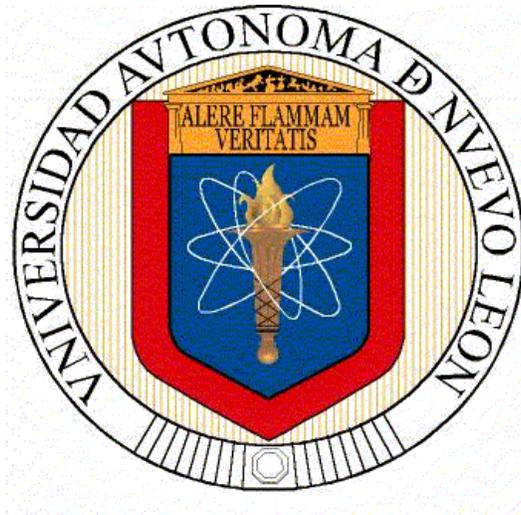


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

**INMUNOLocalización DE LA CATEPSINA B EN CARTÍLAGO
ARTICULAR FETAL EQUINO DESPUÉS DE UNA PRUEBA DE
IMPACTO**

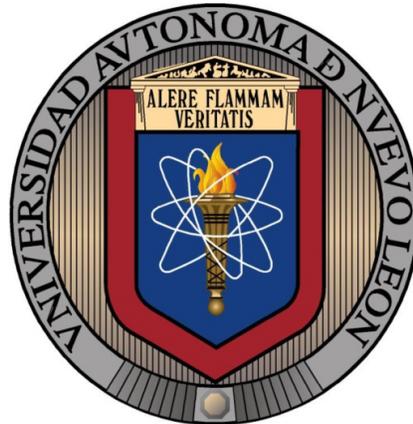
POR

EDSON ANTONIO SANTAMARÍA MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POGRADO CONJUNTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA CATEPSINA B EN CARTÍLAGO ARTICULAR
FETAL EQUINO DESPUÉS DE UNA PRUEBA DE IMPACTO

Por

M.V.Z. EDSON ANTONIO SANTAMARÍA MARTÍNEZ

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

Noviembre 2014



UANL

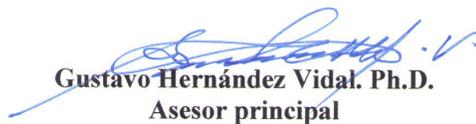
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Detección de la Catepsina B en Cartílago Fetal Articular Equino
Después de una Prueba de Impacto.

Tesis presentada por el:

MVZ. EDSON ANTONIO SANTAMARÍA MARTÍNEZ

Aprobación de la Tesis:


Gustavo Hernández Vidal. Ph.D.
Asesor principal


Rafael Ramírez Romero. Ph.D.
Co-asesor


Diana Elisa Zamora Avila. Dra
Co-asesor


Luis Edgar Rodríguez Tovar. Ph.D
Co-asesor


Jorge Kawas Garza. Ph.D.
Co-asesor


Alicia Magdalena Nevares Garza. MSc
Co-asesor

RESUMEN *i*

El objetivo principal de éste estudio fue la inmunolocalización de la proteinasa cisteínica catepsina B (EC 3.4.22.1) en cartílago articular fetal del caballo después de una prueba de impacto.

Muestras de cartílago articular fueron sometidas a una prueba de impacto y la distribución de la enzima degradativa de la matriz extracelular (MEC), catepsina B, se analizó inmediatamente, y también después de 4h, 8h, 1, 2 o 5 días en cultivo, post-impacto. La enzima fue inmunolocalizada por inmunocitoquímica. Inmediatamente después de una prueba de impacto bajo (0,25 J) la expresión de la catepsina B incrementó en los condrocitos de la zona articular en comparación con los control.

Las pruebas de impacto alto (0,49 y 0,98 J) disminuyeron la tinción de la enzima en todas las zonas y provocaron la liberación extracelular de la catepsina B en la zona articular. Un notable incremento en la tinción de esta enzima se detectó en las zonas media y profunda de cartílago cultivados durante 1 a 5 días después de la prueba de impacto.

INDICE *ii*

	RESUMEN	<i>i</i>
	INDICE	<i>ii</i>
	ABREVIATURAS	<i>iii</i>
	INDICE DE FIGURAS	<i>iv</i>
	INDICE DE TABLAS	<i>v</i>
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Introducción General	1
1.1.1	Desarrollo del cartílago y osteoartritis	3
1.2	Osificación endocondral	11
1.3	Estructura y función articular	14
1.3.1	Hueso subcondral	16
1.3.1.1	Composición del hueso subcondral	16
1.3.1.2	Enzimas presentes en el hueso subcondral	18
1.3.1.3	Composición celular	19
1.4	Arquitectura ósea	19
1.5	Sinovia	20
1.6	Membrana sinovial	20
1.7	Fluido sinovial	21
1.8	Cartílago articular	22
1.8.1	Metabolismo de los condrocitos	27
1.8.2	Homeostasis del cartílago articular	30
1.8.3	Homeostasis del cartílago bajo condiciones fisiológicas	31
1.8.4	Actividad enzimática del cartílago articular	32
1.8.5	Disturbio de la homeostasis en el cartílago articular bajo condiciones patológicas	33
1.9	Componentes de la matriz extracelular	34
1.9.1	Colágenos	34
1.9.2	Proteoglicanos y glucosaminoglucanos	35
1.9.3	Proteoglicanos pequeños	38
1.9.4	Proteínas no colágenas de la matriz extracelular	38
1.9.5	Cambios de la matriz extracelular	39
1.10	Enzimas capaces de degradar cartílago	40
1.10.1	Metaloproteinasas de la matriz (MMP's)	40
1.10.2	Proteinasas cisteínicas	41
1.11	Síntesis de la catepsina B	43
1.11.1	Modulación fenotípica y expresión de la catepsina B	46
1.12	Distribución de la carga en el cartílago articular	47
2	MATERIALES Y MÉTODOS	50
2.1	Materials	50
2.1.1	Antisuero	50
2.1.2	Anticuerpos secundarios	50
2.1.3	Sustancias y agentes químicos	50

2.1.4	Materiales de cultivo de tejidos	51
2.1.5	Soluciones amortiguadoras	52
2.1.5.1	Soluciones amortiguadoras para inmunolocalización	52
2.1.5.2	Tinción para inmunolocalización	53
2.1.6	Tinción histológica	53
2.1.7	Soluciones para histología	53
2.1.7.1	Paraformaldehído 4% pH 7.4 (PFA)	53
2.1.7.2	Poly – L – lisina	53
2.1.8	Medios	53
2.1.8.1	Medio modificado Dulbeccos's-Eagle's (DMEM)	53
2.2	Métodos	54
2.2.1	Medio de cultivo de tejido	54
2.2.2	Condiciones de cultivo	54
2.2.3	Tejidos	54
2.2.3.1	Muestras de cartílago y hueso subcondral	54
2.2.4	Métodos inmunocitoquímicos	56
2.2.4.1	Preparación portaobjetos	56
2.2.4.2	Preparación de las secciones de cartílago y hueso subcondral	56
2.2.4.3	Tinción inmunofluorescente	56
2.2.5	Tinciones histológicas	57
2.2.5.1	Azul de toluidina	57
2.2.6	Prueba de impacto del cartílago	57
3	RESULTADOS	60
3.1	Localización de la catepsina B en el cartílago articular normal del caballo	60
3.2	Efectos del impacto mecánico en la expresión y distribución de la catepsina B en el cartílago articular.	60
3.2.1	Expresión y distribución de la catepsina B en cartílago articular impactado.	61
3.2.2	Análisis inmunohistoquímico	61
3.3	Efecto del tiempo en cultivo en la distribución de la enzima después de la prueba de impacto.	65
3.3.1	Análisis inmunohistoquímico.	66
4	DISCUSIÓN	68
5	REFERENCIAS	72

ABREVIATURAS *iii*

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micras
μPa	Micropascal
α	Alfa
Ac	Anticuerpo
Ag	Agrecan
AH	Ácido hialurónico
ATPasas	Adenosin Trifosfatasa
β	Beta
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca	Calcio
Cat. B	Catepsina B
Cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
CuSO ₄ 5H ₂ O	Sulfato de cobre
DAB	Diamino benzedin tetrahidroclorato
DCP	Discondroplasia
DMEM	Medio modificado Dulbecco's-Eagle's
DTT	Ditiotreitol
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidinio) butano.
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FCS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

FNT- α	Factor de necrosis tumoral alfa
g	Gramos
GAG	Glicosaminglucano
h	Horas
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
IGF	Insulina como factor de crecimiento
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferón gamma
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Ortofosfato de potasio dihidrogenado
KS	Keratan sulfato
LP	Proteína de enlace
Lt	Litro
M	Molar
mg	Miligramos
Mg	Magnesio
min.	Minutos
ml	Mililitro
mm ³	Milímetro cúbico
Mm	Milímetros
mM	Milimol
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Di-sodio hidrógeno ortofosfato
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Ortofosfato di-sódico dihidrogenado

NSS	Suero normal de borrego
O.C.T	Medio de montaje
OA	Osteoartritis
OC	Osteocondrosis
p/v	Peso sobre volumen
PBS	Solución salina fosfato-buferada
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Índice de acidez o alcalinidad
Po	Potasio
Pu	Proteína de unión
PUMP-1	Metaloproteinasa putativa
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
S α h	Sheep anti-human
TGF- β	Factor de crecimiento de transformación beta
TIMP	Tejido inhibidor de las metaloproteinasas
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Tris-HCl	Trizma hidrocloreuro
UI	Unidades internacionales
v/v	Volumen sobre volumen
Z-Ala-Arg-Arg-4M β NA	N-carbobenzoxi-fenilalanil-arginil-4- metoxi-beta-naftilamida.
Za	Zona articular o superficial
Zc	Zona calcificada
Zh	Zona hipertrófica o profunda
Zn	Zinc
ZnSO4.7H2O	Sulfato de Zinc
Zp	Zona proliferativa o media

ÍNDICE DE FIGURAS *iv*

Figura 1.1	Miembro anterior en donde se indican los sitios más comúnmente afectados por osteoartritis	6
Figura 1.2	Miembro posterior en donde se indican los sitios más comúnmente afectados por osteoartritis.	7
Figura 1.3	Representación esquemática de la articulación sana y la articulación artrósica en la que se observa la fibrilación del cartílago articular y una degradación concomitante con engrosamiento del hueso subcondral.	8
Figura 1.4	Representación esquemática que ilustra los orígenes evolutivos propuestos del cartílago articular y la placa de crecimiento.	12
Figura 1.5	Representación esquemática de una articulación sinovial. De: Stashak T.S. En: Adams Lameness in horses (1987).	15
Figura 1.6	Cartílago articular epifiseal normal de la cresta lateral de la tróclea del fémur de un equino.	25
Figura 1.7	Componentes del cartílago articular.	37
Figura 1.8	Síntesis de catepsina B, modificación esquemática de Berquin y Sloane. 1996.	45
Figura 2.1	Torre de caída libre.	58
Figura 3.1	Localización inmunocitoquímica de catepsina B en cartílago articular fetal equino después de una prueba de impacto.	62
Figura 3.2	Localización inmunohistoquímica de catepsina B en cartílago articular fetal de equino (<i>x</i> 40). Inmediatamente después de una prueba de impacto baja (B 0h).	63
Figura 3.3	Localización inmunohistoquímica de catepsina B en cartílago articular fetal de equino (<i>x</i> 40).	65
Figura 3.4.	Localización inmunohistoquímica de catepsina B en cartílago articular fetal de equino (<i>x</i> 40). Catepsina B, Cartílago articular sin impactar (C 0h).	67

ÍNDICE DE TABLAS v

Tabla 2. 1	Energía del impacto correspondiente al peso de la masa y la altura de la caída. n = 3 por cada grupo. Tiempo en cultivo = 0h; J = joule.	59
Tabla 3. 1	Distribución de catepsina B inmediatamente después de la prueba de impacto (a una baja, media y alta energía de impacto) en muestras de cartílago articular fetal equino.	64
Tabla 3. 2	Distribución zonal de catepsina B en cartílago articular fetal de equino después de una prueba de impacto y tiempo en cultivo. +/-	66

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción General.

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado que cubre las superficies de las articulaciones diartrodiales protegiendo la superficie articular mediante la distribución de las cargas aplicadas y proporcionando una superficie de baja fricción facilitando el libre movimiento de la articulación. El cartílago está compuesto por una matriz extracelular compleja (MEC) la cual es sintetizada y regulada por los condrocitos. Enfermedades como la osteoartritis, que causan la destrucción de la matriz extracelular del cartílago, conducen a un deterioro grave de la función articular. Los eventos iniciales en el proceso destructivo son desconocidos y pueden ser de origen multifactorial. Las lesiones producidas por un impacto patológico en la articulación pueden durar después de una caída o un accidente. La osteoartritis secundaria se puede desarrollar posteriormente en la articulación a causa de cambios degenerativos provocados por el trauma. El daño permanente en la matriz del cartílago articular puede darse después de un traumatismo, presentando fisuras en la superficie, muerte de condrocitos y pérdida de proteoglicanos. La necrosis de condrocitos da lugar a la liberación de enzimas intracelulares, tales como las lisosomales y metaloproteinasas, las cuales tienen potentes efectos degradativos sobre la matriz del cartílago (Burleigh *et al.* 1974). La presencia de las proteasas lisosomales, catepsinas B y D en condrocitos ha sido demostrado por varios grupos de investigación (Bayliss and Ali 1978, Baici *et al.* 1995a y b, Hernandez-Vidal *et al.* 1996, Hernandez-Vidal *et al.* 1997). La función principal de estas catepsinas es la degradación de proteínas intracelulares asociadas con la remodelación normal de la matriz extracelular. Estudios *in vitro* han demostrado que la catepsina B (una proteinasa cisteínica) puede degradar los proteoglicanos (Nguyen *et al.*

1990) y el colágeno. (Burleigh *et al.*1974). La enzima también es conocida por estar involucrada en la activación de una cascada de procesos degradativos en el cartílago mediante la activación de proenzimas de metaloproteinasas tales como la pro-estromelina y pro-colagenasa (Buttle *et al.* 1993). Sin embargo un aumento de la actividad de la catepsina B se ha observado en condiciones patológicas como la artritis reumatoide (Mort *et al.* 1984), la osteoartritis (Bayliss and Ali 1978, Baici *et al.* 1995a) y discondroplasia equina (Hernandez-Vidal.*et el.*1998). De igual forma, la catepsina D (una endopeptidasa aspártica) se conoce por unirse a la proteína principal del proteoglicano *in vitro* (Tyler 1991). Dingle *et al.* 1971 y Poole *et al.* 1973 demostraron que la catepsina D está implicada en el catabolismo normal de proteoglicanos del cartílago y su función en la degradación del complejo agregano ha sido confirmada *in vitro* utilizando inhibidores específicos (Adcocks *et al.* 2000). También se ha implicado a la catepsina D en el daño del cartílago causado por traumatismo patológico, debido al estrés en las articulaciones en caballos de carreras (McIlwraith 1982). A pesar de que se han realizado innumerables estudios para investigar los efectos de la compresión mecánica sobre el cartílago, muy pocos han abordado el papel de las enzimas degradativas. Estudios preliminares han sugerido la degradación de la matriz de colágeno de tipo II como un resultado directo del impacto mecánico (Clements *et al.* 2000) y este tipo de impacto puede inducir un desequilibrio de las metaloproteinasas y sus inhibidores en favor de la degradación de la matriz extracelular (Blain *et al.*2000).

Varios grupos (Jeffrey *et al.* 1997., Davies *et al.* 2003., Bowe *et al.* 2004., Henson *et al.* 2005., Huser *et al.* 2006) han descrito previamente un modelo *in vitro* diseñado para investigar los efectos del impacto sobre el cartílago articular. El sistema consiste en una torre de caída libre, que permite la caída libremente de una masa de 500 g desde una altura conocida

sobre una muestra de cartílago. Los efectos físicos de la prueba de impacto, que incluyen cambios en la viabilidad celular y el contenido de agua del tejido, se han determinado junto con la respuesta biosintética de los condrocitos a una carga de impacto controlado mediante el uso de precursores radiomarcados de los componentes de la matriz extracelular (Jeffrey *et al.* 1995). En intento por descubrir si las catepsinas B y D juegan un papel en la fisiopatología de la enfermedad de las articulaciones inducida por trauma, el presente estudio utilizó el modelo de impacto descrito anteriormente para determinar la distribución, tanto intra como extracelularmente de estas proteinasas degradativas en muestras de cartílago fetal equino después de una prueba de impacto.

1.1.1 Desarrollo del cartílago y osteoartritis

En el embrión en desarrollo, las estructuras cartilaginosas sirven como el principio a partir de donde los huesos largos son formados durante el proceso de formación de hueso endocondral. Las células mesodermes precursoras de extremidades proliferan y se diferencian en condrocitos los cuales producen la matriz extracelular. Después, se empieza a osificar el cartílago lo que da origen a la formación del hueso. Después del nacimiento el crecimiento del hueso depende del cartílago en crecimiento, de los núcleos del crecimiento metafisiales y a una mucho menor extensión del cartílago del complejo articular/epifiseal, los cuales son la cubierta de los lados del hueso. El progreso de los condrocitos a través del proceso de liberación condrocítica se inicia como condrocitos proliferativos y termina como condrocitos hipertróficos. En la zona hipertrófica baja, la calcificación comienza en el septo longitudinal debido a la deposición del mineral hidroxiapatita, un compuesto de calcio y fosfato, (Boskey 1981; Brighton 1978). Después, los condrocitos hipertróficos son eliminados cuando el septo longitudinal calcificado de la zona hipertrófica baja sirve como

soporte para invadir capilares y osteoblastos (Hunziker, E.B. 1994; Kuettner y Pauli 1983). Estos osteoblastos transforman el cartílago calcificado en hueso para una próxima mineralización, el rompimiento de la matriz extracelular del cartílago (colágeno Tipo II y proteoglicanos específicos del cartílago) y la síntesis de un hueso específico de la matriz extracelular (colágeno Tipo I).

