



UBA
Universidad de Buenos Aires



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

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

**Laboratorio de Metabolismo Óseo y Mineral. Cátedra de Fisiología
Animal**

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA

Autor: Gustavo Mario Perrone, MV, M Sc

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

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

2016

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento:

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

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

INDICE TEMATICO

1. RESUMEN.....	6
2. ABSTRACT.....	9
3. INTRODUCCION.....	2
4. HIPOTESIS GENERAL.....	23
5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS.....	23
5.1. General.....	23
5.2. Específico.....	23
6. MATERIALES Y METODOS.....	23
6.1. Animales.....	23
6.2. Análisis bioquímicos.....	25
6.3. Análisis estadístico.....	25
7. RESULTADOS.....	26
8. DISCUSION.....	31
9. CONCLUSIONES.....	40
10. BIBLIOGRAFIA.....	41

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

1. Fig. 1. Ruta de la degradación del cartílago articular secundaria al trauma articular.....	14
2. Fig. 2. Fisiopatología del trauma articular.....	15
3. Fig. 3. Biomarcadores del metabolismo articular osteocondral utilizados para el diagnóstico de enfermedad articular en equinos	22
4. Tabla 1. Valores de referencia (valor medio $\pm$ SD) de citoquinas (pg/ml) y MMP-2 y MMP-9 (% de un control interno) según edad y estado clínico.....	29
5. Fig. 4. Actividad media de MMP 9 y valores medios de IL-4.....	30
6. Tabla 2. Proteínas totales, albúminas y urea de animales sanos y enfermos.....	31

ABREVIATURAS

AAEP: American Association of Equine Practitioner

BMs: Biomarcadores

FO: Fragmento osteocondral

ICRS: International Cartilage Repair Society

IGF1: Factores de crecimiento similares a insulina

IKDC: International Knee Documentation Committee

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-4: Interleuquina 4

IL-6: Interleuquina 6

MEC: Matriz extracelular

MMPs: Metaloproteinasas

OA: osteoartritis

OARSI: Osteoarthritis Research Society International

OC: Osteocondritis

OCD: Osteocondrosis disecante

PCR: Proteína C reactiva

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TIMs: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas

VAS: Escala Análoga Visual (en inglés)

WOMAC: Indice Western Ontario y Mc Master Universities

1. RESUMEN

La OA es una enfermedad progresiva, degenerativa, caracterizada por una pérdida del cartílago articular, eburnificación del hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial y aumento del líquido sinovial. Los procesos inflamatorios resultantes producen citoquinas proinflamatorias que activan metaloproteinasas (MMPs) que retroalimentan el proceso por destrucción de la matriz extracelular cartilaginosa (MEC). El diagnóstico de la OA se basa en la semiología clínica y en métodos complementarios. Por lo tanto, se desarrolló un índice clínico para evaluar la articulación tibio astragalina. Además, se comenzó a estudiar la aplicación de biomarcadores (BMs) y de sus efectores en la cascada inflamatoria en el diagnóstico precoz de la OA. Los BMs estudiados fueron el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las interleuquinas 1 β (IL-1 β), 4 (IL-4) y 6 (IL-6) y MMPs 2 y 9, presentes en el líquido sinovial pero en niveles diferentes en los animales sanos y en aquellos que presentan signos clínicos de OA. Para establecer valores de índice clínico poblacional, se trabajó con 123 equinos de salto y SPC tomados al azar de edades comprendidas entre 1 y 28 años. Se formaron tres grupos etarios de animales, para obtener valores de referencia de citoquinas y MMPs para caracterizar el perfil de estos biomarcadores en el líquido sinovial de equinos normales de distintas edades y en equinos con signos clínicos de OA. Los grupos fueron: i) potrillos sanos entre 1 y 2 años (n=21), ii) adultos entre 3 y 14 años (n=84) sanos y con grados variables de enfermedad articular y iii) Adultos mayores a 15 años normales pero con problemas articulares por envejecimiento (n=18). A todos se les efectuó un examen clínico general y particular enfocado en las articulaciones tibio astragalinas de ambos miembros pelvianos, extrayéndose de las mismas una muestra de líquido sinovial. A fin de cuantificar el examen clínico de la articulación, se desarrolló un índice clínico para evaluar la articulación tibio astragalina que incluye el índice de la AAEP modificado, las maniobras de palpación presión y flexión forzada, la observación del perfil articular y del grado de hirsutismo y las características físicas del líquido sinovial. El índice clínico propuesto corresponde a un mínimo de 2,3 puntos (sin manifestación clínica) y un máximo de 20,1 puntos, considerado de máxima severidad. Los resultados de la medición de las citoquinas y MMPs se dividieron en tres categorías etarias, potrillos, adultos y mayores de 15 años, debido a que los resultados de los animales jóvenes y mayores presentaban un comportamiento diferencial con el grupo adultos y los adultos, entre ellos. En el grupo adultos, en la mayoría de las variables estudiadas se observó una distribución definida en grupos bajo, medio y alto. En el caso del TNF- α y la IL-1 β la distribución en tres grupos no fue tan marcada, no encontrándose diferencia

significativa entre los valores medios del grupo bajo y medio. Los potrillos sanos presentaban un valor más elevado de IL-1 β que el resto de los otros grupos. El valor medio del grupo de potrillos fue superado, aunque no significativamente, por el grupo de adultos con valores elevados. Utilizando el índice clínico y en asociación con los resultados de los niveles de citoquinas y MMPs en el líquido sinovial, se clasificó a la población en cinco grupos:

Grupo 1: Potrillos uno a dos años, sin alteraciones clínicas articulares, ni variaciones de los biomarcadores por OCD.

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

Grupo 3: Adultos con índice clínico 4-6 con leve sintomatología clínica de OA.

3a forma no activa con disminución de IL-4

3b forma activa con aumento de varios BMs.

Grupo 4: Adultos con índice clínico 6-10 con sintomatología de OA con/sin deformaciones articulares.

4a forma no activa con leve aumento general de BMs

4b forma activa con aumento de MMP 2, expresión de MMP9 y elevada la IL-6 y otros BMs.

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

La modificación o elevación de las citoquinas y MMPs es un signo precoz que antecede a la alteración del índice clínico. Por otra parte en las diferentes categorías clínicas se observaron diferentes combinaciones siendo el descenso de la IL-4 un signo incipiente de alteración en el entorno articular. En los animales del grupo 4b, se observó un perfil característico, caracterizado por IL-4 e IL-6 elevadas acompañadas de MMP 2 elevada. En el grupo basal y grupo 3b con citoquinas elevadas se presentó la asociación de IL-1 β e IL-6 elevada pero con IL-4 normal o disminuida y MMP 2 normal. En los índices superiores más de 13 fue muy habitual encontrar la expresión de la MMP 9, ausente en el grupo basal y valores de MMP 2 elevados. En los grupos clínicos de mayor grado, la IL-4 vuelve a aumentar al nivel basal e incluso en algunos casos aumenta al doble del basal, pero en forma asociada con niveles

