Jang y col. 2013) (Ryu y col., 2012) (Tegner y Lysolm, 1985).

Dentro de estos índices se pueden mencionar los siguientes:

- a) El índice Western Ontario y Mc Master Universities (WOMAC). Comprende tres aspectos: dolor, rigidez y función física. La escala utilizada es 0 a 10, siendo 10 la peor condición médica.
- b) La Escala Análoga Visual (VAS, en inglés). Se evalúa el dolor preguntando al paciente sobre su sensibilidad, siendo 0 la ausencia de dolor y 100 el peor dolor posible.
- c) La Escala del Nivel de Actividad de Tegner. Evalúa de 1 a 10 el nivel de actividad física del paciente previamente a la aparición de los síntomas, y en el momento del examen, siendo 0 un paciente discapacitado para moverse y 10 un deportista de élite. Esta escala es utilizada para la evaluación de los tratamientos quirúrgicos.
- d) El Índice de *Severidad* de la OA de cadera de Lequesne. Este índice tiene un puntaje mínimo de 0 y un máximo de 26, considerando un valor mayor a 14 extremadamente severo. Se evalúa el dolor o la incomodidad, la máxima distancia recorrida caminando y las actividades diarias realizadas por el paciente, incluyendo la actividad sexual en mujeres sexualmente activas candidatas a la prótesis de cadera (Lequesne, 1997).
- e) El índice ICRS, que incluye este índice y el índice IKDC, contiene un examen objetivo general, un examen objetivo particular de la rodilla, con una profunda anamnesis del paciente. Otra sección contemplada en el índice debe ser evaluada por el cirujano,

considerando el grado de reparación quirúrgica logrado. Finalmente, las evaluaciones realizadas por el médico clínico consisten en:

1. Efusión o contenido de líquido sinovial.
  2. Movilidad pasiva evaluada con un goniómetro y comparada con la articulación contralateral.
  3. Evaluación de los ligamentos colaterales y cruzados anterior y posterior.
  4. Evaluación del espacio articular. Se evalúa crepitación articular y dolor por medio de movimientos pasivos.
  5. Patología del sitio de recolección del punto de recolección del auto injerto (pos quirúrgico).
  6. Examen radiológico.
  7. Prueba funcional. Se pide al paciente que salte la máxima distancia posible sobre la pierna sana y luego la enferma.
- f) La escala de clasificación de Kellgren-Lawrence (Kellgren y Lawrence, 1957) clasifica las OA según el examen radiológico en:

Grado 0: Sin alteraciones radiológicas

Grado 1: estrechamiento dudoso del espacio articular y posible reborde osteofítico.

Grado 2: osteofitos presentes, estrechamiento definitivo del espacio articular.

Grado 3: múltiples osteofitos moderados, estrechamiento definitivo del espacio articular, esclerosis y posible deformidad del contorno del hueso.

Grado 4: osteofitos grandes, marcado estrechamiento del espacio articular, esclerosis severa y deformidad definitiva del contorno del hueso.

En Medicina Veterinaria, la colaboración del paciente en la anamnesis es nula y la del responsable del animal puede ser incompleta o poco confiable. Por lo tanto, la elaboración de índices está basada fundamentalmente en las observaciones realizadas por el clínico, cirujano o patólogo actuante.

En pequeños animales, Goranov (2012) utilizó, en un modelo de OA de babilla, tres índices diferentes en forma simultánea que evaluaban movimiento, conducta y análisis del dolor:

- a. La respuesta al dolor se evaluó por: conducta, sujeción, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, vocalización y respuesta a la manipulación.
- b. El análisis del movimiento, del dolor y de la efusión articular se evaluó por: postura antiálgica, claudicación al trote, respuesta de dolor a la manipulación y efusión articular.
- c. El índice de OA del miembro posterior en perros se evaluó por: claudicación, soporte del peso corporal, respuesta ante el levantamiento del miembro contralateral a la lesión.
- d. Respuesta a la extensión del miembro afectado.

En equinos, la evaluación de la respuesta al dolor en un miembro, se evalúa primariamente por el grado de claudicación que presenta el mismo en diferentes aires y sobre distinto tipo de superficies. Las referencias citadas utilizan para esta evaluación el índice de la American Association of Equine Practitioners (AAEP) (1991) con un rango de 0 a 5. Los mismos autores citados suman un examen clínico, radiológico y ecográfico de las articulaciones en estudio (Broeckx y col., 2014) (Carmona y col., 2007b) (Carmona y col., 2009b) (Gangl y col., 2007).

Para poder estandarizar los criterios de inclusión, Carmona y col. (2007b) (2009b) clasificaron el grado de efusión articular de 0 a 3, donde 0 = articulación de apariencia normal. 1 = efusión articular ligeramente palpable, sin engrosamiento de la cápsula articular. 2 = efusión articular palpable, cápsula articular moderadamente engrosada y ligera reacción dolorosa durante la palpación articular profunda. 3 = efusión articular evidente, engrosamiento marcado de la membrana sinovial acompañado de signos clínicos de inflamación y con reacción dolorosa acentuada durante la palpación superficial de la cápsula articular y la movilización pasiva de la articulación.

Broeckz y col. (2014) incluyen el grado de efusión articular y la prueba de flexión de la articulación en estudio, sumando estos dos índices al de la AAEP (1991), teniendo un índice total de severidad de 0 a 10.



Gangl y col. (2007) utilizan tres índices, clínico, inflamatorio y degenerativo. El índice clínico incluye una adaptación del índice de la AAEP (1991), el grado de dolor a la flexión y el grado de inflamación de la articulación. Los dos índices restantes se basan en el estudio artroscópico.

Mcllwraith y col. (2010) (2012) establecen, al realizar una reseña de los distintos modelos experimentales equinos de OA, una clasificación de los hallazgos anatómicos e histopatológicos que permite una estandarización entre laboratorios y una comparación entre los distintos trabajos de investigación.

Nuestro grupo de trabajo desarrolló un índice clínico para evaluar la articulación tarso astragalina que incluye el índice de la AAEP modificado (1991), donde no se consideraron las categorías 4 y 5 dado que en estos procesos de OA no existen la imposibilidad absoluta del movimiento de un miembro (fracturas), las maniobras de palpación presión y flexión forzada, la observación del perfil articular y del grado de hipoartrosis y las características físicas del líquido sinovial (Perrone y col., 2013) (Caggiano y col., 2014).

En relación a los métodos complementarios para el diagnóstico de la OA, la radiología es la práctica de primera elección. Mediante este método, se pueden observar osteofitos periarticulares, lisis o esclerosis de hueso subcondral, asimetría o pérdida del espacio articular, fragmentación osteocondral y finalmente, anquilosis, como ya se mencionó en la clasificación de Kellgren – Lawrence (pág. 7). Sin embargo, los cambios radiológicos solo son observables en las OA que tienen un grado relativamente avanzado de evolución, siendo necesario una disminución del 30 al 40 % de la densidad ósea para poder detectar una lesión radiológica. En las etapas agudas o en las fases de remisión puede no haber cambios en las imágenes, o estas no haberse modificados con respecto a estudios anteriores. Además, en los casos crónicos si bien se observa disminución de la densidad ósea subcondral subyacente, esta se encuentra oculta por neo formaciones anárquicas compensadoras, resultando la imagen en un falso aumento de la masa ósea situación que dificulta el diagnóstico radiológico. Este error de diagnóstico respecto de la densidad mineral ósea real también se observa con el uso de los densitómetros óseos (Ordás Calvo y col., 2000).

Por otra parte, la ultrasonografía puede brindar datos sobre el estado de los tejidos blandos articulares y periarticulares, del periostio y de las características físicas del líquido sinovial. La centellografía permite marcar la zona lesionada (*locus dolendi*), pero no permite realizar un diagnóstico específico del proceso. Las fracturas por estrés o zonas de debilidad de los huesos

subcondrales de áreas óseas proximales también pueden presentarse como sitios activos por este método. Pero el seguimiento de la evolución de la OA puede ser difícil, ya que durante su desarrollo la captación del material radioactivo puede aumentar o disminuir. En otros países, es posible utilizar diagnósticos por imágenes como tomografía computada y resonancia magnética con la misma limitación de la radiología, pero por ahora, no se encuentran a disposición para el uso en equinos, en la República Argentina.

Es así que, debido a las limitaciones de los métodos por imágenes para la detección precoz de la OA, los métodos de laboratorio adquieren gran relevancia y resultan de gran valor en el diagnóstico temprano y asimismo en el seguimiento de la respuesta al tratamiento, antes que los cambios a nivel de la estructura anatómica afectada sean irreversibles o hagan que el desempeño deportivo absoluto del equino se vea comprometido (Caggiano y col., 2013) (Chávez y col., 2010) (Goodrich y Nelson, 2013) (Kawcak, 2005) (McIlwraith, 2005) (McIlwraith, 2009b) (Monina, 2008) (Polli y col., 2013).

