

## Contenido de glicosaminoglicanos del líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica de caballos castrados y yeguas de diferentes edades

### Synovial fluid glycosaminoglycan concentration in metacarpophalangeal joint of castrated horses and mares of different ages

H. ADARMES, M.V., Mg. B.Q.; A. RIVEROS, M.V.; M. GALLEGUILLOS, B.Q., Mg. B.Q.; E. GONZÁLEZ, Q.F.  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile,  
Santa Rosa 11.735, La Pintana, Santiago, hadarmes@uchile.cl

#### SUMMARY

Total concentration of synovial fluid glycosaminoglycan (GAGs) and a fraction of it (GAGsT) which correspond to different GAGs from hyaluronic acid or sulfated GAGs (GAGsS) that mainly consist of chondroitin sulfate and keratan sulfate, were measured. Samples of synovial fluid were taken from normal metacarpophalangeal joints of crossbred equines immediately after slaughter by aseptic needle aspiration. *Post mortem* joints examination showed that there was no gross evidence of osteoarthritis or other joint disease, based on the appearance of synovial membrane and articular cartilage. Synovial fluid samples were evaluated by its external appearance, protein concentration and mucin clot test. Samples were allotted in four age groups by teeth examination and divided in mares (m) and castrated horses (c.h.) as follows: 1.5 – 2 years (n = 23: 12 m. and 11 c.h.); 4 – 5 years (n = 15: 9 m. and 6 c.h.); 6 – 8 years (n = 23: 13 m. and 10 c.h.) and over 10 years old (n = 17: 12 m. and 5 c.h.). A colorimetric method with Alcian Blue using different electrolyte concentrations was used to quantify these GAGs.

There were no significant differences of GAGsT concentration between mares and castrated horses, but the average of both older groups (> 10 years) was lower ( $1.71 \pm 0.79$  mg/ml) than the previous age group ( $3.39 \pm 1.93$  mg/ml). The GAGsS content of the synovial fluid, that reflects the catabolic processes of extracellular matrix (MEC) of the articular cartilage, showed no differences between mares and castrated horses in any age group, but these concentrations were always higher in castrated horses. However, the final average of these GAGsS, was higher ( $p < 0.05$ ) in castrated horses ( $0.48 \pm 0.28$  mg/ml) than in mares ( $0.34 \pm 0.15$  mg/ml), suggesting a more active degradation of cartilage extracellular matrix in castrated horses. Furthermore, these concentrations tended to decrease from younger to older animals in mares and castrated horses, which could reflect a slower metabolic processes with ageing.

The difference between GAGsT and GAGsS represents the concentration of synovial fluid hyaluronic acid, which was lower in the older group of mares ( $1.62 \pm 0.76$  mg/ml) and castrated horses ( $0.96 \pm 0.64$  mg/ml), suggesting a greater susceptibility to cartilage damage in these animals. These results verify the effect of age or sex condition on synovial fluid GAGs concentration, which could reflect the metabolic status of articular components and therefore, useful for comparison of pathologic conditions.

*Palabras claves:* líquido sinovial, glicosaminoglicanos, condroitín sulfato, queratán sulfato, ácido hialurónico, equinos.

*Key words:* synovial fluid, glycosaminoglycans, chondroitin sulfate, keratan sulfate, hyaluronic acid, equine.

---

Aceptado: 23.04.2003.

Financiamiento: Proyecto DID I-14-2/2001. Universidad de Chile.