La osteoartritis es una enfermedad degenerativa de las articulaciones la cual representa una carga importante al sector salud a nivel mundial. Se caracteriza por la pérdida de cartílago articular, engrosamiento del hueso subcondral y formación de osteofitos, la articulación artrósica produce dolor y la discapacidad en quienes la padecen. En el caballo es una de las causas más frecuentes de claudicación afectando tanto miembros anteriores como posteriores, Figuras 1.1 y 1.2.

La base de los mecanismos moleculares de la OA no están dilucidados; de hecho, incluso es todavía un tema de debate en cuanto a su patología inicial. Sin embargo, cada vez hay más pruebas que implican a la re-iniciación del fenotipo de los condrocitos transitorios en la etiología y la patología artrósica (Fosang y Beier 2011, Pitsillides y Beier 2011; Figura 1.3).

Tales debates pueden potencialmente ser abordados a través de una mejor comprensión del volumen de cartílago articular y de la proporción de área de superficie en diferentes especies, y por lo tanto puede proporcionar una explicación de por qué el grado de transitoriedad de los condrocitos en el cartílago articular difiere de una especie a otra.

En el cartílago artrósico, se ha observado disminución del colágeno tipo II y agregano en comparación con el cartílago articular normal (Helminen *et al.* 1993, Garnero *et al.* 2002, Jalba *et al.* 2011, Henrotin *et al.* 2013). Por otra parte, los marcadores que anteriormente se

consideraban exclusivos de los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento se han detectado en el cartílago articular no calcificado tanto en modelo animal de artrosis, como en pacientes con la enfermedad. De los marcadores los más frecuentes son MMP13 y el colágeno de tipo X, sin embargo, también se ha localizado con fosfatasa alcalina, osteopontina, osteocalcina y IHH (Hoyland *et al.* 1991, Aigner *et al.* 1993, Pullig *et al.* 2000, Appleton *et al.* 2007, Studer *et al.* 2012). Al igual que en el cartílago transitorio de la placa de crecimiento, los condrocitos hipertróficos se consideran como requisito previo para la mineralización de la matriz y en la osteoartritis, el aumento de la formación de hidroxiapatita se ha documentado y es consistente con los cambios en condrocitos hipertróficos (Fuerst *et al.* 2009).

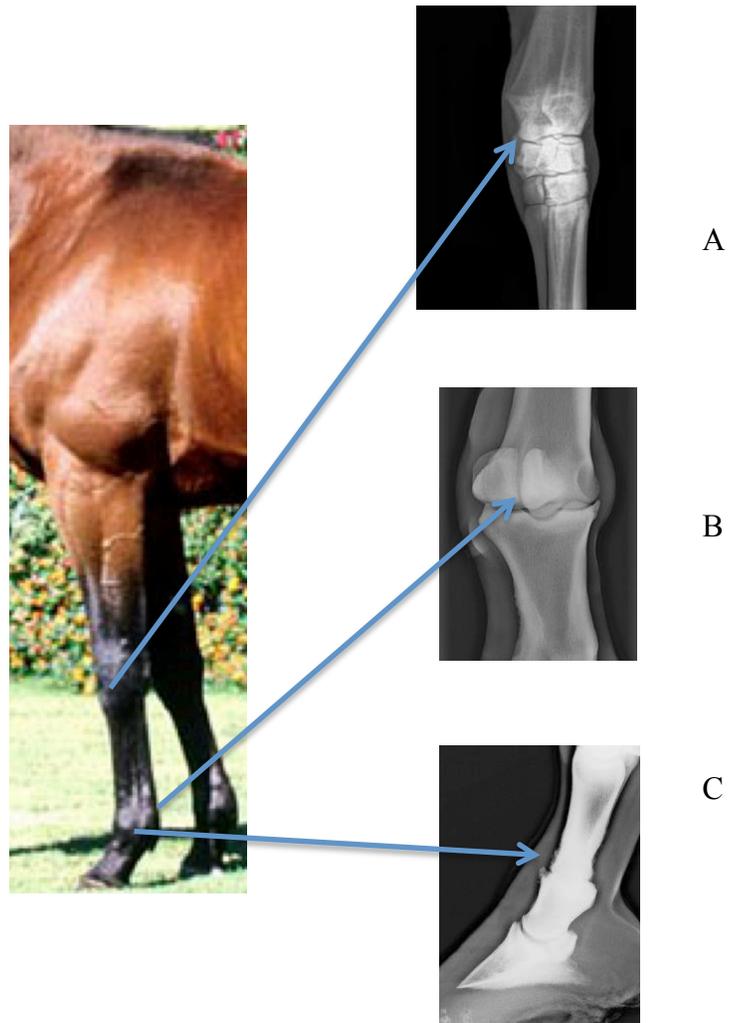


Figura 1.1 Miembro anterior en donde se indican los sitios más comúnmente afectados por osteoartritis.

- A) Rodilla (Articulación de los carpos).
- B) Menudillo (Articulación Metacarpo - falángica).
- C) Cuartilla (Articulación interfalángica proximal).

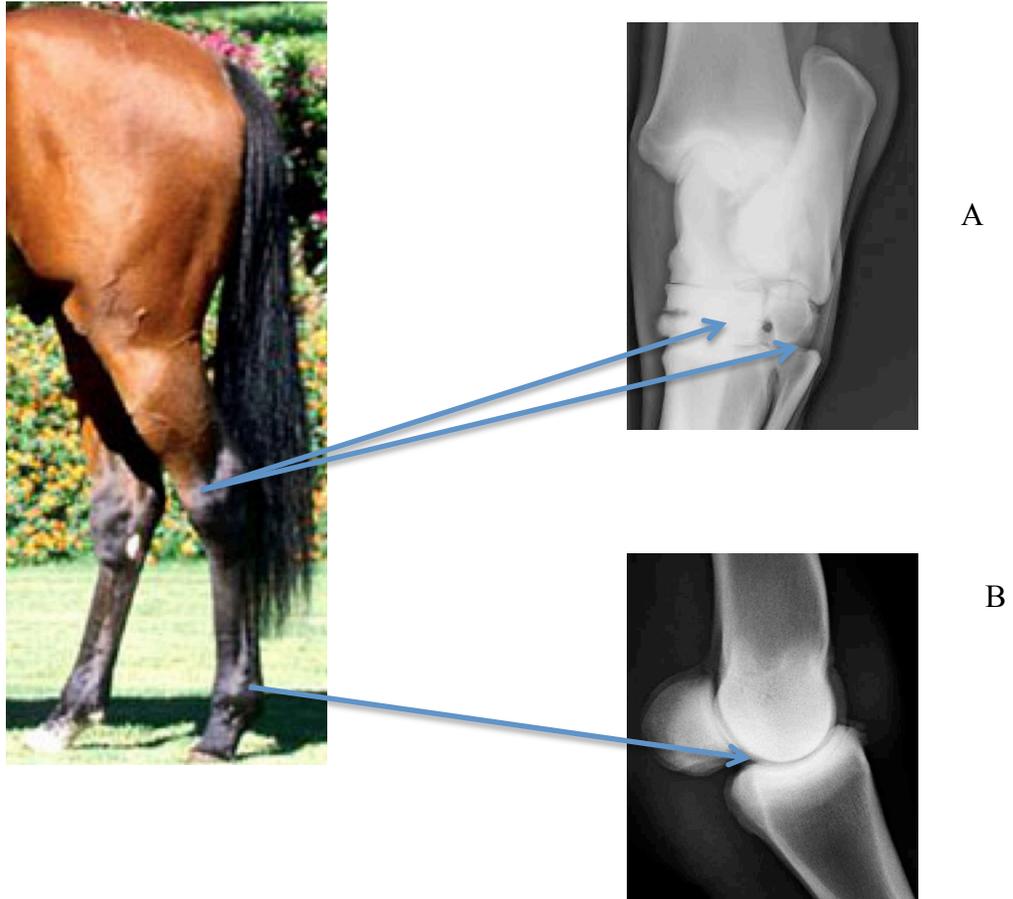
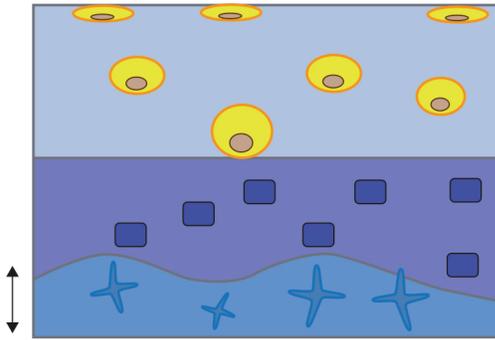


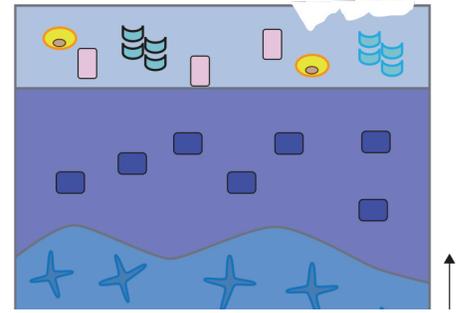
Figura 1.2. Miembro posterior en donde se indican los sitios más comúnmente afectados por osteoartritis.

- A) Corvejón (Articulaciones Tibiotarsal, Intertarsiana proximal, Intertarsiana distal y Tarsometatarsiana).
- B) Menudillo (Articulación Metatarso-falángica)

Cartílago articular sano



Cartílago articular osteoartrítico.



Condrocito articular



Osteocito



Condrocito hipertrófico

Figura 1.3. Representación esquemática de la articulación sana y la articulación artrósica en la que se observa la fibrilación del cartílago articular y una degradación concomitante con engrosamiento del hueso subcondral. Contribuyendo a esta patología artrósica, los condrocitos articulares normalmente "estables" del cartílago articular adoptan un fenotipo 'transitorio' presentándose condrocitos hipertróficos y una mineralización de la matriz.

MMP13, un marcador clave de la hipertrofia de los condrocitos, está demostrando ser un objetivo importante en la investigación de la osteoartritis debido a su importante papel en la degradación del colágeno de tipo II, proteoglicanos, colágeno tipo IV-IX y, osteonectina y perlecan (Wang *et al.* 2013). De hecho, los ratones deficientes en MMP13 predeciblemente presentan un defecto en el desarrollo del hueso endocondral con una amplia zona de condrocitos hipertróficos no atribuible al aumento de la proliferación de condrocitos, aumento en la síntesis de proteoglicanos y al aumento de hueso trabecular (Stickens *et al.* 2004). Sin embargo, mientras que la inducción quirúrgica de la osteoartritis en este ratón provoca la hipertrofia de los condrocitos y la formación de osteofitos, el grado de degradación del cartílago se redujo significativamente (Little *et al.*, 1999). La delección del gen MMP13 específicamente en los condrocitos produce la desaceleración similar de la progresión de la osteoartritis después de una lesión meniscal-ligamentosa en un modelo de ratón (Wang *et al.* 2013). Consistente con este papel crucial para MMP13, también se encontró que su sobreexpresión resulta en cambios patológicos osteoartíticos en el cartílago articular de los ratones (Neuhold *et al.* 2001). Investigaciones recientes han implicado a la vía de señalización WNT y sus inhibidores como importantes reguladores de la MMP13 (van den Bosch *et al.* 2013, Chan *et al.* 2013, Staines *et al.* 2013), lo cual es coherente con la función de WNT en la prevención de las patologías articulares (Zhu *et al.* 2008, 2009, Miclea *et al.* 2011).

La epigenética ha estado fuertemente implicado en la osteoartritis en los últimos años con los tres mecanismos conocidos en la actualidad - la metilación del ADN, modificaciones de las histonas y los ARN no codificantes han demostrado controlar el fenotipo de los condrocitos. Esto también ha resaltado la importancia del papel de MMP13. Más

específicamente, el MMP13 promotor de metilación que se altera en el cartílago artrósico, lo que sugiere que estos cambios epigenéticos, pueden producir la hipertrofia de los condrocitos observada en la patología (Roach *et al.* 2005). Cabe señalar que la iniciación precisa y el control de estos acontecimientos aún no se ha establecido. Sin embargo, con el aumento de los estudios epigenéticos recientes, sin duda es un momento idóneo y prometedor en este campo. Por tanto, esta evidencia señala la necesidad de decifrar los mecanismos moleculares que sustentan la recapitulación de algunas de estas "características" del desarrollo de los condrocitos del cartílago articular en la osteoartritis. Se prevee que esto, sin duda, ayudaría al avance en la comprensión de la patología de la enfermedad y en última instancia definir si las vías patógenas en la osteoartritis se pueden prevenir mediante la regulación de la estabilidad de los condrocitos limitando el fenotipo de crecimiento transitorio.

Ciertamente, el campo de la ingeniería de tejidos se beneficiaría de tal entendimiento. La combinación del uso de células y biomateriales, ha surgido como un objetivo prometedor para la reparación del cartílago. La primera reparación de defectos del cartílago fue descrito en 1994 mediante el uso de condrocitos autólogos (Brittberg *et al.* 1994). A pesar de las limitaciones asociadas a este, incluyendo la necesidad de lesionar el cartílago normal y los problemas con el cultivo de condrocitos, desde su aparición, sin duda se ha establecido como la plataforma desde la cual la ingeniería de tejidos del cartílago ha progresado mucho en los últimos años. El uso de células madre mesenquimatosas humanas, junto con su capacidad para superar las limitaciones definidas por el uso de condrocitos, se ha reportado en varias ocasiones en la osteoartritis como un medio prometedor en el área (Luyten 2004, Coleman *et al.* 2010). Es evidente que las células madre mesenquimatosas humanas

también pueden obtener la expresión de los marcadores de los condrocitos hipertrofos, el colágeno de tipo X, y está claro que esto todavía limita su eficacia como un candidato para la ingeniería de tejidos. De hecho, un estudio reciente ha demostrado que las células madre mesenquimatosas expresan niveles más altos de los genes asociados con la osteoartritis, en cultivo, que los condrocitos derivados de las mismas osteo- articulaciones artríticas (Mwale et al. 2010, Fernandes *et al.* 2013).

1.2 Osificación endocondral

La mayoría del esqueleto se forma durante el desarrollo embrionario como esbozos de cartílago; modelos de futuros elementos esqueléticos. La naturaleza transitoria de este cartílago se refleja en su eventual sustitución por hueso en el proceso fundamental de la osificación endocondral. La osificación endocondral se inicia por las células mesenquimales embrionarias que migran para formar condensaciones con- pre-cartílago, que luego se someten a la diferenciación en condrocitos y secretan una matriz extracelular rica en colágeno tipo II y agregano.

Los condrocitos de estas condensaciones de cartílago se someten a un proceso ordenado y altamente regulado que involucra la proliferación y maduración predominante marginal central, la hipertrofia y muerte celular. Estos eventos definen el marco del hueso endocondral y están reguladas por señales paracrinas incluyendo la hormona paratiroidea (PTH) y péptido -relacionados IHH del pericondrio (Figura 1.4;. Storm & Kingsley 1996, Tickle y Münsterberg 2001, Wang et al. 2001, Kronenberg 2003, Davey et al., 2006, Villavicencio-Lorini et al. 2010, Mackie et al. 2011).

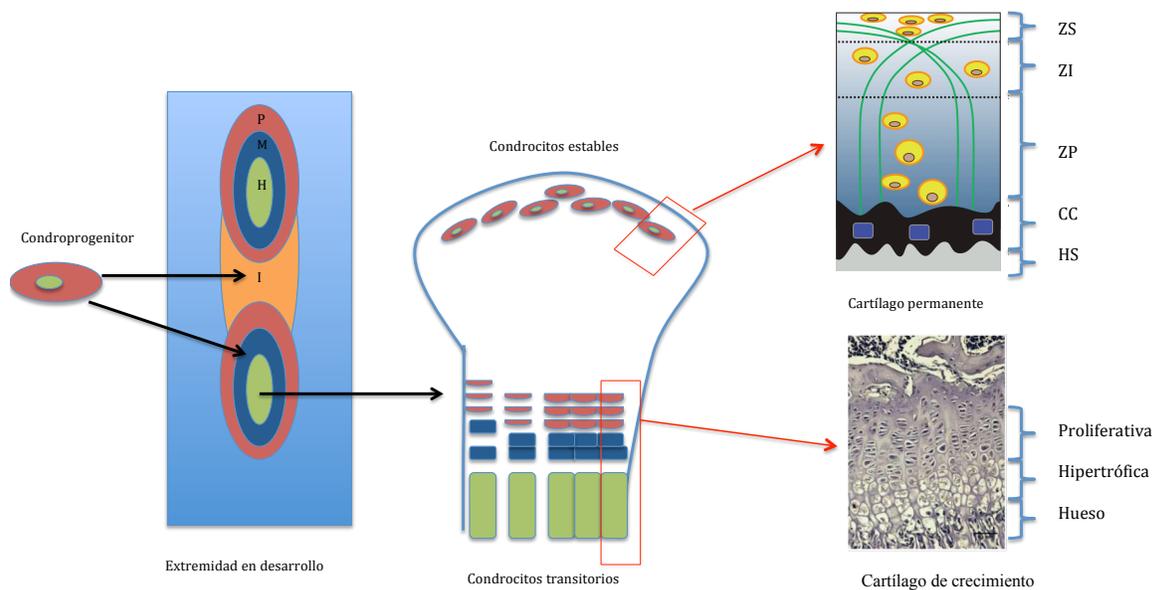


Figura 1.4. Representación esquemática que ilustra los orígenes evolutivos propuestos del cartilago articular y la placa de crecimiento. Agregación mesénquimal de condroprogenitores forman los esobozos de cartilago y las etapas de proliferación condrocítica (P), maduración (M) y la hipertrofia (H) emergen para proporcionar los orígenes de los futuros condrocitos 'transitorios' del cartilago de la placa de crecimiento. La región intermedia del mesénquima progresivamente define la interzona (I); la posición de la futura articulación y los orígenes de los condrocitos "estables" del cartilago.