### **3. 2. 3. Biomarcadores sinoviales**

En el análisis tradicional del líquido sinovial se ha utilizado la medición de enzimas (AST, LDH, FA), proteínas totales, urea y el recuento de leucocitos. A partir del descubrimiento de nuevos BMs y de sus efectores en la cascada inflamatoria, se han comenzado a estudiar su aplicación en el diagnóstico precoz de la OA, el desarrollo de nuevos tratamientos y el seguimiento de los mismos.

McIlwraith (2005) y Chavez y col. (2010) definen un BM como cualquier indicador molecular, directo o indirecto, de recambio anormal del tejido articular, que corresponde a un componente normal o a un subproducto de los procesos metabólicos del tejido articular (Cuadro 1). En la enfermedad articular, el balance fisiológico de modelado y remodelado osteoarticular, procesos anabólicos y catabólicos, se altera y las concentraciones de BMs puede aumentar o disminuir.

Cuadro 1. Biomarcadores del metabolismo articular osteocondral utilizados para el diagnóstico de enfermedad articular en equinos.

<b>Marcadores del metabolismo osteo- articular</b>		
Marcadores directos del metabolismo del cartílago	del proceso anabólico: Modelación- Formación	Proteoglicano Agrecano, Proteínas de matriz de colágeno tipo II
	del proceso catabólico: Remodelación- Resorción	Cross links de colágeno tipo II
Marcadores indirectos del metabolismo osteo- articular		Metaloproteinasas Eicosanoides Proteínas de fase aguda Citoquinas Acido hialurónico
Marcadores del metabolismo óseo	del proceso anabólico: Modelación- Formación	Fosfatasa alcalina ósea Osteocalcina Propéptidos de colágeno tipo II
	del proceso catabólico: Remodelación- Resorción	Hidroxiprolina. Pirridinolina-Deoxipirridinolina Telepéptidos de colágeno tipo II Sialoproteína ósea
Marcadores misceláneos de enfermedad articular		Mieloperooxidasa Proteína sensible al ácido retinoico derivada del cartílago

Respecto a las citoquinas estas son proteínas de comunicación celular que son secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a la presencia de distintos antígenos. A su vez las diferentes citoquinas median los procesos fisiológicos de las células inmunitarias y del tejido óseo y cartilaginoso y estimulan distintas respuestas defensivas e inflamatorias, tanto a nivel local (articular) como sistémico. Entre estas citoquinas, se

consideran de importancia en las afecciones articulares al TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-4 y IL-6, todas ellas presentes en el líquido sinovial pero en niveles diferentes en los animales sanos que en aquellos que presentan signos clínicos de OA (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Carmona y col., 2009a) (Catterall y Cawston, 2002) (Clegg y col., 1997a) (Chávez y col., 2010) (David y col., 2007) (De Grauw y col. 2006) (De Simone y col., 2011) (Feldman y Maini, 2001) (Ley y col., 2007) (Polli y col., 2013) (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2009a) (Rolando, y col. 2012) (Todhunter y col., 1996) (Trumble y col., 2001).

Las MMPs que tienen valor diagnóstico en la OA son, fundamentalmente, la MMPs 2 y 9, las cuales son endopeptidasas del tipo gelatinasas, zinc y calcio dependientes, que participan en el recambio fisiológico y patológico de la MEC del cartílago, degradándola en los procesos de OA. Cuando existe un recambio óseo fisiológico, la liberación por parte de condrocitos, células sinoviales y fibroblastos de TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$ , produce una respuesta de los osteoblastos que aumenta su producción de MMPs dentro de un rango de normalidad, incluso en general se expresa la MMP 2 pero no la MMP 9. La expresión de estas enzimas está altamente regulada, ya que son sintetizadas como proenzimas. Una vez activadas, tiene el potencial de destruir la MEC. Por lo tanto, su actividad está controlada por TIMs (Brama y col., 1998) (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Catterall y Cawston, 2002) (Clegg y col., 1997a) (Clegg y col., 1997b) (Chávez y col., 2010) (Chiaradia y col., 2012) (De Simone y col., 2012a) (Fietz y col., 2008) (McIlwraith, 2001) (Polli y col., 2013) (Rolando, y col. 2012) (Trumble y col. 2001).

Por otra parte, se puede evaluar la PCR como indicador de fase aguda de inflamación, el óxido nítrico (NO), el perfil proteómico (proteínas totales y albúmina) y la relación de urea en sangre respecto a su concentración en el líquido sinovial (Bottini y col., 2013) (Caggiano y col., 2013) (Chiaradia y col., 2012) (McIlwraith, 2009b) (Polli y col., 2013).

## **4. HIPOTESIS GENERAL**

En los equinos las modificaciones de los marcadores biológicos del líquido sinovial, en las fases iniciales o tempranas de la OA, anteceden a la presentación de signos clínicos manifiestos y radiológicos. Además es factible observar modificaciones bioquímicas en los periodos de remisión de la enfermedad.

## **5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS**

### **5. 1. General**

Analizar el valor diagnóstico de los biomarcadores moleculares del líquido sinovial como predictores tempranos de la manifestación clínica de la osteoartritis y en el seguimiento de su evolución. Y determinar si existe una interrelación temporal entre el diagnóstico clínico y el análisis bioquímico del líquido sinovial, en equinos con y sin signos clínicos de OA.

### **5. 2. Específicos**

Establecer un índice clínico que permita el diagnóstico y seguimiento de la evolución de la enfermedad en sus distintas fases.

Evaluar si existe una relación entre la presencia o ausencia de signos clínicos y los cambios bioquímicos tempranos en el líquido sinovial.

## **6. MATERIALES Y METODOS**

### **6. 1. Animales**

Para establecer valores de índice clínico poblacional, se trabajo con 123 equinos de salto y SPC tomados al azar de edades comprendidas entre 1 y 28 años. La elaboración de este índice clínico fue el motivo de esta tesis.

Por otra parte, de este grupo inicial, se tomaron tres grupos de animales en función de su categoría etaria, para obtener valores de referencia de citoquinas y MMPs con el objetivo de caracterizar el perfil de estos biomarcadores en el líquido sinovial de equinos normales de distintas edades y en equinos con signos clínicos de OA.

Siendo estos grupos: i) potrillos sanos entre 1 y 2 años (n=21), ii) adultos con edad entre 3 y 14 años (n=84) sanos y con grados variables de enfermedad articular y iii) Adultos mayores a 15 años normales pero con problemas articulares por envejecimiento (n=18). La actividad de los animales adultos consistía en diferentes deportes ecuestres, tareas de trabajo general y animales retirados por edad o lesiones articulares.

A todos se le efectuó un examen clínico general y particular enfocado en los tarsos (articulación tibio astragalina) de ambos miembros posteriores, y se les extrajo líquido sinovial de ambos tarsos. No obstante en los casos en los cuales se encontró comprometida alguna otra articulación, carpo, nudos o babilla también se obtuvo muestras del líquido sinovial de las mismas.

La frecuencia teórica de las extracciones se fundamentó en el siguiente criterio:

- a. **Inicial** para clasificar clínica y bioquímicamente a los animales en estudio.
- b. **Basal** para cada protocolo en la etapa de pre tratamiento.
- c. **Post Tratamiento** a los 3, 10 y 21 y 60 días.
- d. **Estadios de remisión** en aquellos casos en los cuales durante los seis meses posteriores al tratamiento no presentaron síntomas.

## **6.2. Análisis Bioquímicos.**

- Determinación de IL-1  $\beta$ , IL-4 IL-6 y TNF- $\alpha$  por ELISA (BD OptEIA- BD Biosciences).
- Evaluación de MMPs 2 y 9 por el método zimográfico. Este método consiste en una corrida electroforética en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), pero el gel sobre el cual se corren las muestras tiene una base de gelatina que es el sustrato de las enzimas que estamos midiendo. Después de la corrida se realizan lavados con distintos detergentes para renaturalizar las enzimas y el posterior análisis

densitométrico se realizó con el software Scion Image (De Simone y col., 2011) (Rolando y col., 2013).

- Evaluación de Proteína C reactiva mediante kit comercial en suero y líquido sinovial de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anti-PCR (BioSystems, Barcelona, España).
- Evaluación del perfil proteico del líquido sinovial mediante la determinación proteínas totales, albúminas mediante método colorimétrico y urea mediante método enzimático cuantitativo (Wiener Lab, Argentina).

### **6. 3. Análisis estadístico**

Se utilizó el Test *t* de Student y/o ANOVA, para variables paramétricas, no paramétricas y muestras apareadas según los casos, y se estableció las diferencias con el post test correspondiente de comparaciones inter grupos. Como soporte se utilizó el software InStat 3 y GraphPad, Prisma.