## INTRODUCCION

El desplazamiento normal de los equinos depende de la integridad de los componentes articulares de las articulaciones móviles o diartrosis. Entre estos componentes se encuentra el cartílago articular de naturaleza hialina que carece de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, el cual contiene un 70% de agua, un 2 a 5% de células denominadas condrocitos, que sintetizan una abundante matriz extracelular (MEC) constituida principalmente por moléculas de colágeno tipo II y de proteoglicanos con sus glicosaminoglicanos (GAGs) (Hardingham y Bayliss, 1990; Todhunter, 1996). El tipo de colágeno que se encuentra en mayor proporción en el cartílago es el tipo II, el cual se dispone en forma de redes, permitiéndole a este tejido resistir las fuerzas de tracción (Palmer y Bertone, 1994). Los proteoglicanos constituyen el componente orgánico cuantitativamente más importante de la MEC del cartílago y son responsables de gran parte de las propiedades fisicoquímicas del tejido (Bayliss y col., 1999; Räsänen y Messner, 1999). Los proteoglicanos son moléculas de alta masa molecular, formados por una proteína central, a la que se unen covalentemente y en forma perpendicular los GAGs. Entre los distintos proteoglicanos del cartílago articular se describe el agregán, que es el más abundante (aproximadamente 90%) y el de mayor tamaño ( $3 \times 10^6$  Da) (Alberts y col. 1994; Palmer y Bertone, 1994; Hedlund y col., 1999). El agregán está formado por aproximadamente 100 cadenas de condroitín -6 -sulfato y 50 cadenas de queratán sulfato (Hardingham y Bayliss, 1990; Palmer y Bertone, 1994). Los GAGs son moléculas polianiónicas por su alto contenido de grupos sulfato y carboxilo disociados, que le permiten al cartílago retener gran cantidad de agua, lo que sumado a la repulsión de los grupos aniónicos le proporciona al tejido su gran capacidad de amortiguación a los impactos (Palmer y Bertone, 1994; McIlwraith, 1996; Räsänen y Messner, 1999).

El agregán se organiza en la MEC del cartílago articular formando grandes estructuras macromoleculares a través de la unión no

covalente del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica del proteoglicano con una cadena de ácido hialurónico, un GAG no sulfatado, de alto peso molecular que se encuentra en baja concentración en el cartílago articular (Roughley y Lee, 1994; Tulamo y col., 1996; Maroudas y col., 1998). Cada cadena de ácido hialurónico se une generalmente a aproximadamente 20 moléculas de agregán, pero se describe que es capaz de unir hasta 100 unidades originando agregados macromoleculares de masa molecular aproximada de  $2 - 5 \times 10^8$  Da (Hardingham y Bayliss, 1990; Alberts y col., 1994). La formación de estos agregados es muy importante desde el punto de vista fisiológico, ya que asegura la retención del agregán y por ende de agua, dentro de la MEC del cartílago (Maroudas y col., 1998).

El recambio de la MEC del cartílago está regulado por una serie de factores como son la distribución de la carga mecánica y el efecto de citoquinas, tales como interleuquina y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , que son producidos por sinoviocitos y condrocitos. Estos factores estimulan en estas células la síntesis y activación de enzimas denominadas metaloproteinasas (MMPs) que degradan los componentes de la matriz extracelular del cartílago (Yoshihara y col., 2000). La hidrólisis de la proteína central en sitios específicos por acción de las MMPs, provoca la liberación de grandes fragmentos de proteoglicanos que difunden fuera del tejido hacia la cavidad sinovial (Hardingham y Bayliss, 1990; Todhunter, 1996).

Existen trabajos cuyo objetivo ha sido relacionar la concentración de GAGs totales y de queratán sulfato del líquido sinovial con el daño del cartílago en las patologías articulares (Todhunter y col., 1997; Okumura y Fujinaga, 1998). Se ha medido la concentración de queratán sulfato debido a que representa mejor a los componentes propios de la matriz extracelular del cartílago (Todhunter y col., 1997).

En otros trabajos con articulaciones normales de equinos, no se ha encontrado una correlación significativa entre las concentraciones de GAGs totales y de queratán sulfato del líquido sinovial con la edad (Fuller y col., 1996). Se ha descrito que a mayor edad, disminuye el número de

condrocitos (Adams y Horton, 1998) y aparece una población heterogénea de proteoglicanos unidos al ácido hialurónico (Maroudas y col., 1998). En el cartílago articular humano se ha observado que el envejecimiento provoca la disminución, tanto del tamaño como del número de las cadenas de condroitín sulfato, mientras que la proteína central también presenta un menor tamaño, lo que se traduce en una disminución del peso molecular del proteoglicano (Hardingham y Bayliss, 1990; Maroudas y col., 1998).