La osificación primaria se origina en el centro de la diáfisis del elemento esquelético en desarrollo. El cartilago de crecimiento es invadido por vasos sanguíneos, aparentemente atraído por la expresión de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por condrocitos hipertrofos (Zelzer et al. 2002) produciendo con esto, la infiltración de los osteoclastos de resorción ósea y de los osteoblastos formadores de hueso. Además, el

pericondrio se convierte en vascularizado alrededor del elemento de formación de hueso para crear el periostio. Este proceso de invasión de vasos sanguíneos facilitado por la degradación del cartílago de la matriz extracelular calcificada alrededor de los condrocitos hipertróficos es críticamente dependiente de la actividad de la metaloproteinasa de la matriz 13 (MMP13; Stickens et al., 2004). La resorción de la matriz del cartílago es seguido por la invasión de los osteoblastos, que establecen el hueso recién formado. Este proceso se extiende longitudinalmente desde el centro de osificación primaria hacia los extremos del hueso. Con el tiempo, se forma el centro de osificación secundario, conservando una placa de crecimiento cartilaginosa entre cada epífisis y el centro de osificación primario (Mackie et al., 2008).

El controlar el proceso de osificación endocondral es muy difícil. Este involucra una gran variedad de factores endógenos y sistémicos estimuladores de la proliferación condrocítica y diferenciación. Además, las alteraciones en la matriz extracelular deben de ocurrir para permitir la mineralización e invasión del cartílago por los vasos sanguíneos. Se ha sugerido como causa patológica en el proceso de osificación endocondral a los eventos moleculares como: disfunción endocrina (Glade y Belling 1986), alteraciones vasculares (Kincaid *et al.* 1985; Carlson *et al.* 1986; Woodard *et al.* 1987), disturbios en el proceso de maduración de condrocitos (Farnum *et al.* 1984), alteraciones en las moléculas de la matriz (Ekman *et al.* 1990; Chen *et al.* 1993; Henson *et al.* 1997), y una mala función de varias enzimas involucradas en la transición del cartílago en matriz ósea (Gal *et al.* 1985; Ekman y Ridderstrale 1992; Farquharson *et al.* 1992).

1.3 Estructura y función articular

Las articulaciones sinoviales o diartroidales están formadas por: 1) las extremidades articulares de al menos dos huesos cubiertos con cartílago hialino; 2) la cápsula articular rodeando la cavidad articular; 3) el fluido sinovial en la cavidad articular, y 4) ligamentos extra e intra articulares (Figura 1.5). La cápsula articular consiste en una porción gruesa y fibrosa, la cual está en la parte más íntima de la membrana sinovial. El fluido sinovial es un ultrafiltrado del plasma altamente viscoso que contiene altas concentraciones de ácido hialurónico, el cual es producido por las células sinoviales (Gamble 1988).

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

Una articulación consiste en dos o más estructuras óseas congruentemente opuestas las cuales están cubiertas por una capa de cartílago articular hialino. La articulación está rodeada por una cápsula articular y ligamentos y contiene fluido sinovial. La principal función de muchas articulaciones es la de amortiguar además de proveer menos fricción durante el movimiento. Ésta función es realizada por la interacción del fluido sinovial,

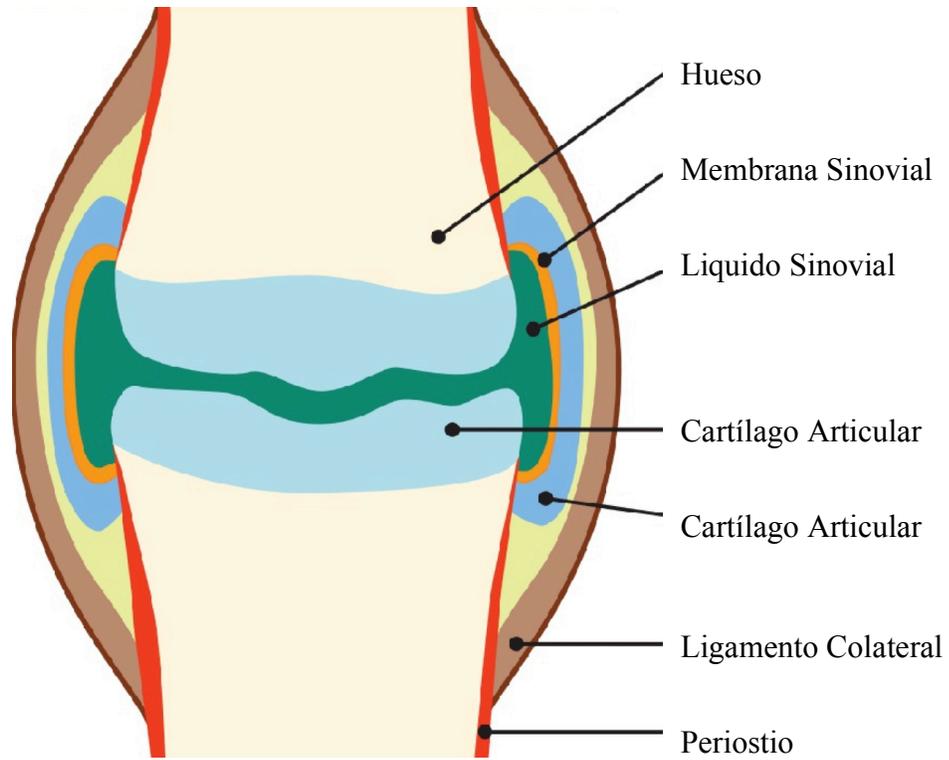


Figura 1.5. Representación esquemática de una articulación sinovial. De: Stashak T.S. En: Adams Lameness in horses (1987). Ed: Lea & Febiger. Philadelphia.

membrana sinovial, hueso subcondral y cartílago articular (Gamble 1988). Las propiedades únicas de éstos tejidos es la de ser capaces de producir un suave movimiento de la extremidad con una adecuada absorción y disipación del impacto aplicado, las cuales tal vez pueden producir impacto alto durante ciertos pasos o acciones atléticas (Palmer y Bertone 1996).

1.3.1 Hueso subcondral

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

1.3.1.1 Composición del hueso subcondral

El mineral que provee de rigidez al hueso es la hidróxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Este componente inorgánico está presente en la matriz del hueso en aproximadamente 65% de su total, el resto se compone de 25% de agua y el 10% de materia seca donde el 95% es colágeno (predominantemente de tipo I) y el 5% son proteoglicanos y proteínas no colágenas (Boskey 1981, Todhunter 1996). La matriz extracelular no calcificada es llamada osteoide. Muchas de las proteínas no colágenas son glicoproteínas que tienen un nivel alto de azúcar/proteína. La sialoproteína I ósea u osteopontina (Fisher *et al.* 1987) funciona *in vitro* para regular la adhesión celular, movilidad y alineamiento. La osteopontina, sialoproteína ósea y la proteína ácida del hueso son glicosadas, las proteínas fosforiladas son producidas por los osteoblastos y son importantes en el proceso de mineralización del hueso (Veis 1993).

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

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

1.3.1.2 Enzimas presentes en el hueso subcondral

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

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

1.3.1.3 Composición celular

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

1.4 Arquitectura ósea

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

1.5 Sinovia

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

1.6 Membrana sinovial

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

síntesis de hialuronato (células tipo B). Las células sinoviales también sintetizan la matriz extracelular del sinovium (Henderson y Pettipher 1985).

1.7 Fluido sinovial

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

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

La presión intrasinovial normal es subatmosférica (-2 a -6 cm. H₂O) (Simpkin 1993., Knox *et al.* 1988) por lo que contribuye en la estabilización de la articulación y se ha visto en estudios basados en perros que varios factores intervienen en la presión intraarticular en

rodillas normales como por ejemplo la talla de la articulación, el volumen del fluido sinovial, la posición de la articulación, flexión o extensión, anatomía del tejido peri articular y de la articulación, la permeabilidad de la membrana, la elasticidad capsular así como el movimiento del fluido dentro y fuera de la articulación (Node y Newbold 1983).

La “barrera de permeabilidad” sinovial de moléculas pequeñas es mantenida por un estrecho espacio entre los sinoviocitos y los componentes de la matriz extracelular. El hialuronato también funciona como una barrera en el intercambio de moléculas pequeñas (Kerr 1985) de menos de 10KDa, que usualmente están entre el plasma y el fluido sinovial y generalmente cruzan la sinovia por difusión simple, el transporte de glucosa en el fluido sinovial es una excepción, ya que entra más fácil y rápidamente como resultado de la difusión facilitada, preferentemente del transporte activo (Simpkin 1993). Por otro lado, las moléculas lipofílicas, como el oxígeno y el dióxido de carbono, se difunden libremente dentro y fuera del fluido sinovial, debido a que pueden difundirse a través de los sinoviocitos así como entre los mismos (Simpkin y Pizzorno 1974). Por ello, el fluido sinovial es el medio a través del cual los nutrientes se extienden en el cartílago articular, y también se ha demostrado que los ligamentos intraarticulares reciben el nutrimento del fluido sinovial (Simpkin y Pizzorno 1974).

1.8 Cartílago articular

El cartílago articular es un tejido aneural y avascular que cubre los huesos de las articulaciones diartroïdiales, cuya principal función es la de proveer elasticidad y distribuir las fuerzas compresivas, resistir el estrés y, proveer una baja fricción entre las superficies articulares. Sólo un tipo de célula está presente en el cartílago articular, el condrocito, el

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

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

El cartílago articular está organizado en diferentes zonas con base en la organización de las fibras de colágeno, la composición de los proteoglicanos y la morfología de los condrocitos. Mientras que la composición y arquitectura de la matriz orgánica varía entre las diferentes regiones de una misma articulación, entre las diferentes articulaciones de un

animal, entre especies, y la edad (McDevitt, 1973; Bjelle, 1975; Bullough *et al.* 1985; Vachon *et al.* 1990) (Figura 1.6 A y B).

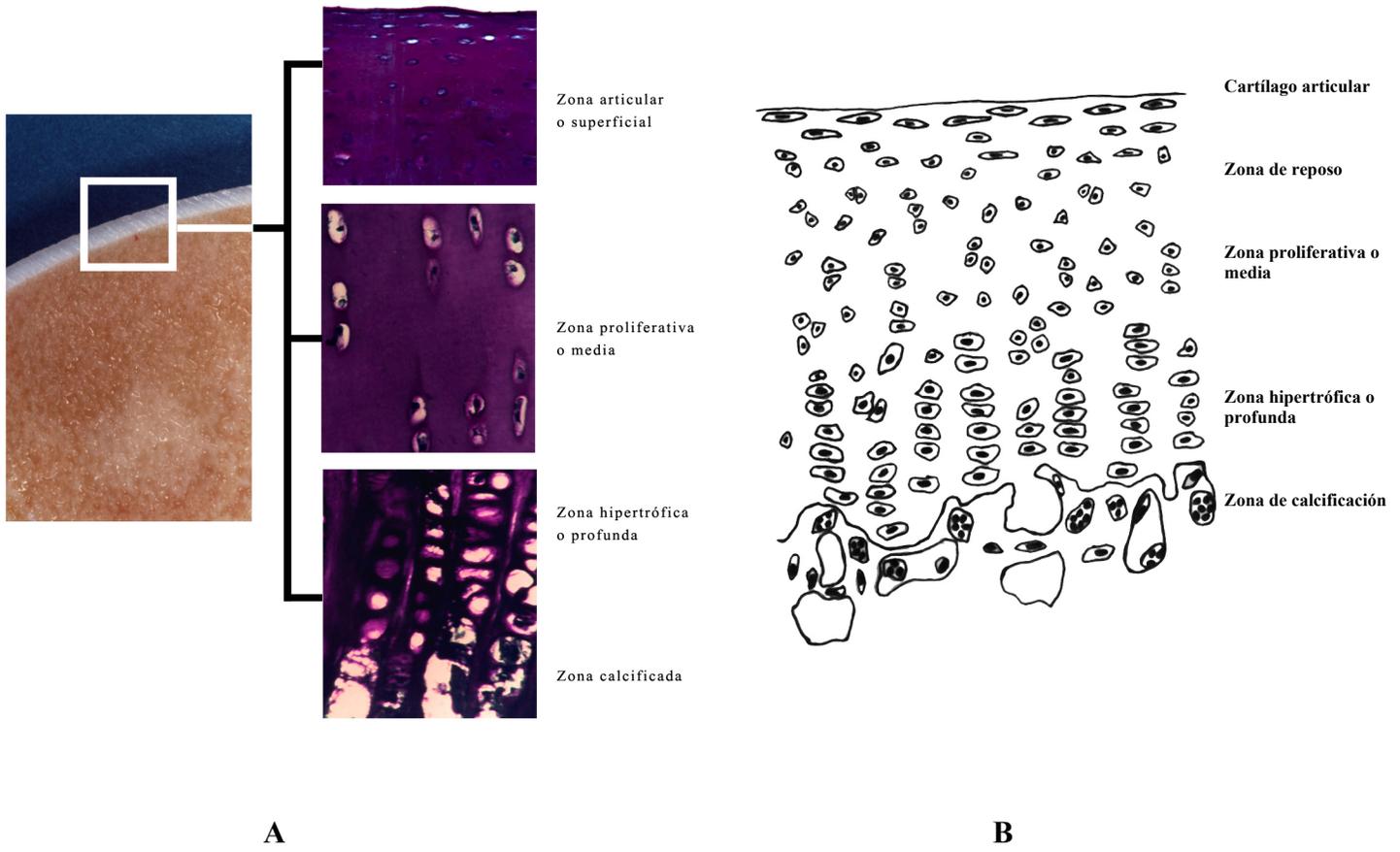


Figura 1.6. Cartílago articular epifiseal normal de la cresta lateral de la tróclea del fémur de un equino.
 A). Muestra teñida con azul de toluidina en donde se observa la organización de los condrocitos en las diferentes zonas del cartílago articular del caballo.
 B). Diagrama que muestra la forma característica de las células así como su orientación morfológica

Histológicamente, el cartílago articular se divide en cuatro zonas: superficial o articular, media o proliferativa, profunda o hipertrófica y calcificante. La zona articular del cartílago adulto contiene el mayor número de condrocitos organizados de modo paralelo a la superficie y cuentan con una morfología alargada y plana con el eje mayor también paralelo a las fibrillas de colágeno y con menor contenido de proteoglicano. (Palmer y Bertone, 1994).

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

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

zonas media y profunda de la zona articular (Stockwell y Meachim 1979; Mitrovic *et al.* 1983) (Figura 1.6 A y B).

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

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

1.8.1 Metabolismo de los condrocitos

Los condrocitos son los responsables de mantener la homeostasis del cartílago, controlando la degradación de las moléculas de la matriz. La pérdida de proteoglicanos es mucho mayor que la de colágenos, lo que significa que la actividad principal de los condrocitos es la

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

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

La insulina como factor de crecimiento I (IGF-I) (Tyler 1989; Mcquillan *et al.* 1986; Guenther *et al.* 1982 ; Tesch *et al.* 1992) y el TGF- β (Morales y Roberts 1988; Redini *et al.* 1988; Hill y Logan 1992) son factores anabólicos muy importantes que pueden estimular la síntesis de la matriz y la proliferación celular, mientras que la interleucina I (IL- I) (Verschure y Van 1990; Van-de L.A y Van-den B.W 1990; Benton y Tyler 1988; Bendtzen *et al.* 1985) y TNF- α ejercen una influencia catabólica en los condrocitos suprimiendo la producción de proteoglicanos e induciendo a la producción de MMP, con lo cual se estimula la producción de la matriz. La renovación continua de la matriz hace posible la adaptación de la composición de la misma a los requerimientos específicos que presentan las capacidades bioquímicas del cartílago. Esto se ejemplifica por el hecho de que la bioquímica del cartílago articular varía entre las diferentes articulaciones, entre los sitios de una articulación con peso o sin peso, y por la edad (Palmer *et al.* 1995; Esquissatto *et al.* 1997; Platt *et al.* 1998).

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

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

1.8.2 Homeostasis del cartilago articular

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

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

1.8.3 Homeostasis del cartílago bajo condiciones fisiológicas

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

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

encuentran dentro del fluido sinovial (Mow *et al.* 1984).

1.8.4 Actividad enzimática del cartílago articular

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

En general las enzimas proteolíticas como las colagenasas y la estromelisinina son secretadas como proenzimas y en diversos estudios han propuesto su activación por medio de factores como plasmina (Martel-Pelletier *et al.* 1991), tripsina (Franchimont y Bassleer 1991), acidez (Woessner y Gunja-Smith 1991), iones super-óxido (Greenwald y Moak 1986), Cu, Ca, interferón gamma (IFN- γ), catepsina B (Martel-Pelletier *et al.* 1990), y activador del plasminógeno (Treadwell *et al.* 1991). El equilibrio de este complejo sistema biomecánico, el cual todavía no se comprende del todo, permite la homeostasis del cartílago (Palmer y Bertone 1994, Testa *et al.* 1994).

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

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

Las alteraciones en la regulación y control del metabolismo condrocítico pueden dar resultado a procesos patológicos que involucran un deterioro gradual de la matriz extracelular. Si la homeostasis del cartílago articular es inadecuada o falla, ocurrirá un desbalance metabólico en donde la degradación inducida por proteasa prevalece sobre la reparación (Murphy *et al.* 1990, Lohmander *et al.* 1992, Palmer y Bertone 1994, Poole *et*

al. 1995, McIlwraith 1996). Esto puede conducir a que la proteólisis e inflamación se incrementen. Primero, los bioproductos del catabolismo del cartílago pueden causar reacciones mediadas por células, activando linfocitos y monocitos (Woessner y Howell 1983, Shapiro *et al.* 1991, Palmer y Bertone 1994), y posteriormente, puede haber inflamación aguda. Varias citocinas, como la IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), pero también prostaglandina-E2 (PGE2) así como iones super-óxido son liberadas en el fluido sinovial, incrementando la síntesis y liberación de proteasas (Hardingham y Bayliss 1990, Dean 1991, Palmer y Bertone 1994, Martel-Pelletier *et al.* 1998). En este punto, el mecanismo se encuentra completamente preparado y comienza el mecanismo clásico de cascada inflamatoria llevando a un proceso degenerativo.