## **7. RESULTADOS**

### **Objetivo 1- Establecer un índice clínico que permita el diagnóstico y seguimiento de la evolución de la enfermedad en sus distintas fases.**

Se realizó una evaluación clínica en una población de 123 caballos de edades comprendidas entre 1 y 28 años. Y a fin de cuantificar el examen clínico de la articulación se desarrolló el siguiente **índice clínico** (variable cuantitativa), tomando como base el índice de claudicaciones de la AAPE (1991), modificado por Perrone y col. (2013).

El índice de la AAPE resultó insuficiente para realizar un diagnóstico y seguimiento de los casos de OA, por lo que, a partir de la experiencia ganada con los sucesivos casos analizados, se sumó al grado de claudicación un examen clínico general y particular, pruebas de flexión forzada, análisis macroscópico *in situ* del líquido sinovial y el grado de alteración del perfil articular.

Por lo tanto, el índice clínico aplicado quedo desarrollado de la siguiente forma, Perrone y col. (2013):

### **Clínico General**

Se evaluó el estado general de cada animal y se destacó la presencia de cualquier asimetría en su aparato locomotor o particularidad en el desplazamiento.

### **Clínico Particular**

La caracterización del estudio clínico propuesto y su posterior aplicación en el diagnóstico de la OA responde a uno de los objetivos planteados en el proyecto inicial de esta maestría. Los números que anteceden cada definición son el puntaje otorgado según el caso con el índice clínico propuesto (Perrone, y col., 2013):

#### ***Definición del índice clínico utilizado***

##### ***A) Grado de Claudicación:***

- 0. No perceptible.
  - 1. Difícil de observar y no siempre aparente (dolor a la flexión forzada).
  - 2. Difícil de observar al paso o al trote en línea recta pero aparente en ciertas circunstancias de mayor esfuerzo (trabajo en círculo).
  - 3. Observable al trote bajo toda circunstancia.
- **Sensibilidad a la palpación presión** (de menor a mayor): 0 (-), 1 (+), 2 (++) y 3 (+++).
  - **Flexión Forzada:** 0 (-), 1 (+), 2 (++) y 3 (+++).

##### ***B) Análisis macroscópico del líquido sinovial***

- *Apreciación visual del volumen:*
  - 0. No hay
  - 0,5. Escaso (- de 2 ml)
  - 1. Intermedio (de 2 a 10 ml)



- 1,5. Abundante (+ de 10 ml)
- *Color:*
0. Claro.
- 0,4. Blanquecino transparente.
- 0,8. Amarillo fuerte.
- 1,2. Sanguinolento.
- 1,6. Rojizo hemorrágico.
2. Sangre.
- *Turbidez:* si (1) / no (0)
- *Formación de "hilo" (estiramiento):* 0,4: 5 cm.
- 0,8: 3 cm.
- 1,2: 1 cm.
- 1,6: Coagula

### **C) Grado de alteración del perfil articular**

1. Normal.
2. Aumento del líquido extraído.
3. Hidartrrosis leve.
4. Hidartrrosis severa con o sin fibrosis de la cápsula.
5. Inflamación articular (aumento de tamaño, dolor y calor).

Al puntaje del índice clínico propuesto le corresponde un mínimo de 2,3 puntos (sin manifestación clínica) y un máximo de 20,1 puntos, considerado de máxima severidad.

**Objetivo 2: Evaluar si existe una relación entre la presencia u ausencia de signos clínicos y los cambios bioquímicos tempranos en el líquido sinovial.**

A los efectos de evaluar el valor de los diferentes niveles de BMs en relación al índice clínico, se trabajó con los valores de referencia de citoquinas y MMPs en líquido sinovial establecidos previamente en nuestro laboratorio (Tabla 1). (Chiappe Barbará y col, 2016)

Tabla 1. Valores de referencia (valor medio  $\pm$  SD) de citoquinas (pg/ml) y MMP 2 y MMP 9 (% de un control interno) según edad y estado clínico (Chiappe Barbará y col., 2016).

	Potrillos	Adultos (3-14 años)			Adultos (>15 años)
	(1-2 años)	bajo	medio	alto	
IL-1 $\beta$	120.96 $\pm$ 42.49 <sup>a</sup>	37.37 $\pm$ 12.25 <sup>b</sup>	61.75 $\pm$ 7.02	171.56 $\pm$ 132.68	57.12 $\pm$ 8.38
IL-4	6.10 $\pm$ 1.43 <sup>d,g</sup>	2.94 $\pm$ 0.93 <sup>a,d</sup>	7.41 $\pm$ 0.71 <sup>d,g</sup>	14.61 $\pm$ 5.37 <sup>g</sup>	10.83 $\pm$ 4.20 <sup>c</sup>
IL-6	115.14 $\pm$ 52.49	62.68 $\pm$ 25.16	148.66 $\pm$ 28.86	363.73 $\pm$ 123.06 <sup>e</sup>	134.21 $\pm$ 45.24
TNF- $\alpha$	41.42 $\pm$ 13.64 <sup>a</sup>	30.61 $\pm$ 6.39	46.45 $\pm$ 10.94	108.71 $\pm$ 50.39 <sup>e</sup>	86.35 $\pm$ 43.25 <sup>e</sup>
MMP 2	140.47 $\pm$ 61.98 <sup>a</sup>	63.23 $\pm$ 25.61	128.27 $\pm$ 24.80 <sup>f</sup>	354.29 $\pm$ 174.88 <sup>e</sup>	49.13 $\pm$ 18.50
MMP 9	55.45 $\pm$ 58.17 <sup>a,e</sup>	0.34 $\pm$ 0.15	11.19 $\pm$ 3.96	85.95 $\pm$ 47.97 <sup>e</sup>	8.28 $\pm$ 7.63
n	21	34	29	21	18

IL, interleuquina; MMP, metaloproteinasas de matriz; SD, desvío estándar TNF, factor de necrosis tumoral.

<sup>a</sup> P < .001 vs. Adultos mayores; <sup>b</sup> P < .05 vs. Alto; <sup>c</sup> P < .01 vs. Alto; <sup>d</sup> P < .001 vs. Alto; <sup>e</sup> P < .001 vs. los otros grupos, <sup>f</sup> P < .05 vs. Adultos mayores; <sup>g</sup> P < .01 vs Adultos mayores

Los resultados de la medición de las citoquinas y MMPs se dividieron en 3 categorías etarias, potrillos, adultos y mayores de 15 años, debido a que los resultados de los animales jóvenes y mayores presentaban un comportamiento diferencial con el grupo de adultos y los adultos, entre ellos.

En el grupo de animales adultos, en la mayoría de las variables estudiadas se observó una distribución claramente definida en grupos *bajo*, *medio* y *alto*. Sin embargo en el caso del TNF- $\alpha$  y la IL-1  $\beta$  la distribución en tres grupos no fue tan marcada no encontrándose diferencia significativa entre los valores medios del grupo *bajo* y *medio*.

Respecto a la IL-1  $\beta$  se observó que los potrillos sanos presentaban un valor más elevado que el resto de los otros grupos. El valor medio del grupo de potrillos fue superado, aunque no significativamente ( $p > 0.005$ ), por el grupo de adultos con valores elevados.

Finalmente, utilizando el índice clínico propuesto en 123 animales y en asociación con los resultados de los niveles de citoquinas y MMPs en el líquido sinovial se clasificó a la población en los siguientes rangos o categorías:

Grupo 1: **Potrillos** Equinos jóvenes entre uno y dos años, los cuales no presentaban alteraciones clínicas articulares, ni variaciones de los biomarcadores debido a OCD.

Grupo 2: **Basal**. Equinos adultos con **índice clínico no superior a 4**. Animales clínicamente sanos, sin alteraciones en los BMs articulares inflamatorios o con leves alteraciones de los mismos.

Grupo 3: Equinos adultos con **índice clínico 4-6** con leve sintomatología clínica de OA.  
**3a forma no activa** con disminución de IL-4  
**3b forma activa** con aumento de varios BMs.

Grupo 4: Equinos adultos con **índice clínico 6-10** con sintomatología de OA con/sin deformaciones articulares.  
**4a forma no activa** con leve aumento general de BMs  
**4b forma activa** con aumento de MMP 2, expresión de MMP 9 y elevada la IL-6 y otros BMs.

Grupo 5: **Gerontes**. Equinos adultos mayores de 15 años. Síntomas crónicos de OA por envejecimiento, con aumento de algunos BM y disminución de otros, característicos del proceso de envejecimiento.