elevados de IL-6. Nuestros resultados preliminares mostraron la ausencia de BMs en animales sanos o en períodos de remisión y su presencia en animales con OA activa. Sin embargo, en animales con ausencia de síntomas clínicos es dable encontrar BMs elevados como indicador precoz de OA. El TNF- α se encontró en poca cantidad en caballos clínicamente sanos y en fase no activa de la OA. Por lo tanto, su valor radica en encontrarlo presente en niveles elevados para confirmar el proceso inflamatorio agudo. Pero a la inversa, su ausencia no tiene valor diagnóstico para determinar la no existencia de la enfermedad. La IL-1 β se presentó elevada en los animales que se encontraban en fase activa de la OA como puede observarse en la sub clasificación “b” de las distintas categorías del índice clínico. En equinos clínicamente sanos, pero con elevación de IL-6, dado que es una citoquina proinflamatoria se podría considerar que estos animales estaban en período de remisión o que ya existía una destrucción del cartílago articular. Hemos observado valores bajos de MMP 2 y ausencia de MMP 9 en animales clínicamente sanos. En animales con OA en período activo, la MMP 2 aumentó significativamente ($p < 0.001$) sobre los valores de referencia en equinos sanos. La MMP 9 aumentó levemente en equinos en fase de remisión no activa y en valores superiores en fase crónica de la enfermedad. En conclusión, los equinos que presentaron sintomatología clínica compatible con OA, tuvieron alteraciones en los valores de citoquinas, MMPs, mientras aquellos sin síntomas, presentaron valores compatibles con articulaciones normales. Animales sin síntomas clínicos evidentes o subclínicos presentaron alteraciones en el perfil de citoquinas y MMPs como un signo precoz de alteración del medio intraarticular o como indicador de remisión clínica. El índice clínico presentó alta correlación con las modificaciones bioquímicas agudas, crónicas o recidivantes en equinos con OA o en equinos sin presencia de la enfermedad. Por lo tanto, este índice puede ser utilizado en el diagnóstico clínico de OA ya que los BMs sinoviales validan su evolución tanto positiva como negativa. De la misma manera, los BMs estudiados en esta experiencia pueden ser utilizados como métodos complementarios precoces en la detección, seguimiento y evolución terapéutica de OA.

Palabras Clave: osteoartritis, equino, tarso, diagnóstico, índice clínico, biomarcadores sinoviales

2. ABSTRACT

OA can be defined as a progressive, degenerative disease that is characterized by a loss of cartilage joint, subchondral bone eburnification and inflammation of the synovial membrane and synovial fluid increased. The resulting inflammatory processes produce proinflammatory cytokines that activate matrix metalloproteinases (MMPs) which in turn feedback the process by destruction of cartilage extracellular matrix (CEM). The diagnosis of OA is based on the clinical semiology and complementary methods. Therefore, we developed a clinical score for the evaluation of the tibio astragalin joint. Following the discovery of new biomarkers (BMs) and its effectors in the inflammatory cascade, we began to study its application in early diagnosis of OA. In articular diseases, tumour necrosis factor α (TNF- α), interleukins 1 β (IL-1 β), 4 (IL-4), 6 (IL-6), MMPs 2 and 9 present in the synovial fluid, but at different levels in healthy animals and those who have clinical signs of OA, are considered of importance. To establish population clinical score values, we randomly evaluated 123 show jumping and Thoroughbred horses, aged 1 to 28 years. From this initial group, three groups of animals were differentiated, according to their age category, to obtain reference values of cytokines and MMPs in order to characterize the profile of these biomarkers in the synovial fluid of healthy horses of different ages and horses with clinical signs of OA. The groups were: i) healthy foals between 1 and 2 years ($n = 21$), ii) healthy adults and with varied degrees of OA, aged 3 to 14 years ($n = 84$) and iii) healthy adults over 15 years but with articular problems due to aging ($n = 18$). We performed a general clinical examination and a particular one focused on the tarsal joint of both hind limbs, and synovial fluid was sampled from both tarsi. Our group developed a clinical score for evaluating the tibio astragalin joint comprising the AAEP modified score, manoeuvres of palpation pressure and forced flexion, observation of the profile joint and the degree of hydrarthrosis and physical characteristics of synovial fluid. The proposed clinical score corresponds to a minimum of 2.3 points (no clinical manifestation) and a maximum of 20.1 points, considered of maximum severity. Results from the measurement of cytokines and MMPs were divided into three age categories, foals, adults and adults older than 15 years because results of the young animals and adults older than 15 years had a differential performance between them and the group of adults and adults, among them. In the adult group, a clearly defined distribution in groups low, medium and high was observed in most of the variables studied. But, TNF- α and IL-1 β distribution in the three groups was not so marked, founding no significant differences between

the average values of the low and medium group. IL-1 β of healthy foals had a higher value than the rest of the other groups. The IL-1 β average value of the foals group was overcome, albeit not significantly ($p > 0.005$), by the adults group with high values. Using the proposed clinical score in 123 animals and associated with the results of the levels of cytokines and MMPs in the synovial fluid, the population was qualified in the following ranges or categories:

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

Group 2: *Basal* adults with a clinical score no more than 4. Clinically healthy animals, no alterations in the articular inflammatory BMs or with slight alterations of them.

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

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

3b active form with several increased BMs.

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

4a non activate form with slight overall increase of BMS

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

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

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

results obtained by our group showed the absence of BMs in healthy animals or in periods of remission and its presence in animals with active OA. However, we have provided the knowledge that in animals with no clinical symptoms increased BMs act as an early indicator of future OA. In our experience, the TNF α was found in little amount in horses both clinically healthy and in a non active phase of the OA. Therefore, its value lies in finding it present in elevated levels to confirm the acute inflammatory process. On the contrary, the absence has no diagnostic value to determine the non-existence of the disease. In active OA, IL-1 β is elevated as it can be seen in animals in the sub "b" classification of the various categories of the clinical score. In clinically healthy horses, with high IL-6, since this is a pro-inflammatory cytokine, it could be considered that these animals were in a remission period or that there is a destruction of articular cartilage. Clinically healthy animals had low levels of MMP-2 and absence of MMP-9. In animals with active OA, the MMP-2 significantly increased ($p < 0.001$) over the reference values of healthy horses. In horses in non active remission phase, the MMP-9 increased slightly and in horses in the chronic phase of the disease, the values were higher. In conclusion, in horses who presented clinical symptoms compatible with OA, cytokines and BMs values and synovial fluid proteomic profiles were modified, while those free of symptoms, presented values compatible with normal joints. However, animals without clinical symptoms or subclinical showed alterations in the cytokines and MMPs profile of as an early sign of alteration of the intra-articular medium or as an indicator of a clinical remission stage. The clinical score presented high correlation with acute, chronic or recurrent biochemical modifications in OA horses or horses without the presence of the disease. Therefore, this score can be used in the clinical diagnosis of OA since the synovial BMs validated its evolution both positive and negative. In the same way, the BMs studied in this experience can be used as early complementary method in the detection, monitoring and therapeutic evolution of OA.

Key Words: Osteoarthritis, equine, tarsus, diagnose, clinical score, synovial biomarkers

3. INTRODUCCION

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

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

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

La OC y la OCD se deben a defectos en el proceso de osificación endocondral, producto de alteraciones nutricionales, desbalances hormonales e interacciones acompañantes de diferentes citoquinas y metaloproteinasas (MMPs). La osificación endocondral ocurre en dos sitios: el complejo articular/epifisial y el complejo metafisial. Este proceso se desarrolla en una serie de pasos que comprenden la proliferación de condrocitos, producción de MEC, hipertrofia de los condrocitos y finalmente, mineralización de la MEC. A medida que los condrocitos maduran, producen y mantienen la MEC, compuesta de agua, proteoglicanos y colágenos, predominando el *tipo II*, a diferencia del hueso en donde predomina el de *tipo I* abundante en el aminoácido hidroxiprolina. La relación etiológica entre dieta, desbalances hormonales y

citoquinas se pone de manifiesto en los casos en que los caballos son alimentados con dietas altamente energéticas que derivarían en la producción de altos niveles crónicos de insulina y factores de crecimiento similares a insulina (IGF1), que acelerarían el proceso de diferenciación y apoptosis de condrocitos, quedando desincronizado de la mineralización adecuada de la MEC (Henson y col., 1996 y 1997).