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

1.9 Componentes de la matriz extracelular

1.9.1. Colágenos

El colágeno, componente fibrilar del cartílago, ocupa aproximadamente 15-20% del peso húmedo y cerca de la mitad del peso seco del cartílago, excepto en la zona articular donde el colágeno abarca la mayoría del peso seco (Muir 1972). Existen diferentes tipos de colágeno y, su función en conjunto es interactuar con los proteoglicanos para formar una

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

1.9.2 Proteoglicanos y glucosaminoglucanos

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

Los glucosaminoglucanos que se encuentran en cartílago incluyen al sulfato de condroitina, sulfato dermatan, sulfato de queratina y ácido hialurónico. Este último es el único glucosaminglucano que no es sulfato y además no se encuentra como cadena lateral de una proteína nuclear de proteoglicano. Además, el ácido hialurónico se encuentra en forma de

cadenas largas (más de 1,000 repeticiones disacáridos) que interactúan con las fibras de colágeno de una manera que aún no se comprende. Las unidades de disacáridos de glucosaminglucanos consisten de hexosamina y residuos de ácido urónico, excepto para el sulfato de keratina donde el residuo de ácido urónico es reemplazado por galactosa. Mientras que el ácido hialurónico es sintetizado en la membrana plasmática, todos los glucosaminglucanos son sintetizados y modificados en el aparato de Golgi; la proteína nuclear es sintetizada en el retículo endoplásmico (Hardingham y Muir 1972).

El principal proteoglicano en el cartílago es el agregan , un proteoglicano largo que contiene de 100-200 cadenas laterales de glucosaminoglucanos y recibe ese nombre porque más de 300 de estos proteoglicanos se pueden unir a una cadena de ácido hialurónico, formando largos agregados (Hardingham y Muir 1972). Esta unión es estabilizada por una glicoproteína llamada proteína de unión (Buckwalter *et al.* 1984; Hardingham 1979). Además del agregan, el cartílago contiene varios proteoglicanos pequeños no agregados como la decorina, biglicano y fibromodulina (Roughley y Lee 1994; Witsch *et al.* 1992) (Figura 1.7). Estas moléculas se unen a otras macromoléculas contribuyendo a la estabilización de la matriz y probablemente influye en la función celular. El arreglo ultra estructural y las interacciones moleculares entre varios componentes de la matriz extracelular contribuyen sustancialmente en las propiedades mecánicas del cartílago y por lo tanto a la resistencia a los daños (Roughley y Lee 1994).

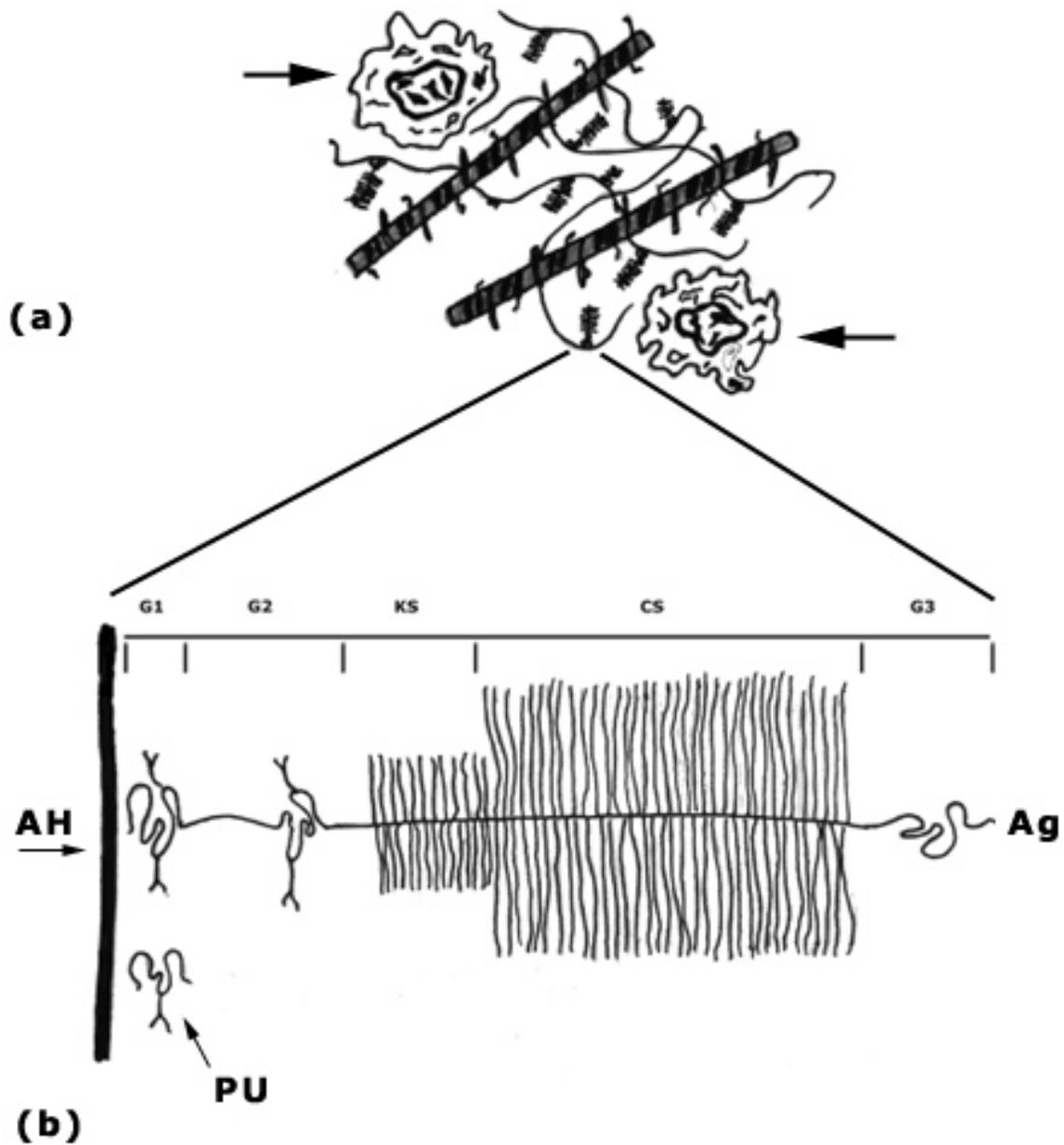


Figura 1.7. Componentes del cartilago articular.

- (a) Diagrama que representa a los condrocitos (flechas) y a la matriz extracelular (malla formada por fibras de colágeno y proteoglicanos).
- (b) Magnificación de un proteoglicano formado por el agregan (Ag) y el ácido hialurónico (AH). Se muestra también la proteína de unión (PU), el queratan sulfato (KS), el condroitin sulfato (CS) y los segmentos G1, G2 y G3.

1.9.3 Proteoglicanos pequeños

Los proteoglicanos pequeños no agregados constituyen del 1 al 4% del total de la masa de los proteoglicanos en el cartílago articular, pero sus concentraciones molares son similares a proteoglicanos grandes y agregados. Hay macromoléculas multifactoriales que se unen a los colágenos, factores de crecimiento, heparina y una gran variedad de diversas moléculas. Se reconocen 3 proteoglicanos pequeños en el cartílago articular y todos son miembros de la familia de glicoproteínas ricas en leucina (Oldberg *et al* 1989; Plaas *et al.* 1989, Rosenberg *et al.* 1985). Las proteínas nucleares de estos proteoglicanos están separadas pero muestran aproximadamente un 55% de homología, con un peso molecular de aproximadamente 38 kDa. Los proteoglicanos pequeños que se han reconocido en el cartílago articular son la decorita, los biglicanos y fibromodulina.

1.9.4 Proteínas no colágenas de la matriz extracelular

Las glicoproteínas no colágenas y no proteoglicanos constituyen una porción pequeña pero significativa del cartílago articular (Fife y Brandt 1993). La función de muchas de estas proteínas no se conoce aún, con la excepción de las proteínas de enlace. Tres proteínas de enlace, con masas moleculares aparentes de 48, 44 y 41 kDa, han sido identificadas en el bovino normal y en el cartílago humano. Estas comparten un aminoácido común de la espina dorsal, sugiriendo que se originan a partir de un gen individual, pero difieren en el grado de glicosilación. La proteína de enlace más pequeña al parecer se deriva de la mayor como resultado de degradación proteolítica (Campbell y Roughley *et al.* 1986). La proteína de enlace se adhiere de forma no covalente a un sitio específico cerca de la porción N de la

proteína nuclear del agregan y el hialuronato (Franzen *et al.* 1981; Perin *et al.* 1987). De ésta manera se estabiliza la interacción entre el agregan y el hialuronato en presencia de temperaturas y pH extremos, fuerzas mecánicas como la ultracentrifugación y solventes disociativos (Hardingham 1979).

1.9.5 Cambios de la matriz extracelular

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

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

et al. 1987).

1.10 Enzimas capaces de degradar cartílago

1.10.1 Metaloproteinasas de la matriz (MMP's)

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

La familia de las metaloproteinasas se divide en cuatro grupos: 1) Colagenasas tisulares (MMP-1). 2) Gelatinasas: gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9).

3) Estromelisinias: la 1 (MMP-3), 2 (MMP-10), 3 (MMP-11). Pueden degradar proteoglicano y colágeno.

4) Colagenasa neutrofila (MMP-8), PUMP-1 (MMP-7). (Poole AR. 1993).

La IL-1 y el TNF- α estimulan la producción de una gran variedad de proteínas, incluyendo colagenasa, estromelisina y gelatinasa, (Campbell y Roughley 1986). Las MMP's son una subfamilia de proteinasas activadas a pH neutro, las cuales juegan un papel importante en los cambios de las proteínas de la matriz extracelular. Las colagenasas y otras MMP's de la matriz pueden ser activadas por kalikreina y proteinasas séricas que se encuentran en el cartílago articular, además de la catepsina B.

1.10.2 Proteinasas cisteínicas

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

La catepsina B y la L se adhieren a la terminal de los péptidos de colágeno que contienen los enlaces covalente cruzados dentro y entre las moléculas; sin embargo la catepsina L es la más activa de las dos (Werb 1989). La catepsina B también se adhiere a la región de ácido hialurónico del proteoglicano del cartílago y degrada la región glicosaminglucano (GAG) en pequeños fragmentos (Morrisom *et al.* 1987; Roughley y Barret 1977). Cuando se observaron las acciones degradativas de la catepsina B y L en el cartílago articular humano, se encontró que la catepsina L degrada de forma más extensa a los agregados proteoglicanos que la catepsina B. Ambas catepsinas, B y L generan sitios de adhesión múltiples en las proteínas de enlace LP-1, LP-2 y LP-3 (Nguyen *et al.* 1990). También se ha sugerido que la Catepsina B actúa como activador de las MMP's (Eckhout y Vaes 1977). La catepsina B existe en tres diferentes estados de actividad: completamente latente, parcialmente activa y totalmente activa. Para exhibir realmente actividad endopeptidasa, parece ser que la enzima debe estar de modo inestable a la alcalinidad (Mort y Recklies 1986).

Se han reportado niveles altos de catepsina B en el cartílago humano degradado (Bayliss y

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

Otras investigaciones utilizando enzimas e inhibidores purificados del cartílago articular y de la membrana sinovial de articulaciones osteoartíticas de humanos muestran que tanto los condrocitos como los sinoviocitos producen una proteasa cisteínica que tiene las mismas propiedades que la catepsina B de otros tejidos (Martel-Pelletier *et al.* 1990). Los inhibidores proteasa cisteínicos también son secretados por condrocitos o sinoviocitos y se presentan en al menos dos formas: de alto y bajo peso molecular (Martel-Pelletier *et al.* 1990; Ghosh *et al.* 1986). En lesiones osteoartíticas leves, los niveles de catepsina B en el cartílago se muestran elevados. En experimentos con células sinoviales fibroblásticas la secreción de una proteinasa cisteínica latente (principalmente catepsina B) fue estimulada tanto por IL-1 como por el TNF- α . Las calpaínas, proteasas cisteínicas calcio dependiente del citosol (no lisosomales), también se encuentran en tejido sinovial osteoartítico y son capaces de degradar proteoglicano (Suzuki *et al.* 1990). Las calpaínas pueden degradar rápidamente monómeros de proteoglicanos intactos y agregados (Suzuki *et al.* 1991).

La catepsina B, degrada los componentes del cartílago como el colágeno y el agregan *in vitro*, y ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades de desarrollo ortopédico en el caballo, incluyendo OC. En ésta enfermedad se ha observado que la expresión de la catepsina B aumenta los grupos de condrocitos alrededor de las lesiones necróticas

(Hernández-Vidal *et al.*, 1998). Se ha hipotetizado que el impacto biomecánico puede jugar un papel en la patogénesis de OC. (Poole, 1993). Así mismo, el impacto biomecánico aplicado como extensión de dos dimensiones para aislar condrocitos puede causar incremento, decremento o no causar cambios en los niveles de RNAm de varias enzimas.

1.11 Síntesis de la catepsina B

La conversión de la pro-enzima a su forma madura activa, probablemente representa el paso clave en el proceso de degradación. Muchas de las 4 clases de proteinasas (metaloproteinasa, aspárticas, serina y proteasas cisteínicas) son sintetizadas como precursores latentes de alto peso molecular que se convierten en su forma madura por medio de una división proteolítica de la pro región (Gal *et al.* 1985; Hanewinkel *et al.* 1987; Nishimura *et al.* 1988a; Kominami *et al.* 1988; Mach *et al.* 1992; Wiederanders *et al.* 1992). Se pensaba que las formas activas de éstas enzimas residían solamente en los lisosomas, comenzando con la propuesta de que la activación puede ocurrir mas tempranamente en el camino biosintético como se demostró para la maduración del precursor de la proteinasa aspártica catepsina D (Gieselmann *et al.* 1983; Rijnbouts *et al.* 1992).

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

de la proteinasa bajo condiciones fisiológicamente relevantes es principalmente el resultado del proceso intramolecular.

In vivo, la catepsina B es sintetizada como una pro-enzima (San segundo *et al.*, 1985; Chan *et al.*, 1986) en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y co-translacionalmente glicosilado. Después de ser glicosilada, la pro catepsina B (40-42kDa) es liberada a los lisosomas por medio de los receptores de la manosa 6-fosfato/IGF II en la superficie celular (Hasilik y von Figura, 1984; Hanewinkel *et al.* 1987; Kornfeld 1990; Kornfeld 1992). La catepsina B se convierte a su forma madura con una sola cadena (30-32-kDa), presumiblemente en el compartimiento endosomal/prelisosomal por glicosilación post- transcripcional y una proteólisis limitada, la cual es procesada más adelante de dos formas (25-27-kDa) (Kominami y Katunuma, 1989). La catepsina B completamente procesada se puede encontrar en los lisosomas de manera tipo-célula-específica, asociada con la membrana del plasma o secretada en forma de doble cadena, consistiendo en una cadena pesada y una ligera vinculadas a un enlace disulfuro (Hanewinkel *et al.* 1987; Mach *et al.* 1992). Sólo pequeñas cantidades de la proenzima en estado latente es secretada en el fluido extracelular; se conoce poco acerca del proceso extracelular de la procatepsina B en estado latente *in vivo*, aunque algunos reportes han sugerido que la elastasa neutrofila podría estar involucrada (Keppler *et al.* 1994; Burnett *et al.* 1995). Además, también se ha sugerido que la catepsina D podría regular la actividad de la catepsina B por medio de la inactivación de los inhibidores naturales de la proteínasa cisteínica (Lenarcic *et al.* 1991) (Figura 1.8).

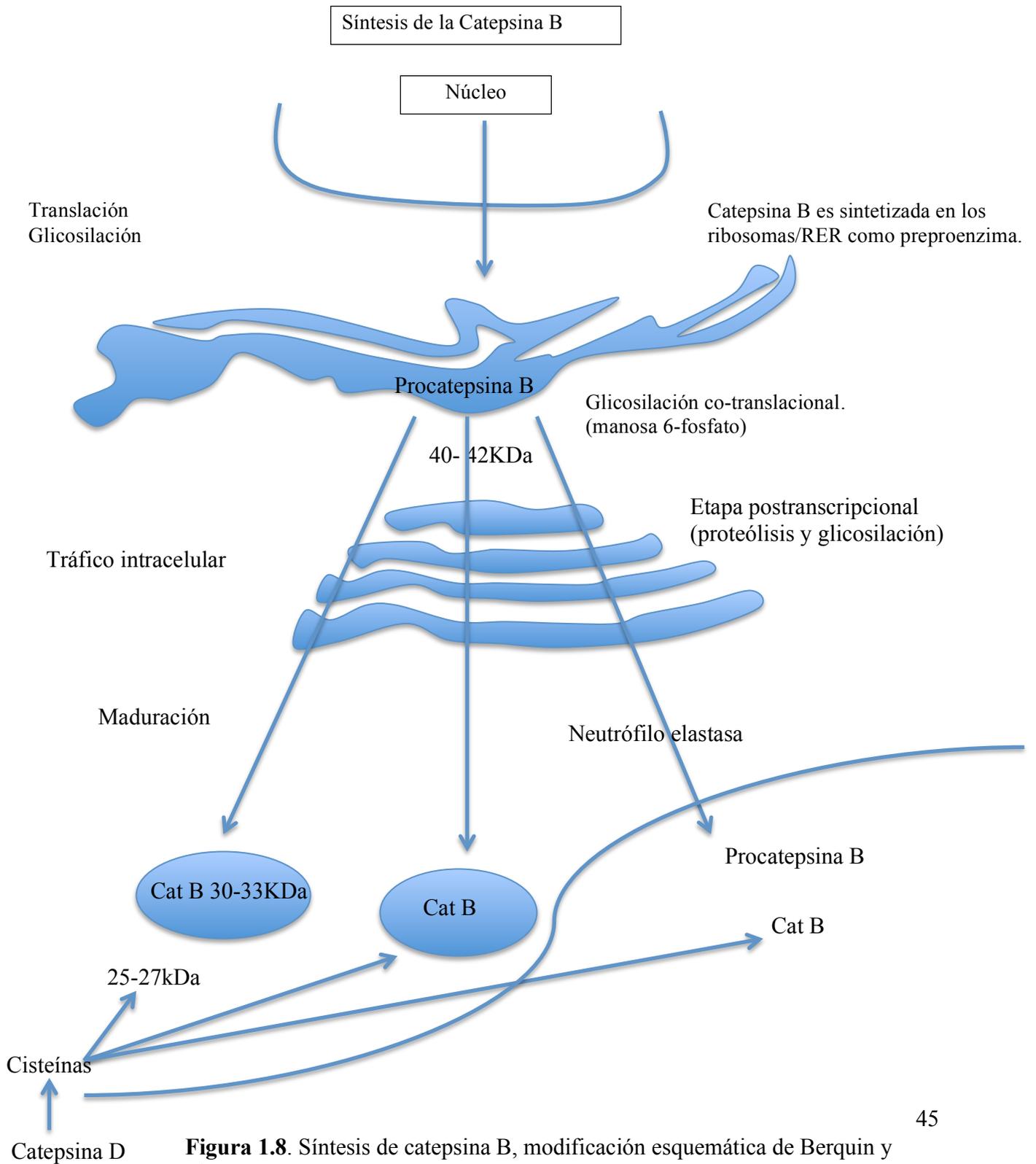


Figura 1.8. Síntesis de catepsina B, modificación esquemática de Berquin y Sloane. 1996.