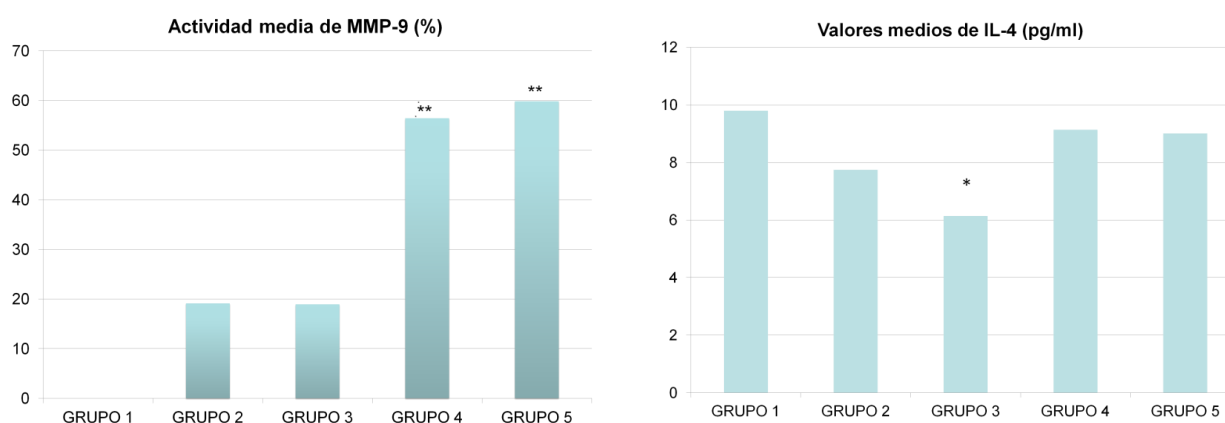
El grupo de estudio inicial fue seguido a lo largo del tiempo, 4 años, y en muchos casos animales que inicialmente habían sido clasificados como clínicamente sanos presentaron signos de OA que había sido detectada precozmente por los BMs.

Una vez comprobada la respuesta de las diferentes citoquinas y MMPs en cuadros de OA en sus distintos estadios, agudo, en período de remisión y crónico se efectuó la correlación de esos resultados con el índice clínico para validarlo y poder utilizarlo sistemáticamente en el diagnóstico clínico de la OA, al menos en las localizaciones tarsianas ( $r^2= 0.65$  para MMP 2 y  $r^2= 0.82$  para MMP 9) (Perrone y col., 2013).

Es de destacar que en cada uno de los grupos de índice clínico se observaron dos subdivisiones, individuos con citoquinas y MMPs normales y otro grupo con BMs elevados, incluso entre aquellos con índice clínico bajo.

Aparentemente la modificación o elevación de las citoquinas y MMPs es un signo precoz que antecede a la alteración del índice clínico. Por otra parte en las diferentes categorías clínicas se observaron diferentes combinaciones siendo el descenso de la IL-4 un signo incipiente de alteración en el entorno articular. Por ejemplo, en los animales del grupo 4b, se observó un perfil característico, presente en un 30 % de los animales, caracterizado por IL-4 e IL-6 elevadas acompañadas de MMP 2 elevada. En el grupo basal y grupo 3b con citoquinas elevadas en un 25 % se presentó la asociación de IL-1  $\beta$  e IL-6 elevada pero con IL-4 normal o disminuida y MMP 2 normal. Y en los índices superiores más de 13 fue muy habitual encontrar la expresión de la MMP 9, ausente en el grupo Basal y valores de MMP 2 elevados (Fig.3).

Figura 3. Actividad media de MMP 9 y valores medios de IL-4.



\*  $p < 0.05$ \*\* vs grupo 1;  $p < 0.01$  vs grupo 2 y 3

## **Objetivo complementario: Caracterización del perfil proteómico del líquido sinovial**

En la tabla 2 se observan los resultados del nivel proteico y urea en líquido sinovial de animales sanos y enfermos. La correlación entre proteínas totales y urea dio una correlación  $r^2=0,120$  (Bottini y col., 2013)

Tabla 2. Proteínas totales, albúminas y urea de animales sanos y enfermos. (Adaptado de Bottini y col., 2013).

	Proteínas totales	Albuminas	Urea
Sanos	1.366 ± 0.1517	0.7562 ± 0.09921	41.59 ± 4.320
Osteoartríticos	2.133 ± 0.2723*	1.090 ± 0.1729	43.54 ± 2.445

\* $p<0,05$

Respecto a la determinación de la PCR la técnica utilizada en suero detecta concentraciones mayores a 6 mg/l. La determinación se realizó por visualización macroscópica de aglutinación. La PCR resultó positiva en uno solo de los animales con enfermedad activa tanto en la muestra de líquido sinovial como de suero. Dichas muestras fueron tituladas y los niveles resultaron de 6 a 12 mg/l.

No se observan cambios significativos en el perfil proteómico de los líquidos sinoviales. Asimismo los perfiles proteómicos del líquido sinovial fueron similares a los perfiles séricos, siendo la albúmina la proteína mayoritaria del líquido sinovial.

## **8. DISCUSION**

El diagnóstico clínico definitivo de la OA presenta al médico veterinario dificultades debido a la fisiopatología propia de esta enfermedad, como ha quedado documentado en la caracterización clínica secuencial que hemos realizado en 123 equinos de distintas edades, lo que nos ha

permitido evidenciar las variaciones sintomatológicas de OA en sus diferentes estadios y presentaciones.

La OA se caracteriza por tener un inicio en muchos casos poco manifiesto como consecuencia de daño articular diverso que se auto mantiene, y por su curso progresivo, intercalándose periodos de remisión o inactividad de extensión temporal variable, que evoluciona hacia una fase crónica o etapa final de la enfermedad, que incluye neto compromiso del hueso subcondral y tejidos adyacentes. Por este motivo es fundamental el diagnóstico temprano de la enfermedad a fin de favorecer la remisión y que la articulación afectada retorne su trabajo normal, reduciendo el dolor y evitando el deterioro progresivo del cartílago y el compromiso del hueso subcondral subyacente (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007) (McIlwraith, 2005) (Polli y col., 2013).

En ocasiones, el dolor generado en el aparato osteo-articular apendicular tiene su origen en las adaptaciones propias del progreso del entrenamiento y del ejercicio realizado y en otras, se está ante una sinovitis con compromiso óseo subcondral de difícil determinación (Bramlage, 2014).

En algunos casos resulta sencillo ubicar mediante examen clínico el *locus dolendi* con el uso de las maniobras semiológicas clásicas (inspección, palpación, movimientos de flexión), sumadas a métodos complementarios básicos (radiografía y/o anestésicos tronculares) (Monina, 2008). Pero, cuando el dolor se localiza en una articulación se plantea un desafío diagnóstico etiológico. El comienzo y desarrollo insidioso de una OA, así como sus remisiones y recidivas permite sospechar que se está ante esta patología, pero la falta de resultados en el diagnóstico por imágenes en estadios tempranos genera dudas acerca del diagnóstico, pronóstico y tratamiento (Caggiano y col., 2013) (Chávez y col., 2010) (Goodrich y Nelson, 2013) (Kawcak, 2005) (McIlwraith, 2005) (McIlwraith, 2009b) (Polli y col., 2013) (Walsh y Chapman, 2011).

Por otro lado, solo ante un seguimiento periódico y sistemático del paciente es posible detectar los periodos de remisión y recidiva propios de la OA.

El seguimiento de un paciente con OA implica contar con técnicas semiológicas estandarizadas que desarrollen un examen fijo, repetible y con resultados validados por medio de métodos complementarios correlacionados, como ser artroscopías, análisis de biomarcadores, entre otros. (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2009b) (McIlwraith y col., 2010) (McIlwraith y col., 2012).

Para lograr este objetivo, se debe contar con un índice que contemple la mayor parte de las observaciones anamnésticas y clínicas posibles.

En Medicina Humana, se han desarrollado varios índices, algunos de ellos validados por organizaciones que guían el proceder clínico de los médicos actuantes, mientras que otros autores han desarrollado sus propios índices, en algunos casos, para sus propios trabajos experimentales.

Estos índices contemplan amplios cuestionarios anamnésticos, exámenes clínicos, imagenología, histopatología e informes quirúrgicos. La rodilla es la articulación principal sobre la que se enfocan estos índices dado la importancia biomecánica de esta en los deportistas y personas en general. La cadera es la segunda articulación en importancia sobre la que se centran estos índices, por las lesiones sufridas en pacientes de edad (Baltzer y col., 2009) (Crowley y col., 2009) (Jang y col. 2013) (Lequesne, 1997) (Ryu y col., 2012) (Tegner y Lysolm, 1985).

En Medicina Veterinaria, no existe un índice de referencia para la evaluación clínica de la OA en el equino. La AAEP (1991) solo publica una guía de evaluación de claudicaciones basadas en una escala numérica. Algunos autores utilizan diferentes índices, principalmente para fijar criterios de inclusión de pacientes en sus trabajos de investigación sobre tratamientos y BMS. El índice propuesto por estos autores no se suscriben a una sola articulación, sino que incluyen equinos cuyas distintas articulaciones respondan a los criterios seleccionados por ellos para considerarlas osteoartíticas (Broeckx y col., 2014) (Carmona y col. 2007b) (Carmona y col. 2009b) (Gangl y col., 2007).