Por otro lado, existen antecedentes del efecto condroprotector de los esteroides sexuales y de su acción sobre el desarrollo de los cartílagos y la formación de los huesos (Räsänen y Messner, 1999). Se ha demostrado que la castración de ratones provoca la degradación acelerada del cartílago articular, efecto que se revierte por la administración de andrógenos a niveles fisiológicos. También se ha observado, *in vitro*, que las hormonas sexuales reducen la pérdida espontánea de proteoglicanos, pero no interfieren con los efectos de interleuquina – 1 (IL- 1) en cultivos de cartílago (Da Silva y col., 1993). Se describe que el mecanismo de acción de las hormonas sexuales sobre los cartílagos se debería a la combinación de efectos directos e indirectos. El efecto directo se relacionaría con la detección de receptores para 17- $\beta$  estradiol en el cartílago de diferentes especies animales (Sylvia y col., 1998, Räsänen y Messner, 1999), mientras que el efecto indirecto se debería a que las hormonas sexuales regulan la secreción de la hormona de crecimiento y del factor de crecimiento tipo insulínico tipo I (IGF-I) (Nasatzky y col., 1993).

En este trabajo se plantea medir la concentración de GAGs distintos del ácido hialurónico (condroitín y queratán sulfato) del líquido sinovial de la articulación metacarpo-falángica equina normal como una forma de evaluar la pérdida de componentes de la MEC del cartílago a través de la edad y considerando caballos castrados y yeguas.

## MATERIAL Y METODOS

Se seleccionaron 78 articulaciones metacarpo-falángicas de igual número de

equinos mestizos de un matadero de la región Metropolitana (Comuna de La Pintana), cuyas edades se determinaron por cronometría dentaria. Para realizar este trabajo se escogieron los siguientes grupos etarios indicándose el número de caballos castrados y de yeguas:

### CUADRO 1. Distribución de los animales según edad y sexo.

Animal distribution by age and sex.

Grupo Etario	N° de Machos Castrados	N° de Yeguas
1.5 - 2 años	11	12
4 - 5 años	6	9
6 - 8 años	10	13
> 10 años	5	12

El criterio utilizado para escoger estos grupos etarios fue el de establecer un paralelo con edades importantes en los caballos fina sangre de carrera. Así, el primer grupo representa el inicio de la actividad deportiva; el segundo, corresponde al término de la madurez fisiológica del sistema músculo–esquelético; el tercero, el retiro de la actividad deportiva, mientras que el cuarto grupo tiene por finalidad evaluar lo que sucede en etapas más avanzadas. Debido al escaso número de machos enteros encontrados en matadero, se descartó su utilización en este trabajo.

De cada articulación se obtuvo líquido sinovial mediante artrocentesis utilizando material estéril y luego se realizó la disección con la finalidad de seleccionar las articulaciones. Se clasificaron como normales aquellas articulaciones cuyo cartílago era de color blanco nacarado, con su superficie lisa y brillante, sin líneas de roce o zonas de erosión. Además, la membrana sinovial no debía presentar signos de congestión, mientras que el líquido sinovial debía ser de color amarillo claro, transparente, sin flóculos ni trazas de material sanguinolento, descartándose los líquidos sinoviales con alguna alteración visible.