1.11.1 Modulación fenotípica y expresión de la catepsina B

Las MMP's habían sido las enzimas que más atención habían recibido, hasta que se demostró que las hidrolasas endógenas son las responsables de la auto degradación del cartílago (Lucy *et al.* 1961; Ali, 1964). Niveles elevados de catepsina D fueron encontrados en cartílagos con OA comparado con el cartílago normal (Ali y Evans, 1973; Ali y Bayliss, 1975). Sin embargo, se ha pensado que esa acción se restringe al catabolismo intracelular de las macromoléculas de la matriz dentro de los condrocitos (Vittorio *et al.* 1986). De igual forma se han encontrado cantidades significantes de Catepsina B en cartílago humano con OA comparado con el cartílago normal (Bayliss y Ali, 1978; Martel-Pelletier *et al.* 1990; Baici *et al.* 1995a), en sinovio reumatoide (Mort *et al.* 1984; Trabandt *et al.* 1991), y en fluido sinovial (Codorean *et al.* 1981; Lenarcic *et al.* 1988; Gabrijelcic *et al.* 1990). Experimentos *in vitro* han sugerido un rol de la Catepsina B en la degradación de proteoglicano del cartílago por IL-1 (Buttle *et al.* 1992; Buttle y Saklatvala 1992; Buttle *et al.* 1993). La participación de la catepsina B propuesto en este contexto fue acerca del incremento de la actividad intracelular de una MMP estimulada por la citocina como el mediador efectivo de la degradación (Buttle *et al.* 1993). Estos resultados concuerdan con la observación hecha por Baici y Lang (1990), donde el almacenamiento intracelular y la biosíntesis de la catepsina B fueron estimuladas por IL-1 β , pero no su liberación.

Una manera de estimular a los condrocitos para producir elevados niveles de catepsina B es por medio de la modulación fenotípica (Baici *et al.* 1988). Los condrocitos normales almacenan intracelularmente Catepsina B en muy pequeñas cantidades sin que se presente secreción, pero después de la modulación fenotípica en cultivo mono capa celular,

aumentan la biosíntesis, almacenamiento y secreción de la enzima (Baici *et al.* 1988). Esta bien documentado que el fenotipo de la célula varía a través de varios subcultivos (Fröhlich *et al.* 1995). Existe evidencia de que los condrocitos hipertróficos pueden contribuir en el proceso de osificación endocondral experimentando una diferenciación osteogénica basados en estudios de cultivos *in vitro* de células y órganos (Descalzi Canceda *et al.* 1992; Gentili *et al.* 1993; Galotto *et al.* 1994). El cambio fenotípico de condrocito a osteoblasto como célula es entonces un tema que debe ser retomado en próximas investigaciones biológicas sobre condrocitos y puede servir como paradigma para otros casos de cambios fenotípicos en células diferenciadas.

1.12 Distribución de la carga en el cartílago articular

El cartílago articular puede experimentar grandes deformaciones volumétricas durante su actividad normal pero también recobrar su forma original durante los periodos de descanso. Los impactos aplicados a la superficie articular son compartidos entre varios componentes de la matriz. Por ejemplo, las fibras de colágeno dominan todo lo que se refiere al ambiente tensil (Schmidt *et al.* 1990), donde las propiedades osmóticas de los proteoglicanos proporcionan resistencia a la compresión volumétrica (Sporn *et al.* 1988). En una articulación no impactada, las superficies articulares opuestas no son completamente congruentes (Gardner y McGillvray 1971). Sin embargo, la situación cambia cuando las superficies sufren un impacto de carga. Debido a la relativa suavidad del cartílago, existen dos consecuencias debido al impacto relacionados con la deformación del cartílago: 1) incremento del área de contacto reduciendo los niveles de estrés del tejido, e 2) incremento de la conformación articular (proveído de una estabilidad adicional). Además, la adaptación

de la forma en el cartílago impactado puede ayudar a formar y retener un fino gel lubricante concentrado entre las superficies articulares (Walker *et al.* 1968; Swann 1985).

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

La presión osmótica de los proteoglicanos a la concentración presente en el cartílago (aprox. 5 a 10 veces una concentración mayor que la que existe en otros tejidos conectivos) se encuentra en un rango de 0.1 a 0.2 μPa (Maroudas 1980; Maroudas A. *et al.* 1992). La mayor contribución de la presión osmótica de los proteoglicanos (aprox. 75 a 85% del total) proviene de los grupos carboxyl y sulfato negativamente cargados de los glucosaminglucanos y de los cationes asociados (efecto iónico o de Gibbs-Donnan) (Akizuki *et al.* 1987). El agua es atraída hacia el cartílago debido a la densidad muy cargada, y la presión osmótica puede contribuir a más del 50% de la rigidez compresiva del cartílago articular (Mow *et al.* 1990; Lai *et al.* 1989). Esta presión es balanceada por el estrés tensil de la malla de colágeno. La magnitud de la presión depende de: 1) la densidad de los grupos cargados en los proteoglicanos, 2) la distribución de los grupos cargados a lo largo de las ramas de los proteoglicanos, y 3) la conformación molecular de los proteoglicanos. La magnitud de la fuerza de resistencia depende de 1) la organización

estructural, 2) la rigidez tensil, y 3) la fuerza de la malla de colágeno (Akizuki *et al.* 1986). Existe una correlación positiva elevada entre los módulos tensiles intrínsecos de la matriz extracelular y la masa colágeno/proteoglicano (Schmidt *et al.* 1990; Mow *et al.* 1992).

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

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Antisuero

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

2.1.2 Anticuerpos secundarios

Se utilizaron inmunoglobulinas de conejo (IgG) anti-ovino conjugadas con FITC y con peroxidasa, de laboratorios Dako-Denmark, las cuales fueron proporcionadas por la Dra. Elisabeth Davies del Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.

2.1.3 Sustancias y agentes químicos

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

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

2.1.4 Materiales de cultivo de tejidos

Tubos cónicos para centrifuga de 50 ml	Falcons
Colagenasa tipo H (bacterial, EC 3.4.24.3)	Boehringer Mannheim
Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	BHD
Traste de cultivo (100x20 mm)	Falcons
Portaobjetos con compartimientos	Nunc, Inc.
Ditiotreitol (DTT)	Sigma
Disodio hidrógeno ortofosfato (Na ₂ HPO ₄)	Sigma
Disodio hidrógeno ortofosfato (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Sigma
Medio Modificado Dulbecco's-Eagle's	Gibco BRL
Fungizona	Gibco BRL
Suero fetal bovino	Sera-Lab
2-hidroxi-5-nitrobenzaldehido	Sigma
Medio Iscove's	Gibco BRL
L-cisteína	Sigma
Filtros minisart (0.20 y 0.45 µl)	Sartorius
Portaobjetos multi-test 8 compartimientos	Flor Labs
N-carbobenzoxi-fenilalanil-arginil-4- metoxi-beta-naftilamida (Z-Ala-Arg-Arg-4MβNA)	Bachem
Cámara de conteo Neubauer	WSI Ltd.
Penicilina	Gibco BRL
Pronasa E (proteasa tipo XIV para <i>Streptomyces griseus</i>)	Sigma
Tijeras – curvas “Noyes”	DePuy® Helathcare
Ortofosfato de hidrógeno dihidrogenado (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	Sigma
Placas de Petri cuadradas (100mm, 25 pozos)	Sterilm
Estreptomina	Gibco BRL
Frascos de cultivo de tejido (25-75- cm ²)	Corning
Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4- guanidinio)	Sigma
Tripsina (EC 3.4.21.4)	Sigma
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	Sigma

2.1.5 Soluciones amortiguadoras

2.1.5.1 Soluciones amortiguadoras para inmunolocalización

Solución salina fosfato buferada pH 7.4 (PBS)

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

Preparar con 1 Lt de H₂O destilada

100 mM búfer fosfatado pH 6.0

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

Preparar 1 L con H₂O destilada y ajustar pH.

Solución buferada de bloqueo

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

Solución buferada de lavado

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

Preparar con 100 ml de PBS.

Solución buferada tris-HCl 0.1 M pH 7.6

Trizma – Hcl	100 mM	7.8 g
--------------	--------	-------

Mezclar con 500 ml de agua destilada y ajustar el pH

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

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

2.1.5.2 Tinción para inmunolocalización

Reacción de color DAB

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

Tinción nuclear

Solución verde metilo	0.01% (p/v)	0.025 g
Mezclar con 250 ml H ₂ O destilada		

2.1.6 Tinción histológica

Azul de toluidina

Azul de toluidina	0.5% (p/v)	0.5 g
Etano	15%	5 ml

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

2.1.7 Soluciones para histología

2.1.7.1 Paraformaldehído 4% pH 7.4 (PFA)

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

Mezclar con 500 ml de PBS.

2.1.7.2 Poly – L – lisina

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

Mezclar con 500 ml de agua destilada

2.1.8 Medios

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

DMEM (Dulbeccos modified eagles medium)

Na HCO₃

pH 7.4 con 1M NaOH

Mezclar con 1 Lt de agua.

Antes de usar añadir 200 UI/ml benzyl penicilina.

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

Preparar 1 Lt con H₂O Antes de usar añadir 200 UI/ml benzil penicilina, 100 µg/ ml de estreptomicina y 2.5 µg/ml de fungizona

2.2 Métodos

2.2.1 Medio de cultivo de tejido

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

2.2.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos fueron preservados a una temperatura de 37°C en una atmósfera de agua saturada que consistía en 95% aire y 5% CO₂. El medio de cultivo fue suplementado con 10% (v / v) de suero fetal bovino (FCS).

2.2.3 Tejidos

Para este estudio se utilizaron muestras de cartílago articular normal fetal de caballos, los cuales fueron abortados.

2.2.3.1 Muestras de cartílago y hueso subcondral

Se obtuvieron muestras completas de cartílago y hueso subcondral normal de la cresta lateral de la tróclea del fémur de 25 caballos en etapa fetal. Las muestras fueron colectadas

dentro de las primeras 3-6 horas post-mortem de caballos sin historia de enfermedad de desarrollo ortopédico (OA) Para este estudio se utilizaron únicamente animales cuyas edades estaban entre 157 días-1 mes. Las muestras fueron preparadas en parafina o inmediatamente congeladas en O.C.T con nitrógeno líquido (- 186°C) para estudios inmunocitoquímicos.

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

2.2.4 Métodos inmunocitoquímicos

2.2.4.1 Preparación portaobjetos

Los portaobjetos se trataron con adherente poly-L-lisina (Sigma, UK) por 5 minutos y se secaron por 1 hora a 60°C.

2.2.4.2 Preparación de las secciones de cartílago y hueso subcondral

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

2.2.4.3 Tinción inmunofluorescente

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

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

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

2.2.5 Tinciones histológicas

2.2.5.1 Azul de toluidina

Las secciones fueron teñidas con azul de toluidina para observar la pérdida de proteoglicanos de la matriz extracelular del cartílago articular. Las secciones se tiñeron por 10 minutos en azul de toluidina, posteriormente se lavaron dos veces en agua destilada por 25 minutos, después se sumergieron en etanol al 70% por 10 minutos, en etanol al 90% por 5 minutos, en alcohol absoluto por 1 minuto y finalmente en xilol por 2 minutos. Los portaobjetos se montaron con DPX (Gurr®, UK).

2.2.6 Prueba de impacto del cartílago

Las muestras de cartílago fueron impactadas individualmente utilizando la torre de caída libre siguiendo el método descrito por Jeffrey *et al* 1995 Figura 2.1. La energía generada en las muestras por la prueba de impacto fue calculada tomando en cuenta la altura y el peso de

la masa. Para estos experimentos, la muestra del cartílago se colocó en la torre de caída libre y una carga de 500 g se dejó caer de una altura de 5 cm (energía de bajo impacto, 0,25 J), 10 cm (energía de impacto medio, 0,49 J) y 20 cm (energía de alto impacto, J 0,98) (Tabla 2.1). Cálculos de desaceleración y rigidez dinámica del cartílago después de la prueba de impacto proporcionan los siguientes valores estimados, por ejemplo, de 340 ± 160 MPa para una masa de 500 g y una altura de 5 cm y 660 ± 140 MPa a una altura de 10 cm.

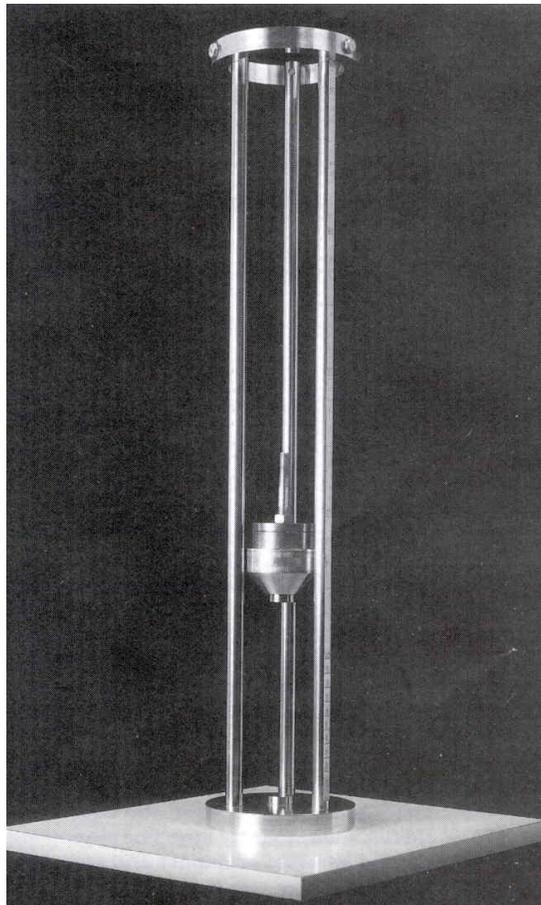


Figura 2. 1. Torre de caída libre.

La velocidad de presión inicial media fue de 2300 (\pm 220) / s para 500 g a una altura de 10 cm y 1 760 (\pm 80) de 5 cm. Jeffrey *et al* 1995. Las muestras sometidas a la prueba de impacto junto con las muestras control se lavaron en solución salina fosfato-buferada y colocaron inmediatamente en paraformaldehído al 4% para el análisis inmunohistoquímico o se cultivaron durante 4 h, 8 h, 1, 2, o 5 días y se fijaron para inmunohistoquímica. Todas las muestras se congelaron en Tissue-Tek (OCT Sakura, The Netherlands) y se almacenaron a - 20° C hasta su uso. Un total de 3 muestras de cartilago se utilizaron por cada grupo sometido a prueba de impacto y uno para el grupo control correspondiente (Tabla 2.1).

Prueba de Impacto	Energía de Impacto (J)	Número de Muestra	Masa (mg)
Control	0	C.1	17.00
		C.2	19.95
		C.3	18.59
500 g masa, 5 cm altura de caída (Baja)	0.25	B.1	15.00
		B.2	17.64
		B.3	15.07
500 g masa, 10 cm altura de caída (Media)	0.49	M.1	14.27
		M.2	17.70
		M.3	17.57
500 g masa, 20 cm altura de caída (Alta)	0.98	A.1	17.12
		A.2	16.81
		A.3	14.30

Tabla 2. 1. Energía del impacto correspondiente al peso de la masa y la altura de la caída. n = 3 por cada grupo. Tiempo en cultivo = 0h; J = joule.

RESULTADOS

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

Estudios preliminares (Hernández-Vidal *et al.* 1996) han confirmado por medio de los métodos de inmunofluorescencia y biotina/estreptavidina-horseradish peroxidasa una distribución heterogénea de la catepsina B en el cartílago articular normal del caballo. Se examinaron quince secciones de 8mm de espesor cada muestra por medio de un microscopio ligero de alta resolución.

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

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

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

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

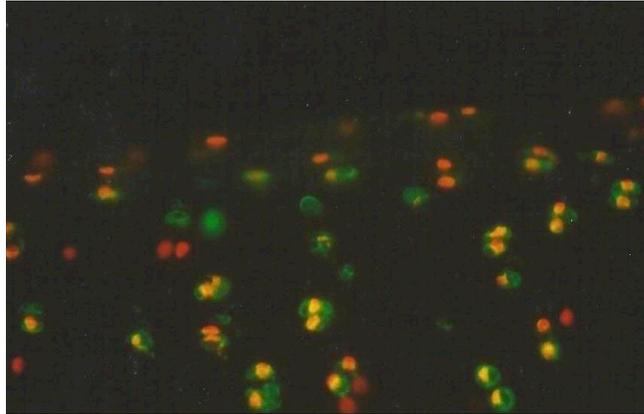
(impactado) utilizando microscopio de alta resolución.