Mcllwraith y col. (2010) (2012) recomiendan la adaptación de índices de uso humano (índice de Mankin, recomendaciones de la Osteoarthritis Research Society International (OARSI)) para la evaluación anatomopatológica, histológica e histopatológica de modelos experimentales de OA en equinos. Las articulaciones estudiadas son las articulaciones metacarpo-falange sesamoideana y la carpal. El uso de estas articulaciones se debería a que son las que sufren mayormente los procesos de OA en el SPC y esta raza representa, desde el punto de vista económico, la más afectada. (Caggiano y col., 2013) (Ekman, 2005) (Polli y col., 2013).

En esta experiencia, hemos implementado un índice utilizando una combinación de índices clínicos que recibieron un valor numérico cuya suma resultó en un puntaje máximo de 20,1 y

un corte mínimo de 2,3, considerándose este valor el correspondiente al índice clínico de un animal sin alteraciones clínicas (Perrone, y col., 2013). Pero al igual que en el Índice de *Severidad* de la OA de cadera de Lequesne en humanos (Lequesne, 1997) si bien el índice máximo es 20.1 ya el valor mayor de 13 implica un de grado severo de OA.

La elección de la articulación del tarso obedece a causas anatómicas y biomecánicas. El tarso brinda, junto con la babilla, impulsión y estabilidad al miembro posterior, no solo durante los diferentes aires naturales (paso, trote, galope) sino también durante la práctica de diferentes deportes ecuestres. Nosotros hemos elegido equinos dedicados a Saltos Variados, por considerar que este tipo de animales permanece en actividad a edades más avanzadas y es dable observar el desarrollo de la enfermedad en el tiempo.

El tarso es una articulación sumamente compleja que soporta una cantidad importante de stress y es muy propensa a desarrollar artritis temprana. Además el receso sinovial antero posterior de la articulación tibio astragalina es de fácil acceso y se comunica con la articulación intertársica proximal.

Las articulaciones intertársica distal y tarso metatársica se comunican directamente en algunos caballos y raramente la articulación intertársica proximal podría comunicarse con estas dos (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Carmona y col., 2009a) (Holmström y col., 1994a) (Holmström y col., 1994b) (Kramer y col., 2000) (Schumacher y Moll, 2012) (Van Den Bogert y col., 1994) (Wentink, 1978).

En esta experiencia, fue necesario estudiar animales de diferentes edades, niveles deportivos y estadios de la OA. Los equinos dedicados a los deportes ecuestres (Saltos Variados, Dressage, Prueba Completa, Endurance y Pruebas de Rienda) resultaron los más apropiados para este trabajo.

Aparentemente, el índice clínico aumentado será el resultado de la alteración mecánica que la enfermedad articular produce. La evolución del índice clínico en la OA en general es un proceso paulatino, a excepción de lo que ocurre en los casos de artritis aguda, este va aumentando a medida que la función fisiológica del cartílago articular y el hueso subcondral se va alterando con el tiempo de permanencia de la enfermedad activa. Y los periodos de remisión a medida



que avanza la OA son cada vez son de más corta duración. Asimismo al instaurar tratamientos positivos, el índice clínico puede verse mejorado, pero siempre en forma lenta y paulatina.

En el caso de los gerontes se observaron índices clínicos superiores a 7, sin signos aparentes de OA, solo de envejecimiento, y en estos casos los valores en el índice clínico fueron muy difíciles de retrotraer no obstante observar descenso en los BMs.

Una vez desarrollado el índice de evaluación clínica, los sujetos de estudio y la articulación seleccionada como más apropiada a los objetivos, se decidió utilizar BMs sinoviales para validar la definición del índice sugerido.

Los BMs se pueden clasificar en directos e indirectos (Cuadro 1). En la mayoría de las referencias consultadas, se han utilizado los BM directos para el diagnóstico y la evaluación de la evolución de la OA luego de aplicar diferentes tratamientos, mientras que los BM indirectos han sido estudiados con un enfoque más dirigido a la fisiopatología de la OA (Brama y col., 1998) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Carmona y col., 2009a) (Catterall y Cawston, 2002) (Clegg y col., 1997a) (Chávez y col., 2010) (David y col., 2007) (De Grauw y col. 2006) (Feldman y Maini, 2001) (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2009a) (Rolando, y col. 2012) (Todhunter y col., 1996) (Trumble y col., 2001).

Los BMs indirectos del metabolismo del cartílago, estudiados en esta experiencia, han sido las IL-1  $\beta$ , IL-4, IL-6, el TNF- $\alpha$  y las MMPs 2 y 9. Además se evaluó el perfil proteómico y la PCR (Bottini y col., 2013) (Caggiano y col., 2014) (Clegg y col., 1997a) (Clegg y col., 1997b) (De Simone y col. 2011) (De Simone y col., 2012a) (Fietz y col., 2008) (Ley y col., 2007) (Perrone y col., 2013) (Polli y col., 2013) (Trumble y col., 2001).

La IL-1 y el TNF- $\alpha$  son liberados por la membrana sinovial y los condrocitos ante una sinovitis, producto del trauma articular. Ambas citoquinas se liberan en exceso y aumentan la tasa de degradación de proteoglicanos, disminuyen su síntesis o actúan en forma conjunta en ambos procesos. Esto se logra, en parte por la liberación de MMPs y prostaglandina E<sub>2</sub>.

La IL-6 puede ser producida por fibroblastos sinoviales y condrocitos articulares, inducida por la síntesis de IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$ . A su vez, la IL-6 estimula a nivel hepático la síntesis de proteínas de fase aguda como la PCR. El rol de la IL-6 es contradictorio, ya que es una citoquina

proinflamatoria y catabólica, al inhibir la formación ósea y promover la resorción al estimular los osteoclastos. Sin embargo, la IL-6 regula e inhibe las acciones de la IL-1  $\beta$ . Es la razón por la cual la IL-6 se encuentra presente en animales sanos en niveles más bajos y en aquellos afectados de OA en niveles más elevados, tanto en los períodos de remisión clínica como en los de reagudización.

La IL-4 esta es una citoquina que, a diferencia de las proinflamatorias, tiene un rol principalmente regulador limitante de los procesos inflamatorios y degenerativos. Sus acciones regulatorias incluyen la inhibición tanto de la IL-1  $\beta$  como de la IL-6 y el TNF- $\alpha$  mediante la inhibición en la liberación de estas citoquinas por parte de monocitos. Es así que en la fase inicial aguda de la OA es dable observar que sus valores se encuentren inicialmente disminuidos respecto de los valores de referencia para luego evolucionar hacia valores más elevados cuando se instala la fase crónica de la enfermedad (Chiappe Barbará y col, 2016).

Debido a la acción antiinflamatoria de la IL-4 es de relevante importancia la disminución en los niveles encontrados en líquido sinovial de los animales clasificados dentro del grupo 3a (leve sintomatología clínica), ya que puede deberse a un efecto fisiológico en el cual el proceso inflamatorio trata de contrarrestar la noxa que afecta a la articulación correspondiente. Sin embargo no hay que perder de vista que el proceso inflamatorio puede perdurar a través del tiempo, con lo cual deja de jugar un rol fisiológico para transformarse en un hecho patológico con lo cual los bajos niveles del IL-4 no pueden llegar a limitar las acciones inflamatorias.

En los grupos clínicos de mayor grado, la IL-4 vuelve a aumentar a los niveles basales e incluso en algunos casos aumentar al doble del basal, pero en forma asociada con niveles elevados de IL-6. Por otra parte, pareciera observarse que los niveles elevados de biomarcadores se presentan más asiduamente en la categoría de mayor índice clínico y que, generalmente, comprenden a animales de mayor edad con alteraciones de mayor cronicidad.

Los resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo mostraron la ausencia de BMs en animales sanos o en períodos de remisión y su presencia en animales con OA activa, coincidiendo con Trumble y col. (2001) y Clegg y col. (2007a) (2007b). Sin embargo nosotros hemos aportado el conocimiento que en animales con ausencia de síntomas clínicos es dable encontrar BMs elevados como indicador precoz de futuras OA (Polli y col., 2013) (Rolando y col. 2012).

El TNF- $\alpha$  es el principal mediador de la respuesta aguda que desencadena el proceso osteoartrítico. El aumento del TNF- $\alpha$  se produce en los primeros momentos del proceso inflamatorio, por lo que es muy probable no encontrarlo en niveles elevados en el líquido sinovial. En nuestra experiencia, el TNF $\alpha$  se encontró en poca cantidad de caballos tanto clínicamente sanos como en fase no activa de la OA, coincidiendo con Trumble y col. (2001) y Ley y col. (2007). Por lo tanto, su valor radica en encontrarlo presente en niveles elevados para confirmar el proceso inflamatorio agudo (Polli y col., 2013), situación que es dable reproducir en la artritis experimental con adyuvante intra articular (De Simone y col., 2013b).