El líquido sinovial obtenido se mantuvo en hielo y luego se realizó su procesamiento en el laboratorio, para lo cual, se centrifugó a 950 x g durante 20 minutos a 4 °C. Con los sobrenadantes obtenidos se realizaron las siguientes pruebas, destinadas a evaluar la normalidad del líquido sinovial: la prueba del coágulo de mucina que es cualitativa (Van Pelt, 1974; Croxatto, 1993) y la determinación de la concentración de proteínas (Lowry y col., 1951). Se consideraron normales aquellos líquidos sinoviales con un mayor grado de compactación del coágulo de mucina y con una concentración de proteínas inferior a 15 mg/ml (Croxatto, 1993; Plaza de los Reyes, 1997). Finalmente, los sobrenadantes se conservaron congelados a -20°C hasta las determinaciones de GAGs.

La medición de GAGs totales (GAGsT) y de GAGs distintos del ácido hialurónico (GAGsS) se realizó por el método colorimétrico de Bartold y Page (1985), modificado por Croxatto (1993). La curva estándar se realizó utilizando soluciones de condroitín sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico al 0.1%, determinándose la absorbancia a 678 nm. La determinación se realizó en triplicado, aplicando 20 µl de líquido sinovial diluido 1:10 en superficies similares (5 cm<sup>2</sup>) de membranas de acetato de celulosa (Sephore III, Gelman). Después de secar a temperatura ambiente, se incubó durante 30 minutos en solución colorante de Alcian Blue que contiene MgCl<sub>2</sub> 0.05 M para la determinación de GAGsT y de 0.3 M para la determinación de GAGsS. En esta última condición se impide la tinción del ácido hialurónico, pero se conserva la afinidad de Alcian Blue por condroitín y queratán sulfato. Después se eliminó el exceso de colorante de la membrana no fijado a los GAGs y, finalmente, se separaron los trozos de membrana correspondientes a cada muestra, que fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) para liberar el complejo GAG - cromóforo. Como blanco se utilizó el mismo procedimiento con una porción de membrana de igual superficie, pero sin muestra. Una vez disuelta la membrana se determinó su absorbancia a 678 nm, expresándose los resultados como mg de GAGsT

o de GAGsS/ ml de líquido sinovial. Para determinar las concentraciones de GAGs, se utilizó una curva estándar en un rango de concentraciones de 5 a 15 µg de condroitín y queratán sulfato.

Finalmente se realizó la estimación del contenido de ácido hialurónico al calcular la diferencia entre GAGsT y GAGsS. Los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar, realizando un análisis estadístico que utilizó un experimento factorial de 4 x 2 usando un p < 0.05, para determinar la influencia de los factores edad y sexo sobre las variables en estudio. El modelo estadístico fue el siguiente (Snedecor, 1964):

$$X_{ijk} = \mu + E_i + S_j + (ES)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

- $\mu$  = media poblacional
- $E_i$  = efecto edad
- $S_j$  = efecto sexo
- $(ES)_{ij}$  = interacción de los efectos sexo y edad
- $\epsilon_{ijk}$  = error aleatorio

## RESULTADOS

El contenido de GAGsT del líquido sinovial (cuadro 2) corresponde a los GAGs liberados desde la MEC del cartílago articular y al ácido hialurónico sintetizado por los sinoviocitos de la membrana sinovial, que constituye a su vez, el componente cuantitativamente más importante entre los diferentes GAGs del líquido sinovial. No se detectaron diferencias (p > 0.05) entre caballos castrados y yeguas en cada grupo de edad. Sin embargo, al analizar sólo el factor edad, se encontró una disminución en el grupo de mayor edad (1.71 ± 0.79 mg/ml), que fue menor (p < 0.05) comparada con el grupo de 6 a 8 años de edad (3.39 ± 1.93 mg/ml), que presenta la mayor concentración de GAGsT.

Respecto a los GAGsS (cuadro 3), que corresponden básicamente a condroitín sulfato y queratán sulfato, no se encontraron diferencias (p > 0.05) entre caballos castrados y yeguas en cada grupo de edad. Sin embargo, al comparar el promedio final de caballos castrados (0.48 ± 0.28 mg/ml) y de yeguas (0.34 ± 0.15 mg/ml),

**CUADRO 2. Concentración de GAGs totales del líquido sinovial (mg/ml) de la articulación metacarpofalángica equina normal.**

Synovial fluid total GAGs concentration (mg/ml) in normal equine metacarpophalangeal joint.