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

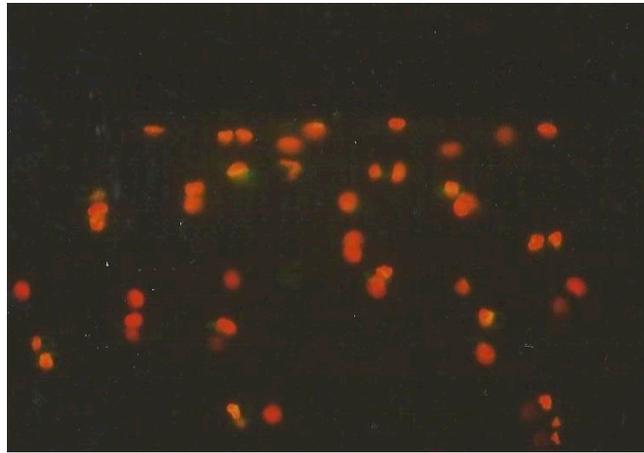
El antisuero utilizado en este estudio mostró reacción cruzada con el homólogo de equino para catepsina B. La especificidad de esta enzima para el antisuero fue confirmada anteriormente por Hernández-Vidal *et al.* 2002 por medio del electroforesis en gel SDS y análisis de Western blot .

3.2.2. Análisis inmunohistoquímico

El análisis inmunocitoquímico de las muestras de cartílago control (sin impacto) mostraron una tinción intracelular moderada de catepsina B en los condrocitos en todo el cartílago (Tabla 3.1). Aunque hubo una ligera variación entre las diferentes muestras, se estimó que el 10 al 30% de los condrocitos en todas las zonas fueron positivos para la catepsina B. Condrocitos inmunonegativos fueron visualizados usando contra tinción de rojo nuclear solido *Materiales y Métodos* (Sección 2.2.6.4). No se observó diferencia zonal en la inmunolocalización a excepción de las pocas células elongadas adyacentes a la superficie articular que fueron constantemente negativos (Figura. 3.1A). No hubo evidencia de la liberación de la enzima en la matriz extracelular (MEC). Los anticuerpos control dónde el anticuerpo primario fue sustituido por suero normal ovino, no mostraron tinción alguna (Figura. 3.1B).



A



B

Figura 3.1. Localización inmunocitoquímica de catepsina B en cartílago articular fetal equino después de una prueba de impacto.

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

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

La prueba de bajo impacto (500 g, a 5 cm) incrementó el número de condrocitos inmunopositivos a la catepsina B a un 40-50% en la zona articular (Figura. 3.2).

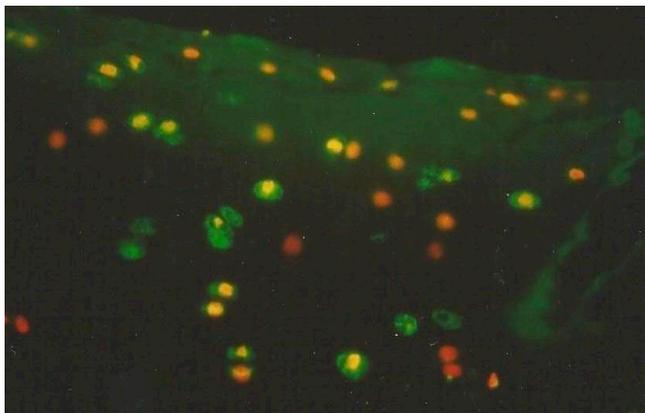


Figura 3. 2. Localización inmunohistoquímica de catepsina B en cartílago articular fetal de equino ($\times 40$). Inmediatamente después de una prueba de impacto baja (B 0h).

También se incrementó la intensidad de la tinción, siendo esta difícil de cuantificar. No se observó cambio en el nivel de la tinción en la zona media, mientras que en la zona profunda menos del 10 % de condrocitos mostraron una tinción baja (Tabla 3.1). La prueba de impacto media (500 g, a 10 cm) y alta (500 g, a 20 cm) aumentaron el daño del cartílago, provocando fisuras, resultando en una notable reducción en el número de condrocitos y una marcada disminución en la tinción de catepsina B. Menos de 10 % de los condrocitos mostraron una tinción débil en todas las zonas excepto las células en la zona articular del cartílago sometido a una prueba de impacto media, las cuales mostraron una tinción similar a la observada en las muestras control (Tabla 3.1). Interesantemente se observó una marcada tinción de la matriz extracelular (MEC) en todas las muestras después de la prueba de impacto. Esta tinción de la matriz se restringe a la zona articular dónde se observó un aumento en la intensidad proporcional al aumento del impacto.(Figura. 3.3A, B y C). Las

muestras control en donde el suero para catepsina B de ovino anti humano (α h, U554/4) fue reemplazado por el suero pre inmune (U554/1) fueron negativas (Figura. 3.1B).

CATEPSINA B				
Grupo	Control	Impacto Bajo	Impacto Medio	Impacto Alto
Tinción Zona-Art	+	++	+/-	+/-
Tinción Zona-Media	+	+	+/-	+/-
Tinción Zona-Profunda	+	+/-	+/-	+/-
Tinción MEC	No	Si	Si	Si

Tabla 3. 1 Distribución de catepsina B inmediatamente después de la prueba de impacto (a una baja, media y alta energía de impacto) en muestras de cartílago articular fetal equino.

+/- = < 10%, tinción débil; + = 10-30%, tinción moderada; ++ = 40-50%, tinción moderada; +++ = 50-70%, tinción fuerte; ++++ = 70-90%, tinción fuerte; +++++ = >90% tinción fuerte.

C, B, M, A, combinación de resultados de todas las muestras control, así como de la energía de impacto baja, media y alta.

Matriz extracelular (MEC)

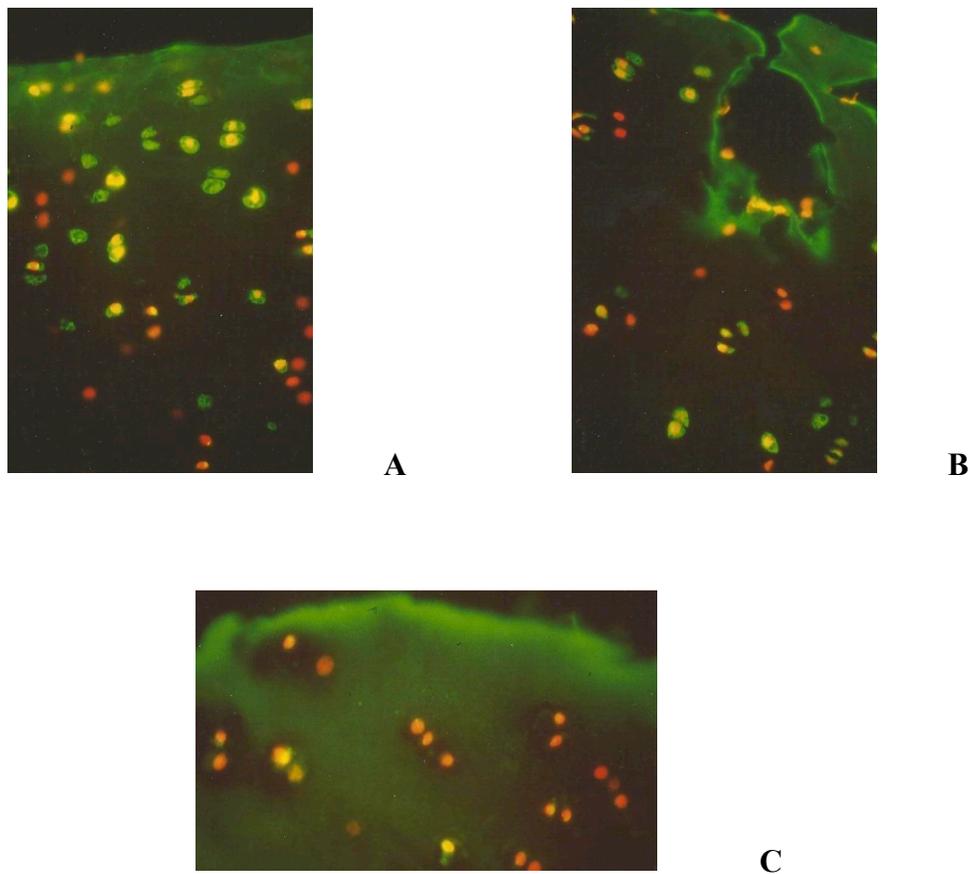


Figura 3. 3. Localización inmunohistoquímica de catepsina B en cartílago articular fetal de equino ($\times 40$).

- (A) 1 día en cultivo después de una prueba de impacto baja (B 1d).
- (B) Inmediatamente después de una prueba de impacto media (M 0h).
- (C) Inmediatamente después de una prueba de impacto alta (A 0h).

3.3. Efecto del tiempo en cultivo en la distribución de la enzima después de la prueba de impacto.

La expresión y distribución de la catepsina B fue investigada en el cartílago articular equino sometido solo a una prueba de bajo impacto durante largos periodos de tiempo en cultivo (0h, 4h, 8h, 1 día, 2 días, 5 días). El bajo impacto (50g, 5cm) fue seleccionado ya que demostró que no había daño significativo en el tejido y presentaba un aumento en la expresión de la enzima.

3.3.1 Análisis inmunohistoquímico.

Todas las muestras analizadas después de la prueba de impacto baja y seguidas por 4 a 8 horas en cultivo mostraron una disminución de la catepsina B en condrocitos en la zona articular comparable con la observada a 0 h (Tabla 3.2). Después de 1 día en cultivo posterior al impacto, un marcado aumento de la tinción se observó en la zona media, y para los días 2 y 5 los niveles de tinción en las zonas media y profunda eran mucho más elevados que en las muestra control, mostrando una tinción intracelular moderada en aproximadamente el 50% de los condrocitos (Tabla 3.2). Se observó cierta evidencia de la formación de agrupaciones de condrocitos después de 8 horas y 1 día en cultivo en las muestras experimentales. Estos grupos fueron más notables en las áreas de necrosis del cartílago dañado por la prueba de impacto y mostraron en particular una intensa tinción intracelular. En estas mismas muestras se observó una inmunotinción de la matriz extracelular en la zona articular (Figura. 3. 3A y B).

Catepsina B							
Grupo	C	B 0h	B 4h	B 8h	B 1 día	B 2 días	B 5 días
Tinción Zona-articular	+	++	+	+	++	++	++
Tinción Zona-media	+	+	+	+	++	++	++
Tinción Zona-profunda	+	+/-	+/-	+	++	++	++
Tinción MEC	NO	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Tabla 3. 2 Distribución zonal de catepsina B en cartílago articular fetal de equino después de una prueba de impacto y tiempo en cultivo. +/- = < 10%, tinción débil; + = 10-30%, tinción moderada; ++ = 40-50%, tinción moderada; +++ = 50-70%, tinción fuerte; ++++ = 70-90%, tinción fuerte; +++++ = >90% tinción fuerte. C, combinación de resultados de todas las muestras control. n= 3 for each time point . B= combinación de resultados de todas las muestras sujetas a prueba de impacto baja; Matriz extracelular (MEC), h horas en cultivo después del impacto; d días en cultivo después del impacto.

Las muestras control las cuales estuvieron en cultivo durante el mismo tiempo que las muestras experimentales mostraron una inmunotinción moderada de catepsina B en el 10-30% de los condrocitos en todas las zonas del cartílago (Figura 3.4). El patrón de tinción para esta enzima se mantuvo sin cambios. No hubo ningún daño aparente del cartílago, tampoco cambios en la densidad de condrocitos y no hubo evidencia de la liberación extracelular de las enzimas con el tiempo en cultivo.

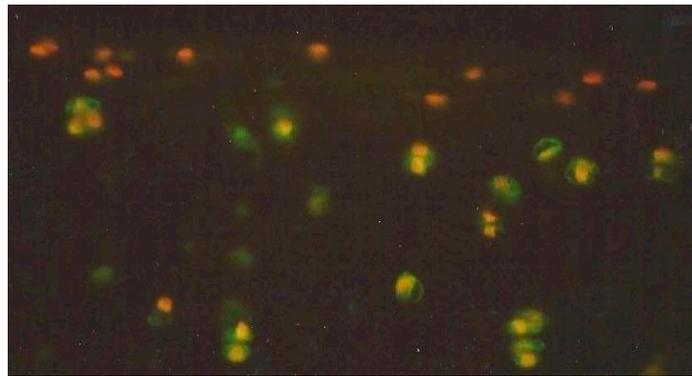


Figura 3. 4. Localización inmunohistoquímica de catepsina B en cartílago articular fetal de equino (*x* 40). Catepsina B, Cartílago articular sin impactar (C 0h).

DISCUSIÓN

La integridad de la matriz extracelular del cartílago depende de la estimulación mecánica. El ejercicio y los estudios biomecánicos de pruebas de impacto sobre las articulaciones sanas han demostrado que la aplicación de impacto anormal, ya sea alto o bajo, tiene un efecto significativo sobre el metabolismo de los condrocitos resultando en cambios celulares y bioquímicos que producen frecuentemente la degradación del cartílago (Murray *et al.* 1999, Todhunter 1996). En la actualidad, sin embargo, muy poco se sabe acerca de los mecanismos que median las respuestas metabólicas de los condrocitos a estímulos mecánicos (Mow *et al.* 1999). Estudios *in vitro* utilizando condrocitos aislados y muestras de cartílago están siendo desarrollados específicamente para permitir la interpretación y el análisis de los eventos moleculares precisos que intervienen en las respuestas a una variedad de tensiones y deformaciones mecánicas inducidas experimentalmente (Lee *et al.* 1998- Millward-Sadler *et al.* 1999). En este estudio se analizaron los cambios en la distribución de la enzima degradativa de la MEC, la catepsina B en respuesta a diferentes energías de impacto.

La inmunotinción mostró que la prueba de impacto causó una alteración en el patrón de tinción de esta enzima. Se demostró que tanto el número de condrocitos inmunopositivos para la catepsina B, y el nivel de tinción variaron dependiendo de la energía de impacto y la duración en cultivo después de la prueba de impacto. Los cambios más notables observados inmediatamente después de la prueba de impacto alto fueron, un aumento en la intensidad de la tinción y en el número de células inmunopositivas en todas las zonas del cartílago. Estas diferencias observadas en el patrón de tinción enzimática después de la prueba de impacto baja, media y alta reflejan simplemente la extensión de los daños infligidos al

cartílago. Como se reportó anteriormente, la prueba de impacto baja provoca un daño mínimo mientras que la de impacto media y alta causan el aumento en la fisuración del tejido y una disminución significativa en la viabilidad de condrocitos (Jeffrey *et al.* 1995). Por lo tanto se podría esperar que las pruebas de energía altas indujeran cierto grado de deformación en los condrocitos. En este estudio preliminar, se observaron cambios tanto en tamaño y forma celular y estos serán objeto de un análisis más detallado. Siendo que los condrocitos reconocen y responden a cambios morfológicos como las señales, que regulan su actividad metabólica y la expresión génica (Guilak *et al.* 1999), tal evento podría explicar las diferencias en los niveles de las enzimas detectadas. De acuerdo con esta sugerencia, otros estudios han demostrado una disminución general de la actividad sintética de los condrocitos en respuesta a cargas de compresión estáticas (Jeffrey *et al.* 1995, Lee *et al.* 1998).

De igual forma, la disminución en los niveles de enzimas observadas con el aumento de carga puede ser el resultado de daño y la muerte de condrocitos. Esto debe ser confirmado por estudios de doble marcaje fluorescente *in situ*.

Otra característica interesante de estas observaciones es la variación en la respuesta de los condrocitos en diferentes zonas del cartílago. Es bien conocido que el cartílago es heterogéneo, con claras diferencias en el metabolismo, composición de la matriz extracelular, y morfología de los condrocitos evidente con la profundidad desde la superficie articular (Aydelotte *et al.* 1993, Aspden 1994). Estos resultados, junto con los de Lee *et al.* 1998 reflejan aspectos de esta heterogeneidad en las diferentes zonas del cartílago.

Por ejemplo, se cree que los condrocitos planos en la superficie articular son responsables de la absorción del impacto mecánico y la transmisión de la carga a través de las diferentes zonas al hueso subcondral subyacente (Mow *et al.*1999). Puede ser que los condrocitos articulares están protegidos por su matriz especializada y permanecen viables y metabólicamente activos durante las pruebas de impacto bajo. Existe evidencia que apoya esto en nuestras observaciones previas dónde la viabilidad de los condrocitos fue mayor después de un impacto rápido individual, en la superficie articular, que después del impacto lento, como el experimentado por los condrocitos en las zonas más profundas (Clements *et al.*2000). La prueba de impacto alta puede causar daño suficiente a los condrocitos, incluso en la superficie articular, reduciendo el nivel de las enzimas asociadas con las células.

Interesantemente la catepsina B fue liberada de los condrocitos en respuesta al impacto. Aunque se desconoce la importancia de su presencia en la MEC, parece poco probable que sea un resultado no específico de la compresión y la deformación de los condrocitos.

Los niveles de catepsina B en los condrocitos aumentó rápidamente en las zonas media y profunda durante el cultivo. Esta observación sugiere la recuperación de la actividad metabólica de los condrocitos, y junto con la aparición gradual de las agrupaciones de condrocitos, podría indicar un intento para reparar los daños de la MEC circundante, como se mencionó anteriormente (Baici *et al.*1995a, Baici *et al.*1995b , Hernández-Vidal *et al.* 1998). Tal vez la liberación de la catepsina B en la MEC y en particular su proximidad a los grupos celulares también implicaría un papel en la reparación. En efecto, tanto la catepsina B y D son capaces de degradar los componentes principales de la MEC y junto con las metaloproteinasas han sido implicados en una variedad de enfermedades que involucran la remodelación de tejidos (Fröhlich *et al.* 2001, McKerrow *et al.* 2000). Sin embargo, esta

función para la catepsina B ha sido a menudo cuestionada, ya que, tradicionalmente, muestra pH óptimo bajo. Los estudios que utilizan metodologías novedosas están demostrando aumento en la actividad de estas enzimas en tejidos (McKerrow *et al.* 2000, Hulkower *et al.* 2000, Hernández-Vidal *et al.*2008, Hernández-Vidal *et al.*2009) y se sabe ahora que la actividad de la endopeptidasa catepsina B es máxima a un pH de 7,4 (Linebaugh *et al.*1999) y que su actividad endopeptidasa puede ser estabilizado significativamente a pH neutro mediante la unión a glicosaminoglicanos similares a la heparina de la MEC (Almeida *et al.* 2001).