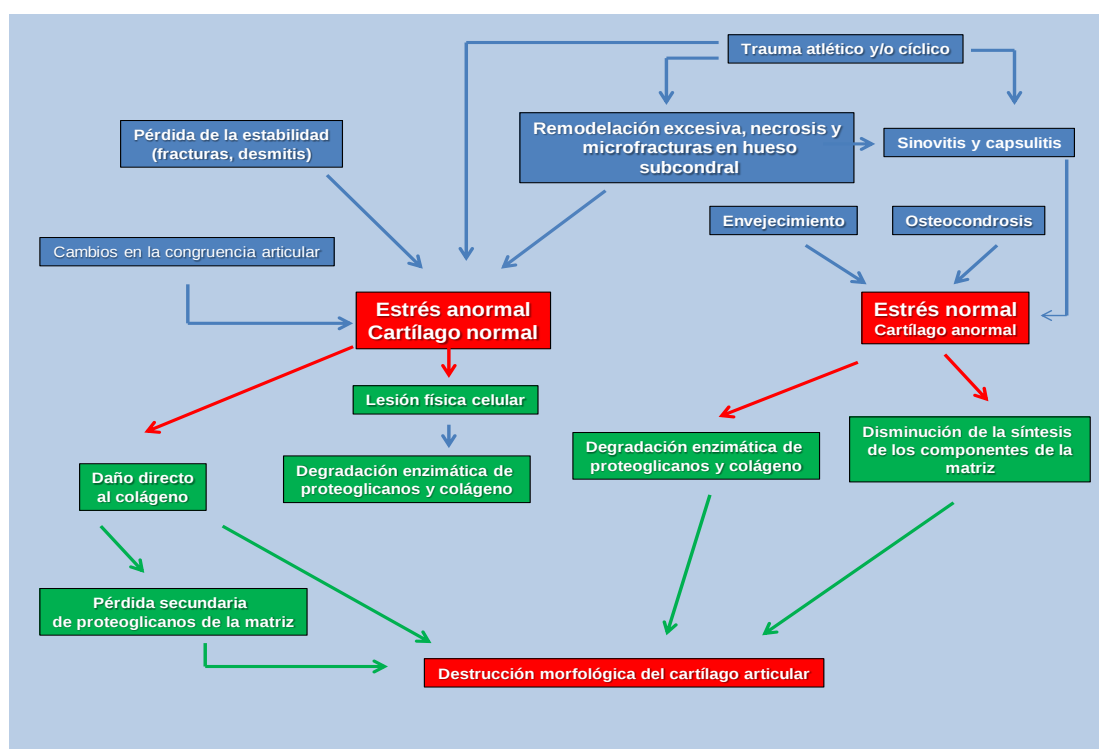
Si bien la OC y la OCD pueden predisponer a la OA, es generalmente el trauma repetido, producto de la competencia deportiva, el que produce sinovitis y capsulitis, daño intra articular y ligamentos colaterales, fracturas intra articulares, enfermedad del hueso subcondral y lesión de meniscos, en la articulación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

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

En los deportes en los cuales la vida útil del equino es prolongada, deportes ecuestres, es frecuente observar formas crónicas de artritis debidas al fracaso del cartílago articular para soportar el trauma cíclico de la actividad deportiva, sumado a los cambios propios de la edad. En otros casos en animales jóvenes las lesiones reiteradas pueden llevar al caballo al retiro de la competencia aún a edades relativamente tempranas (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007) (Heinegård, 2005) (Polli y col., 2013) (Trumble y col., 2001).

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

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

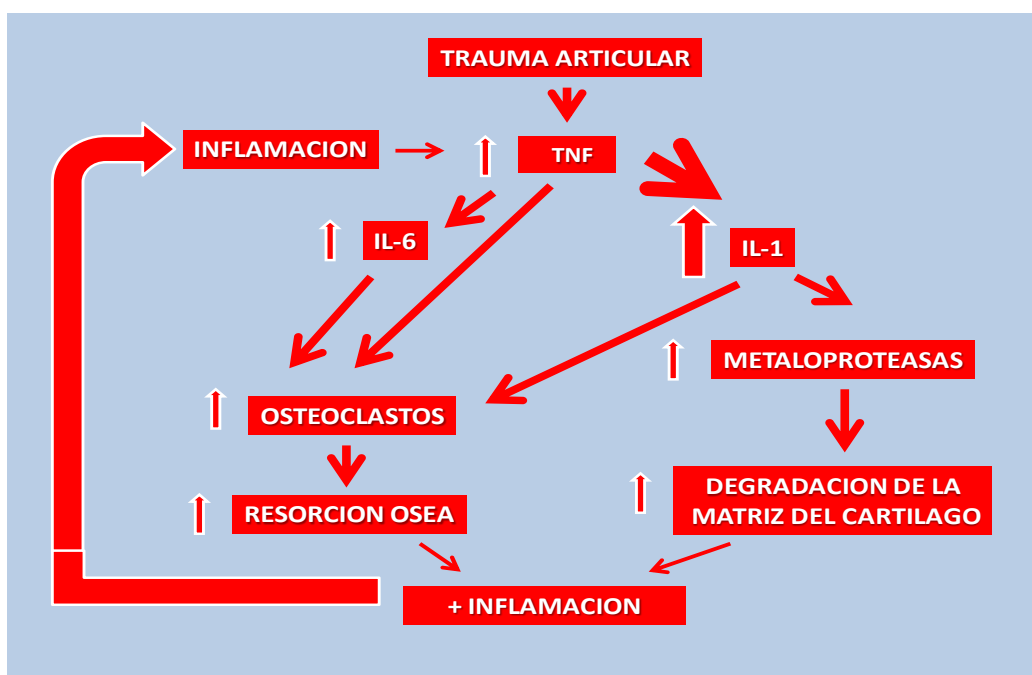


Es así que a modo de síntesis la OA puede ser definida como una enfermedad progresiva, degenerativa que se caracteriza por una pérdida del cartílago articular, eburnificación del hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial y aumento del líquido sinovial. En estadios tempranos de la enfermedad se han observado microfracturas en el cartílago calcificado y el hueso subcondral, con áreas de baja densidad y resorción ósea, cambios producidos por el trauma cíclico que ocurre a mayor velocidad que la capacidad de modelación del hueso. En los estadios más avanzados se observa erosión cartilaginosa y esclerosis del hueso subcondral, se generan osteofitos, fibrosis de la membrana sinovial y alteración macroscópica del líquido sinovial.

Los procesos inflamatorios resultantes llevan al aumento de mediadores inflamatorios, que producen la liberación de micro moléculas en el líquido sinovial. Estas moléculas son llamadas BMs y son indicadores directos o indirectos de un intercambio metabólico articular que, en algunos casos se presentan de forma constitutiva en niveles normales y en otros, anormales.

Estos biomarcadores interactúan en el mantenimiento estructural de la matriz cartilaginosa, mantenimiento necesario para soportar la carga y la reparación post ejercicio. Sin embargo, en situaciones de estrés articular, estos marcadores pueden afectar la respuesta inflamatoria, produciendo citoquinas proinflamatorias que activan enzimas del tipo gelatinasas, como las MMPs que a su vez retroalimentan el proceso por destrucción de la matriz cartilaginosa (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007) (Carmona y col., 2009a) (Catterall y Cawston, 2002) (Chávez y col., 2010) (Chiaradia y col., 2012) (de Grauw y col., 2006) (Heinecke y col., 2010) (Heinegård, 2005) (Lacourt y col., 2012). (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2005) (Polli y col., 2013) (Trumble y col., 2001) (Fig. 2).