Edad	Caballos castrados	Yeguas	Promedio por edad
1,5 – 2 años	2.75 ± 1.41	2.44 ± 1.12	2.59 ± 1.25
4 – 5 años	2.67 ± 0.70	3.18 ± 1.16	2.98 ± 1.00
6 – 8 años	4.00 ± 2.55	2.92 ± 1.17	3.39 ± 1.93 (a)
> 10 años	1.31 ± 0.81	1.88 ± 0.74	1.71 ± 0.79 (b)
<b>Promedio por sexo</b>	2.90 ± 1.88	2.58 ± 1.14	

(a) y (b) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).**CUADRO 3. Concentración de GAGs distintos del ácido hialurónico del líquido sinovial (mg/ml) de la articulación metacarpofalángica equina normal**

Synovial fluid GAGs concentration different from hyaluronic acid (mg/ml) in normal equine metacarpophalangeal joint.

Edad	Caballos castrados	Yeguas	Promedio por edad
1,5 – 2 años	0.56 ± 0.38	0.41 ± 0.21	0.48 ± 0.31
4 – 5 años	0.45 ± 0.05	0.34 ± 0.11	0.38 ± 0.10
6 – 8 años	0.49 ± 0.29	0.33 ± 0.10	0.40 ± 0.21
> 10 años	0.35 ± 0.16	0.26 ± 0.12	0.29 ± 0.13
<b>Promedio por sexo</b>	0.48 ± 0.28 (a)	0.34 ± 0.15 (b)	

(a) y (b) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

se encontró una diferencia ( $p < 0.05$ ), que se podría relacionar con una mayor actividad catabólica de la MEC del cartílago articular en los caballos castrados. Además, al considerar el factor edad, se encontró una tendencia a la disminución de estos GAGs en el líquido sinovial

del grupo de mayor edad, lo que se podría asociar a una menor velocidad de recambio molecular de la MEC del cartílago articular.

Finalmente, en el cuadro 4 se muestra la estimación del contenido de ácido hialurónico del líquido sinovial:

**CUADRO 4. Estimación de la concentración de ácido hialurónico del líquido sinovial (mg/ml) de la articulación metacarpofalángica equina normal.**

Valuation of synovial fluid hyaluronic acid concentration (mg/ml) in normal equine metacarpophalangeal joint.

Edad	Caballos castrados	Yeguas	Promedio por edad
1,5 – 2 años	2.19 ± 1.14	2.03 ± 0.98	2.11 ± 1.04
4 – 5 años	2.23 ± 0.73	2.85 ± 1.21	2.60 ± 1.06
6 – 8 años	3.51 ± 2.33	2.59 ± 1.19	2.99 ± 1.79 (a)
> 10 años	0.96 ± 0.64	1.62 ± 0.76	1.43 ± 0.77 (b)
<b>Promedio por sexo</b>	2.42 ± 1.70	2.24 ± 1.11	

(a) y (b) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

El contenido de ácido hialurónico mostró una tendencia similar a la concentración de GAGs totales, no detectándose diferencias entre caballos castrados y yeguas en cada grupo de edad ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, al comparar el promedio por edad se encontró una diferencia ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de mayor edad, con una disminución de la concentración de ácido hialurónico en el grupo mayor de 10 años.

## DISCUSION

La mayor parte de los trabajos que relacionan la detección de moléculas de la MEC del cartílago articular, ya sea en el líquido sinovial, en el plasma sanguíneo o en la orina, tienen como objetivo la caracterización de la patología articular. En este trabajo se ha planteado caracterizar la pérdida de estos componentes en articulaciones metacarpofalángicas normales a través de la edad e incluyendo las diferencias entre caballos castrados y yeguas, dados los antecedentes de la participación de las hormonas sexuales sobre el metabolismo del cartílago (Bai y col., 1976; Thonar y col., 1985; Da Silva y col., 1993; Nasatzky y col., 1993; Da Silva y Willoughby, 1994).