Pero a la inversa, su ausencia no tiene valor diagnóstico para determinar la no existencia de la enfermedad. Su utilidad es manifiesta al evaluar su disminución post tratamiento. En este punto también es importante mencionar la relación existente entre TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$  ya que la liberación del TNF- $\alpha$  produce un aumento en la liberación de IL-1  $\beta$  y ésta tiene mayor capacidad de activación de los tipos celulares antes descritos para la liberación de MMPs. La IL-1  $\beta$  se presentó elevada en los animales que se encontraban en fase activa de la OA como puede observarse en la sub clasificación “b” de las distintas categorías del índice clínico presentado en esta tesis en Tabla 1, (página 21). A su vez se debe considerar que para reducir la liberación de MMPs, habría que inhibir también la IL-6 porque se plantea un efecto redundante en el cual ante la ausencia de una, la otra llevaría a cabo las acciones, por lo tanto si se inhibe solamente una de las dos, la actividad enzimática no se vería reducida (Brama y col., 1998) (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Carmona y col., 2009a) (Catterall y Cawston, 2002) (Clegg y col., 1997a) (Chávez y col., 2010) (David y col., 2007) (De Grauw y col. 2006) (De Simone y col., 2011) (Feldman y Maini, 2001) (Ley y col., 2007) (Polli y col., 2013) (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2009a) (Rolando, y col. 2012) (Todhunter y col., 1996) (Trumble y col., 2001).

Por otra parte, los valores alterados en los niveles basales de citoquinas y MMPs están relacionados con el grado de actividad de la enfermedad, pudiendo presentarse las alteraciones en los biomarcadores siguiendo distintos patrones de variación en sus niveles, independientemente del grupo de índice clínico al que el animal pertenezca. Sin embargo, en algunos casos estas variaciones se presentan con mayor incidencia en algún grupo clínico, por ejemplo en el grupo 2 y 3 del índice clínico es habitual observar la disminución de la IL-4 como signo precoz de alteración.

Hemos comunicado la presencia de IL-6 tanto en equinos sanos y con OA en período de remisión o activa, pero con elevaciones significativas en las articulaciones con OA activa (Caggiano y col. 2014) (De Simone y col. 2011), coincidiendo con Ley y col. (2007) y Trumble y col. (2001). En equinos clínicamente sanos, pero con elevación de IL-6, dado que es una citoquina proinflamatoria se podría considerar que estos animales estaban en período de remisión o que ya existía una destrucción del cartílago articular (Caggiano y col. 2014) (De Simone y col. 2011) (Polli y col., 2013). Pelletier y col. (2010), al realizar la evaluación de tratamientos para la OA de rodilla en pacientes humanos, informó que los valores basales elevados de IL-6 son predictivos de un mayor riesgo de pérdida de cartílago articular.

Las MMPs 2 y 9 se encuentran aumentadas en proceso patológicos osteoarticulares, superando las concentraciones de TIMs. Sin embargo, la MMP 2 no presenta valores tan elevados como la MMP 9 en estos cuadros y puede considerarse que presenta una acción homeostática al remover el cartílago anormal o envejecido. Por otro lado, la MMP 9 o bien no se puede detectar en condiciones normales o se encuentra en valores basales muy bajos, aumentando notablemente en cuadros de OA, artritis sépticas de evolución lenta y artritis reumatoidea en el ser humano. Por lo tanto, según el perfil de MMPs presentes, se puede inferir que se está ante un cuadro de remodelación normal mediada por la MMP 2 o ante una intensa degradación del cartílago con expresión aumentada de la MMP 9. Es necesario tener en cuenta la edad de los sujetos a evaluar, ya que equinos deportistas jóvenes presentan un metabolismo articular elevado propio de los procesos de remodelación anabólica (Brama y col., 1998) (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Catterall y Cawston, 2002) (Clegg y col., 1997a) (Clegg y col., 1997b) (Chávez y col., 2010) (Chiaradia y col., 2012) (De Simone y col., 2012a) (Fietz y col., 2008) (McIlwraith, 2001) (Polli y col., 2013) (Rolando, y col. 2012) (Trumble y col. 2001).

En nuestros trabajos hemos observado valores bajos de MMP 2 y ausencia de MMP 9 en animales clínicamente sanos (Chiappe Barbará y col 2016). En animales con OA en período activo, la MMP 2 aumentó significativamente ( $p < 0.001$ ) sobre los valores de referencia en equinos sanos. La MMP 9 aumentó levemente en equinos en fase de remisión no activa y en valores superiores en fase crónica de la enfermedad. Resta aclarar que en los animales adultos con perfil de citoquinas bajo, índice de no actividad de la enfermedad, la MMP9 es igual a 0. Pero, en aquellos animales con manifestación clínica de OA los niveles de esta MMP aumentan, prácticamente en todos ellos, haciéndose detectable por el método utilizado (Tabla 1) (Fig. 3).

También se presenta elevada la MMP 9 en los potrillos, aparentemente esto guardaría relación con el intenso crecimiento óseo en esta etapa de la vida. Sin embargo, en los potrillos normales más grandes de dos años su valor también se hace no detectable (Caggiano y col., 2014) (Chiappe Barbará y col., 2016) (De Simone y col. 2011) (De Simone y col. 2012a) (De Simone y col. 2013a) (Perrone y col., 2013). Se encontraron referencias similares en Brama y col. (1998), Fietz y col. (2008) y Trumble y col. (2001).

El líquido sinovial es un filtrado del plasma que cumple con la función de nutrir al cartílago y amortiguar el estrés mecánico sobre las articulaciones. Este fluido es abundante en proteínas séricas y ácido hialurónico. Los procesos inflamatorios aumentan la permeabilidad vascular y por lo tanto esto puede aumentar el volumen del filtrado y la concentración de proteínas.

Además, como se sugiere que la síntesis de IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$  podrían inducir la producción de IL-6, y en consecuencia de PCR, se evaluó la PCR como indicador de fase aguda de inflamación. La PCR es sintetizada en el hígado y activa la clásica vía del complemento en respuesta a la reacción inflamatoria. El aumento de la PCR de hasta 2000 veces superior al normal, se produce en las primeras 24-48 horas del proceso inflamatorio, aunque dicho aumento no es específico y no se mantiene en el tiempo ya que disminuye rápidamente en suero (Caggiano y col., 2013) (Chiaradia y col., 2012) (McIlwraith, 2009b) (Polli y col., 2013).

La PCR resultó positiva en el líquido sinovial de uno solo de los animales con enfermedad activa, y los niveles hallados resultaron de 6 a 12 mg/l respectivamente en los dos tarsos (Polli y col., 2013). En Medicina Humana, el nivel basal y las variaciones de PCR a lo largo del tiempo fueron buenos indicadores de la evolución de los síntomas y de la respuesta a los distintos tratamientos de OA de rodilla, disminuyendo a medida que avanzaban los mismos (Pelletier y col., 2010).

Para evaluar el efecto de la dilución de proteínas se midió la urea del líquido sinovial (objetivo complementario), la cual se mantiene en individuos normales en los mismos valores que en suero. En los casos de hidrartrosis, la urea encontrará disminuida ya que el volumen de agua aumenta y diluye las proteínas y el resto de los componentes del líquido sinovial.

El valor de proteínas totales guardó relación con el grado de lesión clínica, esto podría ser de utilidad para caracterizar diagnósticos y tratamientos en la enfermedad articular. Además la

evaluación de la urea permite corregir posibles efectos de dilución en los casos de hidrartrosis con abundante filtrado de agua (Bottini y col., 2013) (Polli y col., 2013).

Una vez comprobada la respuesta de las diferentes citoquinas y MMPs ante los cuadros de OA en sus distintos estadios, agudo, en período de remisión y crónico, este se validó como un método complementario útil para la confirmación diagnóstica de OA, sobre todo en estadios precoces sin alteraciones radiológicas o en periodos de remisión sin alteraciones clínicas (Perrone y col., 2013).

## 9. CONCLUSIONES

Los equinos que presentaron sintomatología clínica compatible con OA, tuvieron alteraciones en los valores de citoquinas, MMPs y perfiles proteómicos en líquido sinovial, mientras aquellos libres de síntomas, presentaron valores compatibles con articulaciones normales. Sin embargo, animales sin síntomas clínicos evidentes o subclínicos presentaron alteraciones en el perfil de citoquinas y MMPs como un signo precoz de alteración del medio intraarticular o como indicador del estadio de remisión clínica.

El índice clínico presentó alta correlación con las modificaciones bioquímicas agudas, crónicas o recidivantes en equinos con OA o en equinos sin presencia de la enfermedad.

El índice clínico diseñado puede ser utilizado en el diagnóstico clínico de OA ya que los BMs sinoviales validan su evolución tanto positiva como negativa. De la misma manera, los BMs estudiados en esta experiencia pueden ser utilizados como métodos complementarios precoces en la detección, seguimiento y evolución terapéutica de OA.