Figura 2. Fisiopatología del trauma articular



El diagnóstico de la OA se basa en la semiología clínica y en métodos complementarios. La anamnesis puede orientar en la clasificación del proceso en agudo o crónico y resultar de guía respecto de las modificaciones en el desempeño deportivo. La inspección, confirmará la presencia de claudicaciones y/o cambios en la biomecánica según la articulación afectada, así

como cambios en su anatomía. La palpación presión ubicará zonas álgidas en la articulación. Estos exámenes se completarán con la maniobra de flexión forzada y las anestias diagnósticas tronculares e intraarticulares, La artroscopía como método invasivo permite observar el estado real de una articulación. Finalmente, los métodos complementarios imagenológicos y de laboratorio terminarán de aportar los datos que brinden el diagnóstico definitivo. (Kawcak, 2005) (Chávez y col., 2010) (Monina, 2008).

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

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

Dentro de estos índices se pueden mencionar los siguientes:

- a) El índice Western Ontario y Mc Master Universities (WOMAC). Comprende tres aspectos: dolor, rigidez y función física. La escala utilizada es 0 a 10, siendo 10 la peor condición médica.
- b) La Escala Análoga Visual (VAS, en inglés). Se evalúa el dolor preguntando al paciente sobre su sensibilidad, siendo 0 la ausencia de dolor y 100 el peor dolor posible.
- c) La Escala del Nivel de Actividad de Tegner. Evalúa de 1 a 10 el nivel de actividad física del paciente previamente a la aparición de los síntomas, y en el momento del examen,

siendo 0 un paciente discapacitado para moverse y 10 un deportista de élite. Esta escala es utilizada para la evaluación de los tratamientos quirúrgicos.

- d) El Índice de *Severidad* de la OA de cadera de Lequesne. Este índice tiene un puntaje mínimo de 0 y un máximo de 26, considerando un valor mayor a 14 extremadamente severo. Se evalúa el dolor o la incomodidad, la máxima distancia recorrida caminando y las actividades diarias realizadas por el paciente, incluyendo la actividad sexual en mujeres sexualmente activas candidatas a la prótesis de cadera (Lequesne, 1997).
- e) El índice ICRS, que incluye este índice y el índice IKDC, contiene un examen objetivo general, un examen objetivo particular de la rodilla, con una profunda anamnesis del paciente. Otra sección contemplada en el índice debe ser evaluada por el cirujano, considerando el grado de reparación quirúrgica logrado. Finalmente, las evaluaciones realizadas por el médico clínico consisten en:
 - 1. Efusión o contenido de líquido sinovial.
 - 2. Movilidad pasiva evaluada con un goniómetro y comparada con la articulación contralateral.
 - 3. Evaluación de los ligamentos colaterales y cruzados anterior y posterior.
 - 4. Evaluación del espacio articular. Se evalúa crepitación articular y dolor por medio de movimientos pasivos.
 - 5. Patología del sitio de recolección del punto de recolección del auto injerto (pos quirúrgico).
 - 6. Examen radiológico.
 - 7. Prueba funcional. Se pide al paciente que salte la máxima distancia posible sobre la pierna sana y luego la enferma.

- f) La escala de clasificación de Kellgren-Lawrence (Kellgren y Lawrence, 1957) clasifica las OA según el examen radiológico en:

Grado 0: Sin alteraciones radiológicas

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

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

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

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

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

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

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

En equinos, la evaluación de la respuesta al dolor en un miembro, se evalúa primariamente por el grado de claudicación que presenta el mismo en diferentes aires y sobre distinto tipo de superficies. Las referencias citadas utilizan para esta evaluación el índice de la American Association of Equine Practitioners (AAEP) (1991) con un rango de 0 a 5. Los mismos autores

citados suman un examen clínico, radiológico y ecográfico de las articulaciones en estudio (Broeckx y col., 2014) (Carmona y col., 2007b) (Carmona y col., 2009b) (Gangl y col., 2007).

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

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

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

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

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

En relación a los métodos complementarios para el diagnóstico de la OA, la radiología es la práctica de primera elección. Mediante este método, se pueden observar osteofitos

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

Por otra parte, la ultrasonografía puede brindar datos sobre el estado de los tejidos blandos articulares y periarticulares, del periostio y de las características físicas del líquido sinovial. La centellografía permite marcar la zona lesionada (*locus dolendi*), pero no permite realizar un diagnóstico específico del proceso. Las fracturas por estrés o zonas de debilidad de los huesos subcondrales de áreas óseas proximales también pueden presentarse como sitios activos por este método. Pero el seguimiento de la evolución de la OA puede ser difícil, ya que durante su desarrollo la captación del material radioactivo puede aumentar o disminuir. En otros países, es posible realizar diagnósticos por imágenes como tomografía computada y resonancia magnética con la misma limitación de la radiología, pero por ahora, no se encuentran a disposición para el uso en equinos, en la República Argentina (Kawcak, 2005).

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

En el análisis tradicional del líquido sinovial se ha utilizado la medición de enzimas aspartato amino transferasa, lactato dehidrogenasa y fosfatasa alcalina, proteínas totales, urea y el

recuento de leucocitos. A partir del descubrimiento de nuevos BMs y de sus efectores en la cascada inflamatoria, se han comenzado a estudiar su aplicación en el diagnóstico precoz de la OA, el desarrollo de nuevos tratamientos y el seguimiento de los mismos.

McIlwright (2005) y Chavez y col. (2010) definen un BM como cualquier indicador molecular, directo o indirecto, de recambio anormal del tejido articular, que corresponde a un componente normal o a un subproducto de los procesos metabólicos del tejido articular (Fig. 3). En la enfermedad articular, el balance fisiológico de modelado y remodelado osteoarticular, procesos anabólicos y catabólicos, se altera y las concentraciones de BMs pueden aumentar o disminuir.

Respecto a las citoquinas estas son proteínas de comunicación celular que son secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a la presencia de distintos antígenos. A su vez las diferentes citoquinas median los procesos fisiológicos de las células inmunitarias y del tejido óseo y cartilaginoso y estimulan distintas respuestas defensivas e inflamatorias, tanto a nivel local (articular) como sistémico. Entre estas citoquinas, se consideran de importancia en las afecciones articulares al TNF- α , IL-1 β , IL-4 y IL-6, todas ellas presentes en el líquido sinovial pero en niveles diferentes en los animales sanos que en aquellos que presentan signos clínicos de OA (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Carmona y col., 2009a) (Catterall y Cawston, 2002) (Clegg y col., 1997a) (Chávez y col., 2010) (David y col., 2007) (De Grauw y col. 2006) (De Simone y col., 2011) (Feldman y Maini, 2001) (Ley y col., 2007) (Polli y col., 2013) (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2009a) (Rolando, y col. 2012) (Todhunter y col., 1996) (Trumble y col., 2001).

Las MMPs que tienen valor diagnóstico en la OA son, fundamentalmente, la MMPs 2 y 9, las cuales son endopeptidasas del tipo gelatinasas, zinc y calcio dependientes, que participan en el recambio fisiológico y patológico de la MEC del cartílago, degradándola en los procesos de OA.