En resumen, en este estudio preliminar hemos demostrado que el patrón de inmunotinción para la catepsina B en muestras de cartílago articular fetal equino se altera en respuesta a una prueba de impacto. Este método de prueba de impacto ofrece un modelo útil para el estudio tanto de los efectos inmediatos de los estímulos mecánicos sobre la distribución de las enzimas y de la respuesta de recuperación posterior de los condrocitos en cultivo. Otros estudios están actualmente en marcha para cuantificar con precisión los cambios en la expresión, liberación y en la actividad enzimática *in situ* de la catepsina B en respuesta a pruebas de impacto.

REFERENCIAS

Adcocks, C., Ilic, M.Z., Mok, M.T., Robinson, H.C., Handley, C.J., and Buttle, D.J. (2000) in *Molecular Cell Biology of the Synovial Joint*, British Society for Matrix Biology Year 2000 Millenium Meeting, Royal Veterinary College, London, p.1.

Aigner T, Reichenberger E, Bertling W, Kirsch T, Stoss H & von der Mark K 1993 Type X collagen expression in osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology* 63 205–211. (doi:10.1007/BF02899263)

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

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

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

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

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

Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB, Tersariol ILS. (2001) Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem.* 12;276(2):944-951.

Appleton CT, Pitelka V, Henry J & Beier F 2007 Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 56 1854–1868. (doi:10.1002/art.22711).

Aspden, R.M. (1994) Fibre reinforcing by collagen in cartilage and soft connective tissues *Proc. Roy. Soc. Lond. B*-258, 195-200.

Aydelotte, M.B., Schumacher, B.L., and Kuettner, K.E. Heterogeneity of articular chondrocytes. In *Articular cartilage and Osteoarthritis* (Kuettner, K.E. Schleyerbach. R.Peyron JG and Hascall VC. eds.) pp. 237-249. Raven Press, New York, USA. 1992.

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

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

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

- Baici, A., Lang, A., Hörler, D., Kissling, R., R., and Merlin, C. (1995b) Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 54, 289-297.
- Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. (1993) Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Min Res*; 8(2):5565-5570.
- Bayliss, M.T., and Ali, S.Y. (1978) Studies on cathepsin B in human articular cartilage. *Biochem. J.* 171, 149-154.
- Bendtsen K., Petersen J., Halkjaer K.J., and Ingemann H.T. (1985) Interleukin-1-like activities in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis and traumatic synovitis. *Rheumatol.Int.* 5, 79-82.
- Benton H.P. and Tyler J.A. (1988) Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 154, 421-428.
- Berquin, I.M. and Sloane, B.F. (1996) Cathepsin B expression in human tumors. In: *Intracellular Protein Catabolism*. Eds: Suzuki, K. and Bond, J. Plenum Press, New York. Pp. 281-294.
- Bjelle, A. (1975) Content and composition of glycosaminoglycans in human knee joint cartilage, variation with site and age in adults. *Conne. Tiss. Res.* 3, pp. 141-147.
- Blain, E.J., Mason, D.J., and Duace, V.C. (2000) in *Molecular Cell Biology of the Synovial Joint*, British Society for Matrix Biology Year 2000 Millenium Meeting, Royal Veterinary College, London, p.8.
- Boskey, A.L. (1981) Current concepts on the physiology and biochemistry of calcification. *Clin. Orthop.* 167, pp. 225-257.
- Bowe EA, Henson FMD, Caddick J, Jeffcott LB, Davies ME. (2004). Response of equine cartilage to single impact load. *Online J Vet Res* 8: 33–41.
- Brighton C.T. (1978) Structure and function of the growth plate. *Clin. Orthop.* 22-23.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O & Peterson L 1994 Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New England Journal of Medicine* 331 889–895. (doi:10.1056/NEJM199410063311401)
- Brown, C., Hembry, R.M., and Reynolds, J.J. (1989) Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J. Bone Joint Surg.* 71, 580-593.
- Buckwalter, A.J., Rosenburg, L. and Tang, L. (1984) The effect of link protein on proteoglycan aggregate structure. *J. Biochem.* 259, pp. 5361-5363.
- Bullough, P. G., Yawitz, P.S. and Tafra, L. (1985) Topographical variations in the morphology and biochemistry of adult tibial plateau articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 3, pp.1.16.
- Burleigh, M.C., Barret, A.J., and Lazarus, G.S. (1974) Cathepsin B1: A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem. J.* 137, 387-398.

- Burnett, D., Abrahamson, M., Devalia, J., Davies, R.J. and Buttle, D.J. (1995). Synthesis and secretion of procathepsin B and cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro: modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, pp. 305-310.
- Buttle, D.J. and Saklatvala, J. (1992) Lysosomal cysteine endopeptidases mediate interleukin 1- stimulated cartilage proteoglycan degradation. *Biochem. J.* 287, pp. 657-661.
- Buttle, D. J., Saklatvala, J., Tamai, M. and Barret, A.J. (1992) Inhibition of interleukin 1- stimulated cartilage proteoglycan degradation by lipophilic inactivator of cysteine endopeptidases. *Biochem. J.* 281, pp. 175-177.
- Buttle, D.J., Handley, C.J., Ilic, M.Z., Saklatvala, J., Murata, M. and Barret, A.J. (1993) Inhibition of cartilage proteoglycan release by a specific inactivator of cathepsin B and an inhibitor of matrix metalloproteinases. Evidence for two converging pathways of chondrocyte-mediated proteoglycan degradation. *Arthritis Rheum.* 36, 1709-1717.
- Campbell, I.K. and Roughley, P. J. (1986) The action of human articular cartilage metalloproteinase on proteoglycan and link protein. *Biochem. J.* 237, pp. 117-122.
- Carlson C. S., Hilley H. D., Henrikson C.K., and Meuten D. J. (1986) The ultrastructure of osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in growinf swine. *Calcif. Tissue Int.* 38, 44-51.
- Centiella M, McCarthy TL, Canalis E. (1991) Growth factors and cytokines. In Hall BK (ed): Bone, vol 4, Bone Metabolism and Mineralization, Boca Raton, *CRC Press*, pp 47-72.
- Chan BY, Ashton A, Smith MM & Little CB 2013 Sclerostin regulation of Wisp1 and Mmps in chondrocytes is dependent on the Lrp5/6 binding domain but not secretion from the cell. *Osteoarthritis and Cartilage* 21 S55–S55. (doi:10.1016/j.joca.2013.02.127)
- Chan, S.J., San Segundo, B., McCormick, M.B. and Steiner, D.F. (1986) Nucleotide and predicted amino acid sequences og cloned human and mouse oreprocathepsin B cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, pp. 7721-7725.
- Chen Q., Gibney E.P., Leach R.M., and Linsenmayer T. F. (1993) Chicken tibial dyschondroplasia: a limb mutant with two growth plates and possible defects of collagen crosslinking. *Dev. Dyn.* 196, 54-61.
- Clements, K.M., Sharif, M., Hollander, A.P., and Adams, M.A. (2000) in *Molecular Cell Biology of the Synovial Joint*, British Society for Matrix Biology Year 2000 Millenium Meeting, Royal Veterinary College, London, p.15.
- Codorean, E., Buzilă, L. and Gabrielescu, E. (1981) Immunocytochemical investigation of cathepsin B in the rheumatoid synovial membrana and fluid. *Rev. Roum. Biochim.* 18, pp. 241-247.
- Cole DE, and Hanley DA: Osteocalcin. (1991) In may BK (ed); Bone, vol 3, Bone Matriz and Bone Specific Products, Boca Raton, *CRC Press*, pp 239-294.
- Coleman CM, Curtin C, Barry FP, O’Flatharta C & Murphy JM 2010 Mesenchymal stem cells and osteoarthritis: remedy or accomplice? *Human Gene Therapy* 21 1239–1250. (doi:10.1089/hum.2010.138)

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

Davey MG, Paton IR, Yin Y, Schmidt M, Bangs FK, Morrice DR, Smith TG, Buxton P, Stamatakis D, Tanaka M et al. 2006 The chicken talpid3 gene encodes a novel protein essential for Hedgehog signaling. *Genes and Development* 20 1365–1377. (doi:10.1101/gad.369106).

Davies ME, Bowe EA, Henson FM, Jeffcott LB.(2003). Induction of an osteoarthritic phenotype and an attempted repair response in impact-loaded equine articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11:S94.

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

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

Dingle, J.T., Barrett, A.J., and Weston, P.D. (1971) Cathepsin D. Characteristics of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown. *Biochem J.* 123, 1-13.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fernandes AM, Herlofsen SR, Karlsen TA, Kuchler AM, Floisand Y & Brinchmann JE

2013 Similar properties of chondrocytes from osteo- arthritis joints and mesenchymal stem cells from healthy donors for tissue engineering of articular cartilage. PLoS ONE 8 e62994. (doi:10.1371/journal.pone.0062994).

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

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

Fosang AJ & Beier F 2011 Emerging frontiers in cartilage and chondrocyte biology. Best Practice & Research. Clinical Rheumatology 25 751–766. (doi:10.1016/j.berh.2011.11.010)

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

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

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

Fröhlich Eleonore., Schlagenhauß Bettina., Möhrle Matthias., Weber Ekkehard., Klessen Christian., Rassner Gernot. (2001) Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Volume 91*, Issue 5, pages 972–982, 1 March 2001.

Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, Dreier R, Echtermeyer F, Nitschke Y, Rutsch F, Schafer FK, Niggemeyer O, Steinhagen J et al. 2009 Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 60 2694–2703. (doi:10.1002/art.24774)

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

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

Galotto, M., Campanile, G., Robino, G., Descalzi Cancedda, F., Bianco, P. and Cancedda, R.(1994) Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and 142 participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J. Bone Miner. Res.* 9, pp. 1239- 1249.

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

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

- Garnero P, Ayral X, Rousseau JC, Christgau S, Sandell LJ, Dougados M & Delmas PD 2002 Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46 2613–2624. (doi:10.1002/art.10576)
- Gentili, C., Bianco, P., Neri, M., Malpeli, M., Campanile, G., Castagnola, P., Cancedda, R. and Descalzi Cancedda, F. (1993) Cell proliferation, extracellular matrix mineralization, and ovotransferrin transient expression during in Vitro differentiation of chick hypertrophic chondrocytes into osteoblast-like cells. *J. Cell. Biol.* 122, pp. 703-712.
- Ghosh, P., Andrews, J.L., Osborne, R.A., Lesjak, M.S. (1986) Variation with aging and degeneration of the serine and cysteine protease inhibitors of human articular cartilage. *Agents Actions.* 18, pp. 69-81.
- Gieselmann. V., Pohlmann. R., Hasilik. A and von Figura. K. (1983). Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J.Cell. Biol.* 97, pp. 1-5.
- Glade, M.J. y Belling, T.H. (1986) A dietary etiology for osteochondrotic cartilage. *J. Equine Vet. Sci.* 6, 151-155.
- Goto, T., Tsukuba. T., Ayasaka, N., Yamamoto, K. y Tanaka, T. (1992) Immunocytochemical localization of cathepsin D in the rat Osteoclast. *Histochem.* 97, pp. 13-18
- Gray M.L., Pizzaneli A.M., Grodzinsky A.J., and Lee R.C. (1988) Mechanical and Physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J.Orthop.Res.* 6, 777-792.
- Greenwald, R.A. and Moak, S.A. (1986) Degradation of hyaluronic acid by polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation.* 10, pp. 15-30.
- Guenther H.L., Guenther H.E., Froesch E.R., and Fleisch H. (1982) Effect of insulin-like growth factor on collagen and glycosaminoglycan synthesis by rabbit articular chondrocytes in culture. *Experientia* 38, 979-981.
- Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM. (1999) The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarth. Cart.* 7, 59-70.
- Hall BK. (1990) Bone, vol 1, The Osteoblast and the Osteocyte. West Caldwell, NJ, *The Telford Press*.
- Hanewinkel, H., Glössl, J. y Kresse, H. (1987). Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262, pp. 12351-12355.
- Hardingham, T.E. (1979) The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochem. J.* 177, pp. 237-247.
- Hardingham, T. and Bayliss, M. (1990) Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Sem. Arthr. Rheum. Suppl.* 20, 12-33.
- Hardingham, T.E. and Muir, H. (1972) The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Byochem. Biophys. Acta.* 279, 401-405.
- Hasilik, A. and von Figura, K. (1984) In: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Vol. 7, Eds:

Dinge , J.T., Dean, R.T., and Sly, W. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam. Pp. 3-16.

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

Helminen HJ, Kiraly K, Peltari A, Tammi MI, Vandenberg P, Pereira R, Dhulipala R, Khillan JS, Ala-Kokko L, Hume EL et al. 1993 An inbred line of transgenic mice expressing an internally deleted gene for type II procollagen (COL2A1). Young mice have a variable phenotype of a chondrodysplasia and older mice have osteoarthritic changes in joints. *Journal of Clinical Investigation* 92 582–595. (doi:10.1172/JCI116625)

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

Henson FM., Bowe EA. and Davies ME. (2005) Promotion of the intrinsic damage–repair response in articular cartilage by fibroblastic growth factor –2. *Osteoarthritis Cartilage.* 13 537-544.

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

Henrotin Y, Chevalier X, Deberg M, Balblanc JC, Richette P, Mulleman D, Maillet B, Rannou F, Piroth C, Mathieu P et al. 2013 Early decrease of serum biomarkers of type II collagen degradation (Coll2-1) and joint inflammation (Coll2-1 NO2) by hyaluronic acid intra-articular injections in patients with knee osteoarthritis: a research study part of the Biovisco study. *Journal of Orthopaedic Research* 31 901–907. (doi:10.1002/jor.22297)

Hernández-Vidal, G. Davies, M.E and Jeffcott, L.B. (1996) Localization of cathepsin B and D in equine articular cartilage. *Pferdeheilkunde* 12, 371-373.

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

Hernández-Vidal, G., Jeffcot, L.B., and Davies, M.E. (1998) Immunolocalization of cathepsin B in equine dyschondroplastic articular cartilage. *Vet. J.* 156, 193-201.

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

Hernández-Vidal Gustavo., Mora Valdez Francisco, Kawas Garza Jorge R., Ramírez Romero Rafael., Salinas Melendez José A., Rodríguez Tovar Luis E., Aválos Ramírez Ramiro., Riojas Valdes Victor., Davies Elisabeth and Jeffcott Leo B. (2008). Localization of cathepsin B enzymatic activity in equine articular cartilage, skin fibroblasts and phenotypically modulated and dyschondroplastic chondrocytes. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7: 493-501.

Hernández-Vidal Gustavo., Kawas Garza Jorge R, Ramírez Romero Rafael, Rodríguez Tovar Luis E, Nevarez Garza Alicia M, Mora Valdez Francisco, Hernández Escareño Jesus J, Davies Elisabeth and Jeffcott Leo B (2009). Effects of copper and zinc on cathepsin B

activity in equine articular cartilage. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **8**: 935-945.

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

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

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

Hoyland JA, Thomas JT, Donn R, Marriott A, Ayad S, Boot-Handford RP, Grant ME & Freemont AJ 1991 Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage. *Bone and Mineral* **15** 151–163. (doi:10.1016/0169-6009(91)90005-K)

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

Huser Camille A.M., Davies M. Elisabeth (2006) Validation of an In Vitro Single-Impact Load Model of the Initiation of Osteoarthritis-like Changes in Articular Cartilage. *Journal of Orthopaedic Research.*, **24**,(4) 725-732.

Hulkower K I, Butler C C, Linebaugh B E, Klaus J L, Keppler D, Giranda V L, Sloane B F (2000) Fluorescent microplate assay for cancer cell-associated cathepsin B. *Eur J Biochem* **267** 4165-4170.

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

Jalba BA, Jalba CS, Vladoi AD, Gherghina F, Stefan E & Cruce M 2011 Alterations in expression of cartilage-specific genes for aggrecan and collagen type II in osteoarthritis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* **52** 587–591.

Jeffrey, J.E., Gregory, D.W., and Aspden, R.M. (1995) Matrix damage and chondrocyte viability following a single impact load on articular cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 87-96.

Jeffrey, J.E., Thompson, L.A., and Aspden, R.M. (1997) Matrix loss and synthesis following a single impact load on articular cartilage *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1334**, 223-232.