### Propuesta a futuro

Analizando los distintos casos clínicos estudiados durante el transcurso de esta experiencia, restaría determinar cómo se combinan los valores bajo, medios y elevados de las distintas citoquinas. Es decir, si estos valores se presentan elevados en forma conjunta o si se puede determinar algún perfil característico para las distintas etapas de evolución de la OA. Por ejemplo, si un individuo que tiene elevada la IL-1  $\beta$  tendría probablemente elevada la IL-4, aunque en la fase aguda de la OA, en general, la IL-4 se encuentra transitoriamente en valores

más bajos que los de referencia. O poder determinar cuál es el perfil característico de la forma activa de la OA. Se podría sugerir que valores de IL-6 superiores a 200 pg/ml son indicativos de forma activa de la enfermedad, máxime si se encuentran acompañados de valores de MMP 2 mayores de 250 % e IL-4 superior a 13 pg/ml.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- AAEP, American Association of Equine Practitioners. 1991. Guide for veterinary service and judging of equestrian events: definition and classification of lameness. Lexington: AAEP, USA, 19.
- Baltzer, A. W. A.; Moser C.; Jansen S. A; Krauspe, R. 2009. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 17: 152-160.
- Brama, P. A. J.; TeKoppele, J. M.; Beekman, B.; Van Weeren, P. R.; Barneveld, A. 1998. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and Osteocondrosis. *Ann Rheum Dis*. 57: 697–699.
- Bramlage, L. R. 2014. Respuesta del hueso al ejercicio de alta velocidad. *Revista de la Asociación Argentina de Veterinaria Equina*. Año 13, 49: 12-28.
- Broeckx, S.; Zimmerman, M.; Crocetti, S.; Suls, M.; Mariën, T.; Ferguson, S. J.; Koen Chiers, K.; Duchateau, L.; Franco-Obregón, A.; Wuertz, K.; Spaas, J. H. 2014. Regenerative Therapies for Equine Degenerative Joint Disease: A Preliminary Study. *PLoS ONE* 9 (1): e85917. doi:10.1371/journal.pone.0085917.
- Bottini, M., Álvarez, E., Perrone, G., Díaz, J., Rubatino, F., Marino, M., De Simone, E., Chiappe Barbará, A. 2013. Evaluación preliminar de parámetros del perfil proteico en líquido sinovial proveniente de equinos sanos y con osteoartritis. XXIV Conferencias de Veterinaria Equina. Asociación Argentina de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina.
- Caggiano, N.; Perrone, G.; Montes de Oca, CH; Dodera, C; De Simone, E.; Chiappe Barbará, M. A. 2014. Relación entre el diagnóstico clínico de osteoartritis y biomarcadores moleculares específicos en equinos. IV JORNADAS DE JOVENES INVESTIGADORES EN CIENCIAS VETERINARIAS. Facultad de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Argentina.



- Caggiano, N.; Chiappe Barbará, M. A.; De Simone, E.; Ferretto, A.; Lastra, Y.; Perrone, G.; Rubatino, F. 2015. Análisis del uso terapéutico de anti-tnf- $\alpha$  en 3 equinos con osteoartritis crónica. XXIII JORNADAS DE JOVENES INVESTIGADORES. GRUPO MONTEVIDEO. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- Cargile, J. L.; MacKay, R. J.; Dankert, J. R.; Skelley, L. 1995. Effect of treatment with a monoclonal antibody against equine tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic, and circulating TNF responses of miniature horses given endotoxin. *Am J Vet Res.* 56 (11):1451-9.
- Carmona, J. U.; Argüelles, D.; Climent, F.; Prades, M. 2007b. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A Preliminary Pilot Clinical Study *Journal of Equine Veterinary Science.* 27, 4: 167-170.
- Carmona, J. U.; Argüelles, D.; Prades, M. 2009a. Efectos bioquímicos y clínicos del hialuronato oral en caballos Andaluces jóvenes con osteocondrosis tarsocrural. *Arch Med Vet.* 41: 139-147.
- Carmona, J. U.; López, C.; Prades, M. 2009b. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. *Arch Med Vet* 41, 175-179.
- [http://www.cartilage.org/files/contentmanagement/ICRS\\_evaluation.pdf](http://www.cartilage.org/files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf)
- Catterall, J. B.; Cawston, T. E. 2002. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Research and Therapy.* 5, 1: 12-24.
- Clegg, P. D.; Burke, R. M.; Coughlan, A. R.; Riggs, C. M.; Carter, S. D. 1997a. Characterization of equine matrix metalloproteinases 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Vet J.* 29, (5): 335-342.
- Clegg, P. D.; Coughlan, A. R.; Riggs, C. M., Carter, S. D. 1997b. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet J.* 29, (5): 343-348.

- Crowley, D. C.; Lau, F. C.; Sharma, P.; Evans, M.; Guthrie, N.; Bagchi, M.; Bagchi, D.; Dey, D. K.; Raychaudhuri, S. P. 2009. Safety and efficacy of undenatured type II collagen in the treatment of osteoarthritis of the knee: a clinical trial. *Int J Med Sci*; 6, (6):312-321.
- 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.
- Chiaradia, E.; Pepe, M.; Tartaglia, M.; Scopetta, F.; D'Ambrosio, C.; Renzone, G.; Avellini, L.; Moriconi, F.; Gaiti, A.; Bertuglia, A.; Beccati, F.; Scaloni, A. 2012. Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. *Journal of Proteomics*. 75: 4478 – 4493.
- Chiappe Barbará, M. A.; Perrone, G.; Caggiano, N.; Lastra, Y.; Rubiano, F.; De Simone, E. 2016. Determination of reference values of cytokines and matrix metalloproteinases in synovial fluid of horses of different ages. *Journal of Equine Veterinary Science*. Enviado.
- David, F.; Farley, J.; Huang, H.; Lavoie, J-P.; Laverty, S. 2007. Cytokine and Chemokine Gene Expression of IL-1b Stimulated Equine Articular Chondrocytes. *Veterinary Surgery*. 36:221–227.
- De Grauw, J.; Brama, P.; Wiemer, P.; Brommer, H.; Van de Lest, C.; Van Weeren, R. 2006. Cartilage-derived biomarkers and lipid mediators of inflammation in horses with osteochondritis dissecans of the distal intermediate ridge of the tibia. *Am J Vet Res.* 67, 7: 1157-1162.
- De Simone E.; Isla L.; Caggiano N.; Marino M.; Perrone G.; Chiappe Barbará A. 2011. Evaluación de parámetros inflamatorios en líquido sinovial de articulaciones clínicamente normales y osteoartíticas de equinos deportivos. XII Conferencias de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina.
- De Simone, E.; Perrone, G.; Caggiano, N.; Polli, M.; Rolando, J.; De Luca Sarobe, V.; Marino, M.; Chiappe Barbará, A. 2012a. Estudio de la actividad de metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y 9) en líquido sinovial de equinos con patología articular. XXIII Conferencias de Veterinaria Equina. Asociación Argentina de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina.

- De Simone, E., Perrone, G., Caggiano, N., Polli, M., Rolando, J., Lastra, Y., Montes de Oca, Ch, De Luca Sarobe, V., Chiappe Barbará, A. 2013a. Terapia biológica con anti-TNF- $\alpha$  para el tratamiento de la osteoartritis recidivante en el equino deportivo. XXIV Conferencias de Veterinaria Equina. Asociación Argentina de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina.
- De Simone, E., Caggiano, N., Polli, M., Rolando, J., Lastra, Y., Gullace, F., Ritaccoc E., De Luca Sarobé, V., Chiappe Barbará, A. 2013b. Efecto del alendronato sobre el perfil de citoquinas y metaloproteinasas 2 y 9 en un modelo múrido de artritis experimental. Rev. Colomb Reumatol. 20(4):202-210.
- Ekman, S. 2005. Involvement of the Cartilage/Bone Junction in Equine Osteoarthritis (Oa) of the Middle Carpal Joint. Proceedings of a Workshop on Equine Musculoskeletal Biomarkers. Colorado, USA, 30<sup>th</sup> October – 2<sup>nd</sup> November 2005 Havemeyer Foundation Monograph series 22: 26-31.
- Feldman, M.; Maini, R. 2001. Anti-TNF $\alpha$  Therapy of Rheumatoid Arthritis: What Have We Learned? Annu. Rev. Immunol. 19: 163-196.
- Fietz, S.; Einspanier, R.; Hoppner, S.; Hertsch, B.; Bondzio, A. 2008. Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. Equine Vet J. 40, (3): 266-71.
- Gangl, M.; Serteyn, D.; Lejeune, J.; Schneider, N.; Grulke, S.; Peters, F; Vila, T; Deby-Dupont G.; Deberg; M; Henrotin, Y. 2007. A type II-collagen derived peptide and its nitrated form as new markers of inflammation and cartilage degradation in equine osteochondral lesions. Res in Vet Science. 82: 68–75.
- Goodrich, L. R.; Nelson, B. B. 2013. Joint Disease Treatment. Proceedings of the 13th International Congress of the World Equine Veterinary Association. October 3 - 5, 2013. Budapest, Hungary. 1-12.