El contenido de GAGsT del líquido sinovial, constituido básicamente por condroitín sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico, fue similar para caballos castrados y yeguas. Sin embargo, se encontró una disminución ( $p < 0.05$ ) en el grupo de mayor edad comparada con el grupo de 6 a 8 años. Además, al comparar el perfil de GAGsT con el de ácido hialurónico, se aprecia que son muy semejantes, debido a la importante contribución del contenido de ácido hialurónico sobre la concentración de GAGs totales. Se desprende de esta comparación que el contenido de GAGsT y de ácido hialurónico es menor en el grupo de mayor edad, lo que podría relacionar el aumento de la edad con una menor capacidad para sintetizar ácido hialurónico por los sinoviocitos de la membrana sinovial, o bien, a una mayor actividad de enzimas hialuronidasas, que son fenómenos descritos en procesos patológicos (Tulamo y col., 1996), lo que podría predisponer finalmente a un mayor daño del cartílago articular.

Con respecto a los GAGsS, que corresponden principalmente a moléculas propias de la MEC del cartílago y cuyo contenido en el líquido sinovial puede reflejar el recambio molecular de esta matriz, no se encontraron diferencias por edad. Sin embargo, se encontró diferencia ( $p < 0.05$ ) entre caballos castrados y yeguas, que se podría relacionar con el mayor catabolismo de la MEC del cartílago articular asociado a la castración y a la consiguiente ausencia de esteroides sexuales. Este resultado es coincidente con lo descrito por Da Silva y col. (1993), que indica que la castración de ratones aumenta la velocidad de degradación del cartílago articular. También se ha demostrado, que en los conejos castrados disminuye la síntesis de las enzimas involucradas en la síntesis de GAGs y que la administración de testosterona produce un incremento de la actividad de esas enzimas. Por el contrario, las enzimas involucradas en la degradación de GAGs como son catépsina y hialuronidasa se incrementan en los conejos castrados y se disminuyen con la administración de testosterona (Bai y col., 1976). Además, se ha descrito el efecto condroprotector de los esteroides sexuales en las hembras. Así, en cultivos de condrocitos de ratón la administración de  $17\text{-}\beta$  estradiol estimula la diferenciación de condrocitos (Nasatzky y col., 1993). Por otro lado, existen antecedentes de que la artritis aumenta su incidencia en mujeres en el período de la menopausia, cuando disminuyen los niveles de estrógenos (Da Silva y Willoughby, 1994).

En los caballos castrados, así como en las yeguas, se encontró una tendencia a la disminución de los GAGsS en los grupos de mayor edad, lo que se podría asociar con una menor velocidad de degradación de la matriz extracelular del cartílago articular a través de la edad y, por ende, con una menor liberación de estos componentes hacia el líquido sinovial (Platt, 1996; Todhunter, 1996; Brama y col., 1998) o bien, con una síntesis de moléculas de proteoglicanos de menor peso molecular en los individuos de mayor edad (Hadingham y Bayliss, 1990; Maroudas y col., 1998).

Con el objetivo de caracterizar el recambio de la MEC del cartílago, se han realizado otros estudios que han utilizado anticuerpos

monoclonales para detectar la concentración de queratán sulfato en el líquido sinovial y en el plasma sanguíneo, encontrándose valores de 0.02 mg/ml (20.6 µg/ml) en el líquido sinovial (Fuller y col., 1996) y de 200 ng/ml (0.2 µg/ml) en el plasma sanguíneo de equinos clínicamente normales (Todhunter y col., 1997). En este último caso, se observó que las concentraciones plasmáticas de queratán sulfato eran más altas en cuadros de sinovitis y fractura en chip, mientras que en los casos de enfermedad degenerativa articular no se apreciaron diferencias con respecto a los equinos normales, a pesar de que se ha sugerido por Thonar y col., (1985) la posible utilidad de esta técnica para el diagnóstico de la enfermedad degenerativa articular generalizada. En estos trabajos se ha escogido la detección del contenido de queratán sulfato, debido a que sería un mejor marcador de la destrucción del cartilago articular ya que el condroitín sulfato se encuentra en otros tejidos además del cartilago, como es la cápsula articular (Todhunter y col., 1997). Sin embargo, dado que las concentraciones de queratán sulfato son muy bajas en los fluidos biológicos, se requiere de anticuerpos de mayor sensibilidad y especificidad para este GAG (Okumura y Fujinaga, 1998).