Cuando existe un recambio óseo fisiológico, la liberación por parte de condrocitos, células sinoviales y fibroblastos de TNF- α e IL-1 β , produce una respuesta de los osteoblastos que aumenta su producción de MMPs dentro de un rango de normalidad, incluso en general se expresa la MMP 2 pero no la MMP 9. La expresión de estas enzimas está altamente regulada, ya que son sintetizadas como proenzimas.

Una vez activadas, tienen el potencial de destruir la MEC. Por lo tanto, su actividad está controlada por TIMs (Brama y col., 1998) (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Catterall y Cawston, 2002) (Clegg y col., 1997a) (Clegg y col., 1997b) (Chávez y col., 2010) (Chiaradia y col., 2012) (De Simone y col., 2012a) (Fietz y col., 2008) (McIlwraith, 2001) (Polli y col., 2013) (Rolando, y col. 2012) (Trumble y col. 2001).

Figura 3. Biomarcadores del metabolismo articular osteocondral utilizados para el diagnostico de enfermedad articular en equinos.

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

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

4. HIPOTESIS GENERAL

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

5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

5. 1. General

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

5. 2. Específicos

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

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

6. MATERIALES Y METODOS

6. 1. Animales

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

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

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

A todos se les efectuó un examen clínico general y particular enfocado en las articulaciones tibio astragalinas de ambos miembros, extrayéndose de las mismas, en forman estéril, una muestra de líquido sinovial. El abordaje de la articulación se realizó por el receso antero disto medial, utilizando una aguja hipodérmica 21 G x 1 ½". Se obtuvieron por goteo aproximadamente 3 cc de líquido sinovial. Cuando este fue escaso, se aspiró el mismo con una jeringa de 5 cc. En los casos en los que se encontró comprometida alguna otra articulación, carpo, nudos o babilla también se obtuvieron muestras del líquido sinovial de las mismas. Las muestras se transportaron en tubos de ensayo en forma inmediata al laboratorio donde se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se conservó a - 70° C.

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

- a. Inicial para clasificar clínica y bioquímicamente a los animales en estudio.
- b. Basal para cada protocolo en la etapa de pre tratamiento.
- c. Post Tratamiento a los 3, 10 y 21 y 60 días.

- d. Estadios de remisión en aquellos casos en los cuales durante los seis meses posteriores al tratamiento no presentaron síntomas.

A fin de cuantificar el examen clínico de la articulación se desarrolló un índice clínico (variable cuantitativa), tomando como base el índice de claudicaciones de la AAPE (1991).

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

6.2. Análisis Bioquímicos.

- La concentración de citoquinas (IL-1 β , IL-4 IL-6 y TNF- α) en líquido sinovial se determinó por medio de un kit comercial ELISA (OptEIA BD Biosciences, San Diego, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Los niveles de citoquinas se derivaron de una curva estándar. Las muestras no se diluyeron para su análisis. Las reacciones se obtuvieron agregando solución sustrato TMB (Biosciences, san Diego, CA, USA) y se interrumpieron agregando ácido sulfúrico 1M. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector microplaca Rayto 2100C (China).
- Evaluación de MMPs 2 y 9 por el método zimográfico. Este método consiste en una corrida electroforética en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), pero el gel sobre el cual se corren las muestras tiene una base de gelatina que es el sustrato de las enzimas que se midieron. Después de la corrida se realizan lavados con distintos detergentes para renaturalizar las enzimas y el posterior análisis densitométrico se realizó con el software Scion Image (De Simone y col., 2011) (Rolando y col., 2013).
- Evaluación de Proteína C reactiva mediante kit comercial en suero y líquido sinovial de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anti-PCR (BioSystems, Barcelona, España). La determinación se realizó por visualización macroscópica de aglutinación.
- Evaluación del perfil proteico del líquido sinovial mediante la determinación proteínas totales, albúminas mediante método colorimétrico y urea mediante método enzimático cuantitativo (Wiener Lab, Argentina).

6. 3. Análisis estadístico

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

7. RESULTADOS

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

El índice clínico aplicado quedo desarrollado de la siguiente forma:

Clínico General

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

Clínico Particular

Los números que anteceden cada definición son el puntaje otorgado según el caso con el índice clínico propuesto

A) Grado de Claudicación:

0. No perceptible.
1. Difícil de observar y no siempre aparente (dolor a la flexión forzada).
2. Difícil de observar al paso o al trote en línea recta pero aparente en ciertas circunstancias de mayor esfuerzo (trabajo en círculo).
3. Observable al trote bajo toda circunstancia.

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

B) Análisis macroscópico del líquido sinovial

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

C) Grado de alteración del perfil articular

- 1. Normal.
- 2. Aumento del líquido extraído.
- 3. Hidrartrosis leve.

4. Hidrartrosis severa con o sin fibrosis de la cápsula.

5. Inflamación articular (aumento de tamaño, dolor y calor).

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

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

A los efectos de evaluar el valor de los diferentes niveles de BMs en relación al índice clínico, se trabajó con los valores de referencia de citoquinas y MMPs en líquido sinovial establecidos previamente en nuestro laboratorio (Tabla 1) (Fig. 4)

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

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

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

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

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

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

Grupo 3: Equinos adultos con índice clínico 4-6 con leve sintomatología clínica de OA.

3a forma no activa con disminución de IL-4

3b forma activa con aumento de varios BMs.

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

	Potrillos (1-2 años)	Bajo	Adultos (3-14 años)		Adultos (>15 años)
			medio	alto	
IL-1 β	120,96 $\pm$ 42,49 ^a	37,37 $\pm$ 12,25 ^b	61,75 $\pm$ 7,02	171,56 $\pm$ 132,68	57,12 $\pm$ 8,38
IL-4	6,10 $\pm$ 1,43 ^{d, g}	2,94 $\pm$ 0,93 ^{a, d}	7,41 $\pm$ 0,71 ^{d, g}	14,61 $\pm$ 5,37 ^g	10,83 $\pm$ 4,20 ^c
IL-6	115,14 $\pm$ 52,49	62,68 $\pm$ 25,16	148,66 $\pm$ 28,86	363,73 $\pm$ 123,06 ^e	134,21 $\pm$ 45,24
TNF- α	41,42 $\pm$ 13,64 ^a	30,61 $\pm$ 6,39	46,45 $\pm$ 10,94	108,71 $\pm$ 50,39 ^e	86,35 $\pm$ 43,25 ^e
MMP 2	140,47 $\pm$ 61,98 ^a	63,23 $\pm$ 25,61	128,27 $\pm$ 24,80 ^f	354,29 $\pm$ 174,88 ^e	49,13 $\pm$ 18,50
MMP 9	55,45 $\pm$ 58,17 ^{a, e}	0,34 $\pm$ 0,15	11,19 $\pm$ 3,96	85,95 $\pm$ 47,97 ^e	8,28 $\pm$ 7,63
n	21	34	29	21	18

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

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

Grupo 4: Equinos adultos con *índice clínico 6-10* con sintomatología de OA con/sin deformaciones articulares.

4a forma no activa con leve aumento general de BMs

4b forma activa con aumento de MMP 2, expresión de MMP 9 y elevada la IL-6 y otros BMs.