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

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

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

Kempson, G.E. (1980) The mechanical properties of articular cartilage. In : *The joints and*

- synovial fluid, volume II. Ed: L. Sokoloff. *Academic Press. New York.* pp. 177-183.
- Keppeler, D., Waridel, P., Abrahamson, M., Bachmann, D., Berdoz, J. and Sordat, B. (1994). Latency of cathepsin B secreted by human colon carcinoma cells is not linked to secretion of cystatin C and is relieved by neutrophil elastase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1226, pp. 117-125.
- Kerr, H.R. (1985) Warbuston B: Surface rheological properties of hyaluronic acid solutions. *Biorheology*, 22, pp. 133-144.
- Killackey J.J., Roughley, P.J., Mort, J.S. (1983) Proteinase inhibitors of human articular cartilage. *Coll. Rel. Res.* 3, pp. 419-430.
- Kincaid S. A., Allhands R. V., and Pijanowski G. J. (1985) Chondrolysis associated with cartilage canals of the epiphyseal cartilage of the distal humerus of growing pigs. *Am. J. Vet. Res.* 46, 726-732.
- Kiviranta I., Tammi M., Jurvelin J., Saamanen A.M., and Helminen H.J. (1988) Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *J. Orthop. Res.* 6, 188-195.
- Knox, P. Levick, J.R., and McDonald, J.N. (1988) Synovial fluid. Its mass, macromolecular content, and pressure in major limbs of the rabbit. *Q.J. Exp. Physiol.* 73, 33-46.
- Kominami, E. and Katunuma, N. (1989) Biosynthesis, processing and localization of lysosomal cysteine proteinases. In: *Intracellular Proteolysis*. Eds: Katunuma, N. and Kominami, E. Japan Scientific Societies Press Tokio. pp. 52-60.
- Kominami, E., y Tsukahara, T., Hara, K. y Katunuma, N. (1988) Biosíntesis and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett.* 231, pp. 225-228.
- Kornfeld, S. (1990). Lysosomal enzyme targeting. *Biochem. Soc. Trans.* 18, pp. 367-374.
- Kornfeld, S. (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 61, pp. 307-330.
- Korver T.H., van-de S.R., Kiljan E., van K.G., and van-der K.J. (1992) Effects of loading on the sintesis of proteoglycans in different layers of anatomically intact articular cartilage in vitro. *J. Rheumatol.* 19, 905-912.
- Kronenberg HM 2003 Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423 332–336. (doi:10.1038/nature01657).
- Kuettner, K.E., Aydelotte, M.B., and Thonar, E.J.A. (1991) Articular cartilage matrix and structure : a minireview. *J. Rheumatol. Suppl.* 27, 46-48.
- Kuettner, K. E. and Pauli, B. U. (1983) in *Cartilage* (hall, B. K., Ed.), Academic Press, New York.
- Lai, W.M., How, V.C. (1989) Triphasic theory for articular cartilage swelling. *Proc. Biochem. Symp. ASME, NY, USA.* Pp. 33-36.
- Lakowski, M. Jr. and kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49. 593-626.

- Lee, D.A., Noguchi, T., Knight, M.M., O'Donnell, L. Bentley, G., and Bader, D.L. (1998) Response of chondrocyte subpopulations cultured within unloaded and loaded agarose. *J. Ortho. Res.* **16**, 726-733.
- Lenarcic, B., Gabrijelcic, D., Rozman, B., Drobnic-Kosork, M. and Turk, V. (1988) Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint disease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **369**, pp. 257-261.
- Lenarcic, B., Krasovec, M., Ritonja, A., Olafsson, I. and Turk, V. (1991). Inactivation of human cystatin C and kininogen by human cathepsin D. *FEBS Lett.* **280**, pp. 211-215.
- Leto, G., Gebbia, N., Rausa, L. y Tumminello, F.M. (1992). Cathepsin D in the malignant progresión of neoplastic diseases (review). *Anticancer Research.* **12**, pp. 235-240.
- Levick J. R. (1984) An analysis of the effect of synovial capillary distribution upon trans-synovial concentration profiles and exchange. *Q. J. Exp. Physiol.* **69**, pp. 289-300.
- Levick J. R. (1987) Flow through interstitium and other fibrous matrices. *Q. J. Exp. Physiol.* **72**, pp. 409-437.
- Linebaugh BE, Sameni M, Day NA, Sloane BF, Keppler D. (1999) Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *Eur J Biochem* **264**, 100-109.
- Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Mort JS, Roughley PJ, Dent C & Caterson B 1999 Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochemical Journal* **344** 61–68. (doi:10.1042/0264-6021:3440061)
- Lohmander, L.S., Lark, M.W., Dahlberg, L., Walakovits, L.A., and Ross, H. (1992) Cartilage matrix metabolism in osteoarthritis: Markers in synovial fluid, serum, and urine. *Clin. Biochem.* **25**, pp. 167-174
- Lorenzo, J.A., Pilbeam, C.C and kalinowski, J.F. (1992) Production of both 92-and 72-kDa gelatinasas by bone cells. *Matrix.* **12**, pp. 282-290.
- Lucy, J. A., Dingle, J.T. and Fell, H.B. (1961) Studies on the mode of action of excess vitamin A. 2. A possible role of intracellular proteases in the degradation of cartilage matrix. *Biochem. J.* **79**, pp. 500-508.
- Luyten FP 2004 Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology* **16** 599–603. (doi:10.1097/01.bor. 0000130284.64686.63)
- Mach, L., Schwihla, H., Stüwe, K., Rowan, A.D., J.S. y Glössl, J. (1993). Activation of procathepsin B in human hepatoma cells: the conversion into the mature enzyme relies on the action of cathepsin B itself. *Biochem. J.* **293**, pp. 437-442.
- Mach, L., Stüwe, K., Hagen, A., Ballahum, C. y Glössl, J. (1992) Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem. J.* **282**, pp. 577- 582.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS & Mirams M 2008 Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *International*

Journal of Biochemistry & Cell Biology 40 46–62. (doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009)

Mackie EJ, Tatarczuch L & Mirams M 2011 The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS & Mirams M 2008 Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 46–62. (doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

McIlwraith, C.W. (1982) Current concepts in equine degenerative joint disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 239-250.

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

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

McKerrow James H., Bhargava Vivek, Hansell Elizabeth, Huling Sandra, Kuwahara Thomas, Matley Mary, Coussens Lisa and Warren Robert (2000) A Functional Proteomics Screen of Proteases In Colorectal Carcinoma. *Molecular medicine* 6: 450-460.

- Miclea RL, Siebelt M, Finos L, Goeman JJ, Lowik CWGM, Oostdijk W, Weinans H, Wit JM, Robanus-Maandag EC & Karperien M 2011 Inhibition of Gsk3b in cartilage induces osteoarthritic features through activation of the canonical Wnt signaling pathway. *Osteoarthritis and Cartilage* 19 1363–1372. (doi:10.1016/j.joca.2011.07.014)
- Millward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Lee, H.S., Nishida, K., Caldwell, H., Nuki, G., and Salter, D.M. (1999) Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J. Cell. Biol.* **145**, 183-189.
- Mitrovic, D., Quintero, M., Stankovic, A. and Ryckewaert, A. (1983) Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab. Invest.* 49, pp. 309-316.
- Morales T.I. and Roberts A.B. (1988) Transforming growth factor beta regulates the metabolism of proteoglycans in bovine cartilage organ cultures. *J. Biol. Chem.* 263, 12828-12831.
- Mort, J.S., Recklies, A.D., and Poole, A.R. (1984) Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arthritis Rheum* 27, 509-515.
- Mort, J.S., Recklies, A.D. (1986) Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin-B precursors. *Biochem.J.* 233, pp.57-63.
- Mow, V.C., Holmes, M.H., and Lai, W.M. (1984) Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage. *A review. J. Biomechanics* 17, 377-384.
- Mow, V.C., Lai, W.M., Hou, J.S. (1990) A triphasic theory for the swelling properties of hydrated charged soft biological tissues. *Appl. Mech. Rev.* 43, pp.134-141.
- Mow, V.C., Ratcliffe, A., Poole, A.R. (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials.* 13, pp.67-97.
- Mow, V.C., Wang, C.C., and Hung, C.T. (1999) The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage *Osteoarth. Cart.* 7, 41-58.
- Muir, I.H.M. (1972) Biochemistry. In: *Adult articular cartilage*. Ed: M.A.R. Freeman. Grune&Stratton. New York. pp.100-130.
- Mundy GR. (1993) Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling, *J Bone Min Res.* 8 (suppl 2): S505-S510.
- Murphy G., Cockett M. I., Stephens P. E., Smith B. J., and Docherty A. J. (1987) Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 248, 265-268.
- Murphy, G., Hembry, R.M., Hughes, C.E., Fosang, A.J., and Hardingham, T.E. (1990) Role and regulation of metalloproteinases in connective tissue turnover. *Bioch. Soc. Trans.* 18, 812-815.
- Murray, R.C., Zhu, C.F., Goodship, A. E., Lakhani, K.H., Agrawal, C.M., and Athanasiou, K.A. (1999) Exercise affects the mechanical properties and histological appearance of equine articular cartilage. *J. Ortho. Res.* 17, 725-731.

- Mwale F, Yao G, Ouellet JA, Petit A & Antoniou J 2010 Effect of parathyroid hormone on type X and type II collagen expression in mesenchymal stem cells from osteoarthritic patients. *Tissue Engineering. Part A* 16 3449–3455. (doi:10.1089/ten.tea.2010.0091)
- Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T et al. 2001 Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *Journal of Clinical Investigation* 107 35–44. (doi:10.1172/JCI10564)
- Nishimura, Y., Amano, J., Sato, H., Tsuji, H. y Kato, K. (1988a). Biosíntesis of lysosomal cathepsins B and H in cultured rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 262, pp. 159-170.
- Nishimura, Y., Kawabata, T. y Kato, K. (1988 b). Identification of latent procathepsin B and L in microsomal lumen: characterisation of enzymatic activation and proteolytic processing *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* 261, pp. 64-71.
- Nishimura, Y., Kawabata, T., Yano, S. y Kato, K. (1990) Intracellular processing and activation of lysosomal cathepsins. *Acta. Histochem. Cytochem.* 23, pp. 53-64.
- Nguyen, Q., Mort, J.S., and Roughley, P.J. (1990) Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsinB. *Biochem. J.* 266, 569-573.
- Node S., Newbold P.J. (1983) factors determining the level of changes in intra-articular pressure in the knee of the dog. *J. Physiol*, 338, pp. 21-36.
- Oldberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K. and Heinegard, D. (1989) A collagen-binding 59-kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* 8,pp. 2601-2604
- Oloyede, A. and Broom, N. (1996) The biomechanics of cartilage load carriage. *Conn. Tissue Res.* 34, 119-143.
- Pagano, M., Capony, F. and Rochefort, H. (1989). La pro-cathepsine D peut activer *in vitro* la pro- cathepsine B secrete pas les cancers ovariens. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 309, pp. 7-12.
- Palmer, J.L. and Bertone, A.L. (1994) Review article: joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet. J.* 26, pp. 263-277.
- Palmer, J.L. and Bertone, A.L. (1996) Joint biomechanics in the pathogenesis of traumatic arthritis. In: *Joint disease in the horse*. Eds: C.W McIlwraith and G.W. trotter. Saunders. Philadelphia, pp. 104-119.
- Palmer J.L., Bertone A.L., Malemud C.J., Carter B.G., Papay R.S., and Mansour J. (1995) Site- specific proteoglycan characteristics of third carpal articular cartilage in exercised and nonexercised horses. *Am.J.Vet.Res.* 56, 1570-1576.
- Palmoski M.J., Colyer R.A., and Brandt K.D. (1980) Joint motion in the absence of normal loading does not maintain normal articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 23, 325-334.
- Perin, J.P., Bonnet, F., Thurieau, C., and Jolles, P. (1987) Link protein interactions with hyaluronate and proteoglycans. Characterization of two distinct domains in bovine cartilage link proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 13269-13272.

Pitsillides AA & Beier F 2011 Cartilage biology in osteoarthritis – lessons from developmental biology. *Nature Reviews. Rheumatology* 7 654–663. (doi:10.1038/nrrheum.2011.129)

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

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

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

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

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

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

Poole, A.R., A.R., Hembry, R.M., and Dingle, J.T. (1973) Extracellular localization of cathepsin D in ossifying cartilage. *Calc. Tiss. Res.* 12, 313-321.

Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Kakonen S & Swoboda B 2000 Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcified Tissue International* 67 230–240. (doi:10.1007/s002230001108)

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

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

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

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

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

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

Roach HI, Yamada N, Cheung KS, Tilley S, Clarke NM, Oreffo RO, Kokubun S & Bronner F 2005 Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis and Rheumatism* 52 3110–3124. (doi:10.1002/art.21300)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Simunek, Z. and Muir, H. (1972) Changes in the protein-polysaccharides of pig articular

cartilage during prenatal life, development and old age. *Bioch. J.* 126, 515-523.

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

Staines KA, Poulet B, Farquharson C & Pitsillides AA 2013 The sclerostin and Mepe axis in the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 21 S55–S55. (doi:10.1016/j.joca.2013.02.128)

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

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P & Werb Z 2004 Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 131 5883–5895. (doi:10.1242/dev.01461)

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

Storm EE & Kingsley DM 1996 Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122 3969–3979.

Studer D, Millan C, Ozturk E, Maniura-Weber K & Zenobi-Wong M 2012 Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *European Cells & Materials* 24 118–135; discussion 135.

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

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

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

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

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

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

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

Thonar, E.J: M: A., Manicourt, D.M., Williams, J., Lenz, M.E., Sweet, M.B., Schnitzer,

- T.J., Otten, L., Glant, T., and Kuettner, K.E. (1991) Circulating keratan sulfate: a marker of cartilage proteoglycan catabolism in osteoarthritis. *J. Rheum. Suppl.* 27, 24-26.
- Tickle C & Münsterberg A 2001 Vertebrate limb development – the early stages in chick and mouse. *Current Opinion in Genetics & Development* 11 476–481. (doi:10.1016/S0959-437X(00)00220-3).
- Todhunter, R.J. (1996) Anatomy and physiology of synovial joints. In: *Joint disease in the horse*. Eds. C.W. McIlwraith and G.W. Trotter. Saunders. Philadelphia, pp.1-28.
- Trabandt, A., Gay, R.E., Fassbender, H.G. and Gay, S. (1991) Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arth. Rheum.* 34, pp. 1444-1451.
- Tracy RP, and Mann KG. (1991) Osteonectin. In Hall BK (ed) : Bone, vol 3, Bone Matrix and Bone Specific Products, Boca Raton, CRC Press, pp 295-320.
- Treadwell, B.V., Pavia, M., Towle, C.A., Cooley, V.J., and Mankin, H.J. (1991) Cartilage Synthesizes the serine protease inhibitor PAI-1 : support for the involvement of serine proteases in cartilage remodeling. *J. Orthop. Res.* 9, 309-316.
- Tyler J. A. (1989) Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem. J.* 260, 543-548.
- Tyler, J.A. (1991) Cartilage degradation. In: Hall, B and Newman, S. (eds) *Cartilage: Molecular Aspects*. 213-256, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Vachon, A.M., Keeley, F. N., McIlwraith, W. and Chapman, P. (1990) Biochemical analysis of normal articular cartilage in horses. *Am. J. Vet. Res.* 51, pp. 1905-1911.
- Van-de L.A and van-den B.W. (1990) Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann, Rheum.Dis.* 49, 238-245
- Van den Bosch M, Blom A, van Erp A, van de Loo F, Davidson EB, van der Kraan P, van Lent P & van den Berg W 2013 Synovial Wnt and Wisp1 expression induces expression of cartilage-degrading metallo- proteinases in the synovium. *Osteoarthritis and Cartilage* 21 S284–S284. (doi:10.1016/j.joca.2013.02.594)
- Van der Rest, M. and Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB. J.* 5, pp. 2821-2823.
- Veis A. (1993) Mineral-matrix interactions in bone and dentin. *J Bone Min Res.* 8(2):5493-5497.
- Verschure P.J. and Van N.C. (1990) The effects of interleukin-1 on articular cartilage destruction as observed in arthritic diseases, and its therapeutic control. *Clin. Exp. Rheumatol.* 8, 303-313.
- Villavicencio-Lorini P, Kuss P, Friedrich J, Haupt J, Farooq M, Turkmen S, Duboule D, Hecht J & Mundlos S 2010 Homeobox genes d11–d13 and a13 control mouse autopod cortical bone and joint formation. *Journal of Clinical Investigation* 120 1994–2004. (doi:10.1172/JCI41554).
- Vittorio, N., Crissman, J.D., Hopson, C.N. and Herman, J.H. (1986) Histologic assessment

- of cathepsin D in osteoarthritic cartilage. *Clin. Exp. Rheumatol.* 4, pp. 221-230.
- Walker, P.S., Dowson, D., Longfield, M.D., et al. (1968) "Boosted lubrication" in synovial joints by fluid entrapment and enrichment. *Ann. Rheum. Dis.* 27, pp.512-520.
- Wang Q, Green RP, Zhao G & Ornitz DM 2001 Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development* 128 3867–3876.
- Wang M, Sampson ER, Jin H, Li J, Ke QH, Im HJ & Chen D 2013 MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 15 R5. (doi:10.1186/ar4133)
- Weiss, C., Rosenberg, L. and Helfet, A.J. (1968) An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg.* 50A, pp. 663-674.
- Weightman, B. and Kempson, G.E. (1979) Load carriage. In: *Adult Articular Cartilage*. Ed: Freeman, M.A.R. England, Pitman Medical Publishing Co. Ltd. Tunbridge Wells. pp. 291-331.
- Werb, Z. (1989) Proteinases and matrix degradation. In Kelley WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Sledge CB. (eds). *Textbook of Rheumatology, ed 3. Philadelphia, WB Saunders.* pp. 300-321
- Wiederanders, B., Brömme, D., Kirschke, H., von Figura, K., Schmidt, B., y Peters, C. (1992). Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. *J. Biol. Chem.* 267, pp. 13708-13713.
- Witsch P.P., Miehleke R., and Kresse H. (1992) Presence of small proteoglycan fragments in normal and arthritic human cartilage. *Arthritis Rheum.* 35, pp. 1042-1052.
- Woessner, J.F. Jr and Gunja-Smith, Z. (1991) Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J. Rheumatol. Suppl.* 27, 99-101.
- Woessner, J.F. Jr and Howell, D.S. (1983) Hydrolytic enzymes in cartilage. In : Studies in joint disease. Eds. : A. Maroudas and E.J. Holborow. Pitman. London. pp 106-152.
- Woodard J. C., Becker H. N., and Poulos-PW J. (1987) Articular cartilage blood vessels in swine osteochondrosis. *Vet. Pathol.* 24, 118-123.
- Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D'Amore PA & Olsen BR 2002 Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 129 1893–1904.
- Zhu M, Chen M, Zuscik M, Wu Q, Wang YJ, Rosier RN, O'Keefe RJ & Chen D 2008 Inhibition of b-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction. *Arthritis and Rheumatism* 58 2053–2064. (doi:10.1002/art.23614)
- Zhu M, Tang DZ, Wu QQ, Hao SY, Chen M, Xie C, Rosier RN, O'Keefe RJ, Zuscik M & Chen D 2009 Activation of b-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult b-catenin conditional activation mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 24 12–21. (doi:10.1359/jbmr.080901).