- Goranov, N. V. 2012. Clinical changes in sodium monoiodoacetate–induced stifle osteoarthritis model in dogs. *Vet. World.* 5(3):138-144.
- Heinegård, D. 2005. Does Inflammation Trigger Tissue Destruction or is Tissue Destruction Activating Inflammation in Joint Disease? Proceedings of a Workshop on Equine Musculoskeletal Biomarkers. Colorado, USA, 30<sup>th</sup> October – 2<sup>nd</sup> November 2005 Havemeyer Foundation Monograph series 22: 13.
- Heinecke, L. F.; Grzanna, M. W.; Au, A. Y.; Mochal, C. A; Rashmir-Raven, A.; Frondoza C. G. 2010. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate. *Osteoarthritis and Cartilage.* 18, 220-227.
- Henson, F. M. D.; Davies, M. E.; Schofield, P. N.; Jeffcott, L. B. 1996. Expression of *types II, VI and X* collagen in equine growth cartilage during development. *Equine Vet J.* 28, 3: 189-198.
- Henson, F. M. D.; Davenport, C.; Butler, L.; Moran, I.; Shingleton, W. D.; Jeffcott, L. B.; Schofield, P. N. 1997. Effects of insulin and insulin – like growth factors I and II on the growth os equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine Vet J.* 29, 6: 441-447.
- Holmström; M.; Fredricson, I.; Drevemo, S. 1994a. Biokinematic differences between riding horses judged as good and poor at the trot. *Equine Vet J.* 26, S17: 51–56.
- Holmström, M.; Fredricson, I.; Drevemo, S. 1994b. Biokinematic analysis of the Swedish Warmblood riding horse at trot. *Equine Vet J.* 26, 3: 235–240.
- Jang, S-J; Kim, J-D; Cha, S-S. 2013. Platelet-rich plasma (PRP) injections as an effective treatment for early osteoarthritis. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology.* 23, 5: 573-580.
- Jeffcott, L. B. 1996. Osteochondrosis – An international problema for the horse industry. *J Equine Vet Science.* 16, 1: 32-37.

- Kawcak, C. E. 2005. Imaging Biomarkers: Where Are We Going?. Proceedings of a Workshop on Equine Musculoskeletal Biomarkers. Colorado, USA, 30<sup>th</sup> October – 2<sup>nd</sup> November 2005 Havemeyer Foundation Monograph series 22: 16-17.
- Kellgren, J. H.; Lawrence, J. S. 1957. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Annals of the rheumatic diseases* **16** (4): 494–502.
- Kramer, J.; Keegan, K.; Wilson, D.; Smith, B.; Wilson, D. 2000. Kinematics of the hind limb in trotting horses after induced lameness of the distal intertarsal and tarsometatarsal joints and intra-articular administration of anaesthetic. *Am J of Vet Res.* 61, 9:1031-1036.
- Lacourt, M.; Gao, C.; Li, A.; Girard, C.; Beauchamp, G.; Henderson, J.E.; Laverty, S. 2012. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 20: 572-583.
- Ley, C.; Ekman, S.; Elmén, A.; Nilsson, G.; Eloranta, M.-L. 2007. Interleukin-6 and Tumour Necrosis Factor in Synovial Fluid from Horses with Carpal Joint Pathology. *Journal of Veterinary Medicine Series A.* 54, 7: 346-351.
- Lequesne, M. G. 1997. The algofunctional indices for hip and knee osteoarthritis. *J Rheumatol.* 24: 779-781.
- McIlwraith, C. W. 2001. Joint disease in the horse. Proceedings of a Workshop on Equine Immunology. Santa Fe, New Mexico, USA, 24<sup>th</sup>– 28<sup>th</sup> January 2001 Havemeyer Foundation Monograph series 4: 94-96.
- McIlwraith, C. W. 2005. Use of Synovial Fluid and Serum Biomarkers in Equine Bone and Joint Disease: A Review. Proceedings of a Workshop on Equine Musculoskeletal Biomarkers. Colorado, USA, 30<sup>th</sup> October – 2<sup>nd</sup> November 2005 Havemeyer Foundation Monograph series 22: 1-5.
- McIlwraith, C. W. 2009a. Osteoarthritis (Degenerative Joint Disease) - An Update. Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association. Guarujá, SP, Brazil. 24 – 27 September 2009.

- McIlwraith, C. W. 2009b. Advances in Joint Disease. Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association. Guarujá, SP, Brazil. 24 – 27 September 2009.
- McIlwraith, C. W.; Frisbie, D. D.; Kawcak, C. E.; Fuller, C. J.; Hurtig, M.; Cruz, A. 2010. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis and Cartilage*. 18: 93-105.
- McIlwraith, C. W.; Cox, B; Frisbie, D. D; Kawcak C. E. 2012. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res*. 1, 11: 297-309.
- Monina, M. 2008. Diagnóstico clínico de las principales patologías locomotoras del equino. XXVII Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias. Villa Giardino, Córdoba, Argentina, 26, 27 y 28 de setiembre de 2008. Colegio Médico Veterinario de la Provincia de Córdoba.
- Oke, S.; McIlwraith, C. W. 2010. Review of the Economic Impact of Osteoarthritis and Oral Joint-Health Supplements in Horses. Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. Baltimore, Maryland, USA. December 4-8, 2010. 12-16.
- Ordás Calvo, C.; Ballina García, F. J.; Jalón Monzón, A.; Álvarez Castro, C.; Viña Alonso, L.M.; Rodríguez Pérez, A. 2000. Una osteopenia radiológica. *Medicina Integral*. 36 (07).
- Pelletier, J.P.; Raynauld, J.P.; Caron, J.; Mineau, F.; Abram, F.; Dorais, M.; Haraoui, B.; Choquette, D.; Martel-Pelletier, J. 2010. Decrease in serum level of matrix metalloproteinases is predictive of the disease-modifying effect of osteoarthritis drugs assessed by quantitative MRI in patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 69 (12): 2095-101.
- Perrone, G.; De Simone, E.; Marino, M.; Chiappe Barbará, A. 2013. Interrelación de criterios diagnósticos para la implementación de tratamientos en la enfermedad articular del equino deportivo: casos clínicos. XXIV Conferencias de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Veterinaria Equina.

- Polli, M.; Caggiano, N.; Rolando, J.; Perrone, G.; Marino, M.; De Simone, E.; Chiappe Barbará, A. 2013. Variación del nivel de citoquinas en líquido sinovial de equinos con enfermedad articular tratado con bifosfonatos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 7 (1): 69-83.
- Rolando, J.; Polli, M.; Caggiano, N.; Perrone, G.; De Simone, E.; Chiappe Barbará, A. 2012. Aplicación de la determinación de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) en las enfermedades articulares equina. *La Especie Equina*. 10, 40: 52-55.
- Ryu, J. H.; Lee, A.; Huh, M. S.; Chu, J.; Kim, K.; Kim, B-S; Choi, K.; Kwon, I. C.; Park, J. W.; Youn, I. 2012. Measurements of MMP activity in synovial fluid in cases of osteoarthritis and acute inflammatory conditions of the kneejoints using a fluorogenic peptide probe-immobilized diagnostic kit. *Theranostics*. 2, (2): 198–206.
- Schumacher, J.; Moll, H. D. 2012. Synoviocentesis. En: *A Manual of Equine Diagnostic Procedures*, Schumacher J. and Moll H.D. (Eds.). Publisher: Teton NewMedia, Jackson, WY, USA ([www.tetonnm.com/](http://www.tetonnm.com/)). Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Last updated: 30-Apr-2012; A5426.0412.
- Tegner, Y.; Lysolm, J. 1985. Rating Systems in the Evaluation of Knee Ligament Injuries. *Clinical Orthopedics and Related Research*. 198: 43-49.
- Todhunter, P. G.; Kincaid, S. A.; Todhunter, R. J.; Kammermann, J. R.; Johnstone, B.; Baird, A. N.; Hanson, R. R.; Wright, J. M.; Lin, H.C.; Purohit, R. C. 1996. Immunohistochemical analysis of an equine model of synovitis-induced arthritis. *Am J Vet Res*. 57 (7): 1080-93.
- Trumble, T. N.; Trotter, G. W.; Thom Oxford, J. R.; , McIlwraith, C. W.; Cammarata, S.; Goodnight, J. L.; Billinghamurst, R. C.; Frisbie, D. D. 2001. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinases and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am J of Vet Res*. 62, 9: 1467-1477.
- Van Den Bogert, A. J.; Jansen, M. O.; Deuel, N. R. 1994. Kinematics of the hind limb push-off in elite show jumping horses. *Equine Vet J*. 26, S17: 80–86.

- Walsh, D. A.; Chapman, V. 2011. Bisphosphonates for osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 13:128. <http://arthritis-research.com/content/13/5/128>
- Wentink, G. H. 1978. Biokinetical Analysis of the Movements of the Pelvic Limb of the Horse and the Role of the Muscles in the Walk and the Trot. *Anat. Embryol.* 152: 261-272.