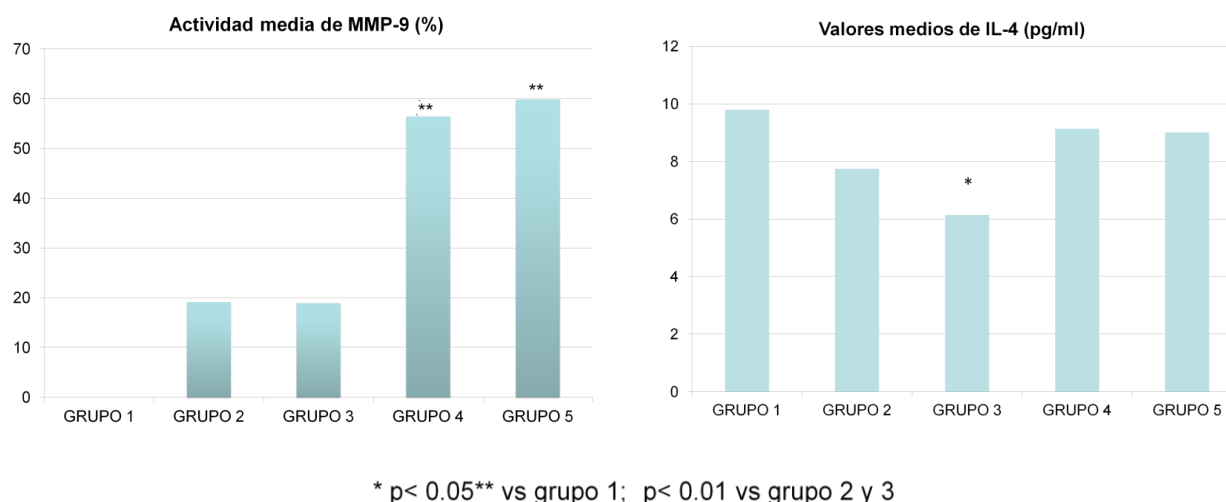
Grupo 5: *Gerontes*. Equinos adultos mayores de 15 años. Síntomas crónicos de OA por envejecimiento, con aumento de algunos BM y disminución de otros, característicos del proceso de envejecimiento.

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

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

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

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



Objetivo complementario: Caracterización del perfil proteómico del líquido sinovial

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

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

	Proteínas totales	Albuminas	Urea
Sanos	1,366 ± 0,1517	0,7562 ± 0,09921	41,59 ± 4,320
Osteoartríticos	2,133 ± 0,2723*	1,090 ± 0,1729	43,54 ± 2,445

*p<0,05

Respecto a la determinación de la PCR la técnica utilizada en suero detecta concentraciones mayores a 6 mg/l.

La PCR resultó positiva en uno solo de los animales con enfermedad activa tanto en la muestra de líquido sinovial como de suero. Dichas muestras fueron tituladas y los niveles resultaron de 6 a 12 mg/l.

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

8. DISCUSION

El diagnóstico clínico definitivo de la OA presenta al médico veterinario dificultades debido a la fisiopatología propia de esta enfermedad, como ha quedado documentado en la caracterización clínica secuencial que hemos realizado en 123 equinos de distintas edades, lo que nos ha permitido evidenciar las variaciones sintomatológicas de OA en sus diferentes estadios y presentaciones.

La OA se caracteriza por tener un inicio en muchos casos poco manifiesto como consecuencia de daño articular diverso que se auto mantiene, y por su curso progresivo, intercalándose

periodos de remisión o inactividad de extensión temporal variable, que evoluciona hacia una fase crónica o etapa final de la enfermedad, que incluye neto compromiso del hueso subcondral y tejidos adyacentes. Por este motivo es fundamental el diagnóstico temprano de la enfermedad a fin de favorecer la remisión y que la articulación afectada retorne su trabajo normal, reduciendo el dolor y evitando el deterioro progresivo del cartílago y el compromiso del hueso subcondral subyacente (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007) (McIlwraith, 2005) (Polli y col., 2013).

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

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

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

El seguimiento de un paciente con OA implica contar con técnicas semiológicas estandarizadas que desarrollen un examen fijo, repetible y con resultados validados por medio de métodos complementarios correlacionados, como ser artroscopías, análisis de biomarcadores, entre otros. (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2009b) (McIlwraith y col., 2010) (McIlwraith y col., 2012). Para lograr este objetivo, se debe contar con un índice que contemple la mayor parte de las observaciones anamnéscas y clínicas posibles.

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

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

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

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

En esta experiencia, hemos implementado un índice utilizando una combinación de índices clínicos que recibieron un valor numérico cuya suma resultó en un puntaje máximo de 20,1 y un corte mínimo de 2,3, considerándose este valor el correspondiente al índice clínico de un animal sin alteraciones clínicas (Perrone, y col., 2013). Pero, al igual que en el Índice de

Severidad de la OA de cadera de Lequesne en humanos (Lequesne, 1997), si bien el índice máximo es 20,1, ya el valor mayor de 13 implica un grado severo de OA. La caracterización del estudio clínico propuesto y su posterior aplicación en el diagnóstico de la OA responde a uno de los objetivos planteados en el proyecto inicial de esta maestría.

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

El tarso es una articulación compuesta con diversos sacos articulares que soporta una cantidad importante de stress y es muy propensa a desarrollar artritis temprana. Además el receso sinovial antero medial de la articulación tibio astragalina es de fácil acceso y se comunica con la articulación intertársica proximal. Las articulaciones intertársica distal y tarso metatársica se comunican directamente en algunos caballos y raramente la articulación intertársica proximal podría comunicarse con estas dos (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Carmona y col., 2009a) (Holmström y col., 1994a) (Holmström y col., 1994b) (Kramer y col., 2000) (Schumacher y Moll, 2012) (Van Den Bogert y col., 1994) (Wentink, 1978).

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

Aparentemente, el índice clínico aumentado será el resultado de la alteración mecánica que la enfermedad articular produce. La evolución del índice clínico en la OA en general es un proceso paulatino, a excepción de lo que ocurre en los casos de artritis aguda, este va aumentando a medida que la función fisiológica del cartílago articular y el hueso subcondral se va alterando con el tiempo de permanencia de la enfermedad activa. Además, los periodos de remisión a medida que avanza la OA son cada vez son de más corta duración. Asimismo al instaurar tratamientos positivos, el índice clínico puede verse mejorado, pero siempre en forma lenta y paulatina.

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

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

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

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

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

La IL-1 y el TNF- α son liberados por la membrana sinovial y los condrocitos ante una sinovitis, producto del trauma articular. Ambas citoquinas se liberan en exceso y aumentan la tasa de degradación de proteoglicanos, disminuyen su síntesis o actúan en forma conjunta en ambos procesos. Esto se logra, en parte por la liberación de MMPs y prostaglandina E₂.

La IL-6 puede ser producida por fibroblastos sinoviales y condrocitos articulares, inducida por la síntesis de IL-1 β y TNF- α . A su vez, la IL-6 estimula a nivel hepático la síntesis de proteínas de fase aguda como la PCR. El rol de la IL-6 es contradictorio, ya que es una citoquina proinflamatoria y catabólica, al inhibir la formación ósea y promover la resorción al estimular los osteoclastos. Sin embargo, la IL-6 regula e inhibe las acciones de la IL-1 β . Es la razón por la cual la IL-6 se encuentra presente en animales sanos en niveles más bajos y en aquellos afectados de OA en niveles más elevados, tanto en los períodos de remisión clínica como en los de reagudización.

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

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

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

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

sinovial. En nuestra experiencia, el TNF- α se encontró en poca cantidad de caballos tanto clínicamente sanos como en fase no activa de la OA, coincidiendo con Trumble y col. (2001) y Ley y col. (2007). Por lo tanto, su valor radica en encontrarlo presente en niveles elevados para confirmar el proceso inflamatorio agudo (Polli y col., 2013), situación que es dable reproducir en la artritis experimental con adyuvante intra articular (De Simone y col., 2013b).

Pero a la inversa, su ausencia no tiene valor diagnóstico para determinar la no existencia de la enfermedad. Su utilidad es manifiesta al evaluar su disminución post tratamiento. En este punto también es importante mencionar la relación existente entre TNF- α e IL-1 β ya que la liberación del TNF- α produce un aumento en la liberación de IL-1 β y ésta tiene mayor capacidad de activación de los tipos celulares antes descritos para la liberación de MMPs. La IL-1 β se presentó elevada en los animales que se encontraban en fase activa de la OA como puede observarse en la sub clasificación “b” de las distintas categorías del índice clínico presentado en esta tesis en Tabla 1 (página 29). A su vez se debe considerar que para reducir la liberación de MMPs, habría que inhibir también la IL-6 porque se plantea un efecto redundante en el cual ante la ausencia de una, la otra llevaría a cabo las acciones, por lo tanto si se inhibe solamente una de las dos, la actividad enzimática no se vería reducida (Brama y col., 1998) (Caggiano y col., 2013) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007a) (Carmona y col., 2009a) (Catterall y Cawston, 2002) (Clegg y col., 1997a) (Chávez y col., 2010) (Chiappe Barbará y col., 2016) (David y col., 2007) (De Grauw y col. 2006) (De Simone y col., 2011) (Feldman y Maini, 2001) (Ley y col., 2007) (Polli y col., 2013) (McIlwraith, 2001) (McIlwraith, 2009a) (Rolando, y col. 2012) (Todhunter y col., 1996) (Trumble y col., 2001).

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

Hemos comunicado la presencia de IL-6 tanto en equinos sanos y con OA en período de remisión o activa, pero con elevaciones significativas en las articulaciones con OA activa (Caggiano y col. 2014) (De Simone y col. 2011), coincidiendo con Ley y col. (2007) y Trumble y

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

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

Hemos observado valores bajos de MMP 2 y ausencia de MMP 9 en animales clínicamente sanos. En animales con OA en período activo, la MMP 2 aumentó significativamente ($p < 0.001$) sobre los valores de referencia en equinos sanos. La MMP 9 aumentó levemente en equinos en fase de remisión no activa y en valores superiores en fase crónica de la enfermedad. Resta aclarar que en los animales adultos con perfil de citoquinas bajo, índice de no actividad de la enfermedad, la MMP9 es igual a 0. Pero, en aquellos animales con manifestación clínica de OA los niveles de esta MMP aumentan, prácticamente en todos ellos, haciéndose detectable por el método utilizado (Tabla 1) (Fig. 4).

También se presenta elevada la MMP 9 en los potrillos, aparentemente esto guardaría relación con el intenso crecimiento óseo en esta etapa de la vida. Sin embargo, en los potrillos normales

más grandes de dos años su valor también se hace no detectable (Caggiano y col., 2014) (Chiappe Barbará y col., 2016) (De Simone y col. 2011) (De Simone y col. 2012a) (De Simone y col. 2013a) (Perrone y col., 2013). Se encontraron referencias similares en Brama y col. (1998), Fietz y col. (2008) y Trumble y col. (2001).

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

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

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

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

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

El valor de proteínas totales guardó relación con el grado de lesión clínica, esto podría ser de utilidad para caracterizar diagnósticos y tratamientos en la enfermedad articular. Además la evaluación de la urea permite corregir posibles efectos de dilución en los casos de hiderartrosis con abundante filtrado de agua (Bottini y col., 2013) (Polli y col., 2013).

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

9. CONCLUSIONES

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

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

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

Propuesta a futuro

Analizando los distintos casos clínicos estudiados durante el transcurso de esta experiencia, restaría determinar cómo se combinan los valores bajo, medios y elevados de las distintas citoquinas. Es decir, si estos valores se presentan elevados en forma conjunta o si se puede determinar algún perfil característico para las distintas etapas de evolución de la OA. Por ejemplo, si un individuo que tiene elevada la IL-1 β tendría probablemente elevada la IL-4, aunque en la fase aguda de la OA, en general, la IL-4 se encuentra transitoriamente en valores más bajos que los de referencia. O poder determinar cuál es el perfil característico de la forma activa de la OA. Se podría sugerir que valores de IL-6 superiores a 200 pg/ml son indicativos de forma activa de la enfermedad, máxime si se encuentran acompañados de valores de MMP 2 mayores de 250 % e IL-4 superior a 13 pg/ml.

10. BIBLIOGRAFIA

- AAEP, American Association of Equine Practitioners. 1991. Guide for veterinary service and judging of equestrian events: definition and classification of lameness. Lexington: AAEP, USA, 19.
- Baltzer, A. W. A.; Moser C.; Jansen S. A; Krauspe, R. 2009. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 17: 152-160.

- Brama, P. A. J.; TeKoppele, J. M.; Beekman, B.; Van Weeren, P. R.; Barneveld, A. 1998. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and Osteocondrosis. *Ann Rheum Dis.* 57: 697–699.
- Bramlage, L. R. 2014. Respuesta del hueso al ejercicio de alta velocidad. *Revista de la Asociación Argentina de Veterinaria Equina.* Año 13, 49: 12-28.
- Broeckx, S.; Zimmerman, M.; Crocetti, S.; Suls, M.; Mariën, T.; Ferguson, S. J.; Koen Chiers, K.; Duchateau, L.; Franco-Obregón, A.; Wuertz, K.; Spaas, J. H. 2014. Regenerative Therapies for Equine Degenerative Joint Disease: A Preliminary Study. *PLoS ONE* 9 (1): e85917. doi:10.1371/journal.pone.0085917.
- Bottini, M., Álvarez, E., Perrone, G., Díaz, J., Rubatino, F., Marino, M., De Simone, E., Chiappe Barbará, A. 2013. Evaluación preliminar de parámetros del perfil proteico en líquido sinovial proveniente de equinos sanos y con osteoartritis. XXIV Conferencias de Veterinaria Equina. Asociación Argentina de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina.
- Caggiano, N.; Perrone, G.; Montes de Oca, CH; Dodera, C; De Simone, E.; Chiappe Barbará, M. A. 2014. Relación entre el diagnóstico clínico de osteoartritis y biomarcadores moleculares específicos en equinos. IV JORNADAS DE JOVENES INVESTIGADORES EN CIENCIAS VETERINARIAS. Facultad de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Argentina.
- Caggiano, N.; Chiappe Barbará, M. A.; De Simone, E.; Ferretto, A.; Lastra, Y.; Perrone, G.; Rubatino, F. 2015. Análisis del uso terapéutico de anti-tnf- α en 3 equinos con osteoartritis crónica. XXIII JORNADAS DE JOVENES INVESTIGADORES. GRUPO MONTEVIDEO. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- Cargile, J. L.; MacKay, R. J.; Dankert, J. R.; Skelley, L. 1995. Effect of treatment with a monoclonal antibody against equine tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic, and circulating TNF responses of miniature horses given endotoxin. *Am J Vet Res.* 56 (11):1451-9.

- Carmona, J. U.; Argüelles, D.; Climent, F.; Prades, M. 2007b. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A Preliminary Pilot Clinical Study Journal of Equine Veterinary Science. 27, 4: 167-170.
- Carmona, J. U.; Argüelles, D.; Prades, M. 2009a. Efectos bioquímicos y clínicos del hialuronato oral en caballos Andaluces jóvenes con osteocondrosis tarsocrural. Arch Med Vet. 41: 139-147.
- Carmona, J. U.; López, C.; Prades, M. 2009b. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. Arch Med Vet 41, 175-179.
- http://www.cartilage.org/files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf
- Catterall, J. B.; Cawston, T. E. 2002. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. Arthritis Research and Therapy. 5, 1: 12-24.
- Clegg, P. D.; Burke, R. M.; Coughlan, A. R.; Riggs, C. M.; Carter, S. D. 1997a. Characterization of equine matrix metalloproteinases 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. Equine Vet J. 29, (5): 335-342.
- Clegg, P. D.; Coughlan, A. R.; Riggs, C. M., Carter, S. D. 1997b. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. Equine Vet J. 29, (5): 343-348.
- Crowley, D. C.; Lau, F. C.; Sharma, P.; Evans, M.; Guthrie, N.; Bagchi, M.; Bagchi, D.; Dey, D. K.; Raychaudhuri, S. P. 2009. Safety and efficacy of undenatured type II collagen in the treatment of osteoarthritis of the knee: a clinical trial. Int J Med Sci; 6, (6):312-321.
- Chávez, H.; Araya, O.; Folch, H.; Morán, G. 2010. Uso de biomarcadores para el diagnóstico de enfermedad articular en el caballo. Arch Med Vet. 42, 1-10.

- Chiappe Barbará, M. A.; Perrone, G.; Caggiano, N.; Lastra, Y.; Rubiano, F.; De Simone, E. 2016. Determination of reference values of cytokines and matrix metalloproteinases in synovial fluid of horses of different ages. *Journal of Equine Veterinary Science*. En evaluación.
- Chiaradia, E.; Pepe, M.; Tartaglia, M.; Scopetta, F.; D'Ambrosio, C.; Renzone, G.; Avellini, L.; Moriconi, F.; Gaiti, A.; Bertuglia, A.; Beccati, F.; Scaloni, A. 2012. Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. *Journal of Proteomics*. 75: 4478 – 4493.
- David, F.; Farley, J.; Huang, H.; Lavoie, J-P.; Laverty, S. 2007. Cytokine and Chemokine Gene Expression of IL-1b Stimulated Equine Articular Chondrocytes. *Veterinary Surgery*. 36:221–227.
- De Grauw, J.; Brama, P.; Wiemer, P.; Brommer, H.; Van de Lest, C.; Van Weeren, R. 2006. Cartilage-derived biomarkers and lipid mediators of inflammation in horses with osteochondritis dissecans of the distal intermediate ridge of the tibia. *Am J Vet Res*. 67, 7: 1157-1162.
- De Simone E.; Isla L.; Caggiano N.; Marino M.; Perrone G.; Chiappe Barbará A. 2011. Evaluación de parámetros inflamatorios en líquido sinovial de articulaciones clínicamente normales y osteoartíticas de equinos deportivos. XII Conferencias de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina.
- De Simone, E.; Perrone, G.; Caggiano, N.; Polli, M.; Rolando, J.; De Luca Sarobe, V.; Marino, M.; Chiappe Barbará, A. 2012a. Estudio de la actividad de metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y 9) en líquido sinovial de equinos con patología articular. XXIII Conferencias de Veterinaria Equina. Asociación Argentina de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina.
- De Simone, E., Perrone, G., Caggiano, N., Polli, M., Rolando, J., Lastra, Y., Montes de Oca, Ch, De Luca Sarobe, V., Chiappe Barbará, A. 2013a. Terapia biológica con anti-TNF- α para el tratamiento de la osteoarthritis recidivante en el equino deportivo. XXIV Conferencias de Veterinaria Equina. Asociación Argentina de Veterinaria Equina. Buenos Aires, Argentina.

- De Simone, E., Caggiano, N., Polli, M., Rolando, J., Lastra, Y., Gullace, F., Ritaccoc E., De Luca Sarobé, V., Chiappe Barbará, A. 2013b. Efecto del alendronato sobre el perfil de citoquinas y metaloproteinasas 2 y 9 en un modelo múrido de artritis experimental. *Rev. Colomb Reumatol.* 20(4):202-210.
- Ekman, S. 2005. Involvement of the Cartilage/Bone Junction in Equine Osteoarthritis (Oa) of the Middle Carpal Joint. *Proceedings of a Workshop on Equine Musculoskeletal Biomarkers.* Colorado, USA, 30th October – 2nd November 2005 Havemeyer Foundation Monograph series 22: 26-31.
- Feldman, M.; Maini, R. 2001. Anti-TNF α Therapy of Rheumatoid Arthritis: What Have We Learned? *Annu. Rev. Immunol.* 19: 163-196.
- Fietz, S.; Einspanier, R.; Hoppner, S.; Hertsch, B.; Bondzio, A. 2008. Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. *Equine Vet J.* 40, (3): 266-71.
- Gangl, M.; Serteyn, D.; Lejeune, J.; Schneider, N.; Grulke, S.; Peters, F; Vila, T; Deby-Dupont G.; Deberg; M; Henrotin, Y. 2007. A type II-collagen derived peptide and its nitrated form as new markers of inflammation and cartilage degradation in equine osteochondral lesions. *Res in Vet Science.* 82: 68–75.
- Goodrich, L. R.; Nelson, B. B. 2013. Joint Disease Treatment. *Proceedings of the 13th International Congress of the World Equine Veterinary Association.* October 3 - 5, 2013. Budapest, Hungary. 1-12.
- Goranov, N. V. 2012. Clinical changes in sodium monoiodoacetate–induced stifle osteoarthritis model in dogs. *Vet. World.* 5(3):138-144.
- Heinegård, D. 2005. Does Inflammation Trigger Tissue Destruction or is Tissue Destruction Activating Inflammation in Joint Disease? *Proceedings of a Workshop on Equine Musculoskeletal Biomarkers.* Colorado, USA, 30th October – 2nd November 2005 Havemeyer Foundation Monograph series 22: 13.

- Heinecke, L. F.; Grzanna, M. W.; Au, A. Y.; Mochal, C. A.; Rashmir-Raven, A.; Frondoza C. G. 2010. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate. *Osteoarthritis and Cartilage*. 18, 220-227.
- Henson, F. M. D.; Davies, M. E.; Schofield, P. N.; Jeffcott, L. B. 1996. Expression of *types II, VI and X* collagen in equine growth cartilage during development. *Equine Vet J*. 28, 3: 189-198.
- Henson, F. M. D.; Davenport, C.; Butler, L.; Moran, I.; Shingleton, W. D.; Jeffcott, L. B.; Schofield, P. N. 1997. Effects of insulin and insulin – like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine Vet J*. 29, 6: 441-447.
- Holmström, M.; Fredricson, I.; Drevemo, S. 1994a. Biokinematic differences between riding horses judged as good and poor at the trot. *Equine Vet J*. 26, S17: 51–56.
- Holmström, M.; Fredricson, I.; Drevemo, S. 1994b. Biokinematic analysis of the Swedish Warmblood riding horse at trot. *Equine Vet J*. 26, 3: 235–240.
- Jang, S-J; Kim, J-D; Cha, S-S. 2013. Platelet-rich plasma (PRP) injections as an effective treatment for early osteoarthritis. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. 23, 5: 573-580.
- Jeffcott, L. B. 1996. Osteochondrosis – An international problema for the horse industry. *J Equine Vet Science*. 16, 1: 32-37.
- Kawcak, C. E. 2005. Imaging Biomarkers: Where Are We Going?. *Proceedings of a Workshop on Equine Musculoskeletal Biomarkers*. Colorado, USA, 30th October – 2nd November 2005 Havemeyer Foundation Monograph series 22: 16-17.
- Kellgren, J. H.; Lawrence, J. S. 1957. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **16** (4): 494–502.

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

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

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

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