Se hace necesario comparar estos resultados con los de machos enteros para conocer mejor el efecto de los esteroides sexuales sobre este recambio. Los resultados apoyan la idea de evaluar todos los factores que están comprometidos en este proceso fisiológico, con el objetivo de que esta metodología pueda ser de utilidad en el futuro, para el diagnóstico y pronóstico de los procesos articulares.

## CONCLUSIONES

La concentración de GAGsT y por ende de ácido hialurónico del líquido sinovial, es menor en los equinos mayores de 10 años, tanto en caballos castrados como en yeguas.

## RESUMEN

Se midió la concentración de glicosaminoglicanos (GAGs) del líquido sinovial en su valor

total (GAGsT) y de una fracción de éstos, que corresponde a los GAGs diferentes del ácido hialurónico o GAGs sulfatados (GAGsS), entre los que se describen condroitín sulfato y queratán sulfato. Las muestras de líquido sinovial se obtuvieron por artrocentesis aséptica desde articulaciones metacarpofalángicas normales de equinos mestizos en matadero, después del beneficio de los animales. El examen *post mortem* de las articulaciones permitió descartar articulaciones con evidencias de osteoartritis u otras patologías articulares. La normalidad del líquido sinovial se evaluó por de su aspecto y por las pruebas del coágulo de mucina y de concentración de proteínas (<15mg/ml). Se escogieron 4 grupos de edad que se dividieron a su vez, en yeguas (y.) y caballos castrados (c.c.), de la siguiente forma: 1,5 – 2 años (n = 23: 12 y. y 11 c.c.); 4 – 5 años (n = 15: 9 y. y 6 c.c.); 6 – 8 años (n = 23: 13 y. y 10 c.c.) y sobre 10 años de edad (n = 17: 12 y. y 5 c.c.). Para cuantificar los GAGs se utilizó un método colorimétrico con Alcian Blue usando diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>.

Al comparar la concentración de GAGsT entre yeguas y caballos castrados, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, al analizar el promedio del grupo mayor de 10 años de ambos sexos (1.71 ± 0.79 mg/ml), éste fue inferior (p < 0.05) con respecto al grupo de 6 a 8 años (3.39 ± 1.93 mg/ml). El contenido de GAGsS, que refleja la actividad catabólica de la MEC del cartilago, no mostró diferencias entre yeguas y caballos castrados en cada grupo de edad. Sin embargo, el promedio de estos GAGsS fue mayor (p < 0.05) en los caballos castrados (0.48 ± 0.28 mg/ml) que en las yeguas (0.34 ± 0.15 mg/ml) y tienden a disminuir a través de la edad en ambos grupos. La diferencia entre los GAGsT y los GAGsS, permitió estimar el contenido de ácido hialurónico del líquido sinovial, cuyo perfil fue semejante al de los GAGsT. Su concentración fue menor en el grupo de mayor edad de yeguas (1.62 ± 0.76 mg/ml) y de caballos castrados (0.96 ± 0.64 mg/ml).

Estos resultados apoyan la influencia de la edad y de la condición de sexo sobre la

concentración de GAGs en el líquido sinovial, lo que podría reflejar la condición metabólica de los componentes articulares y que podría ser útil para la comparación con las patologías articulares.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, C. S., W. E. HORTON. 1998. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat. Rec.* 250: 418 - 425
- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J. D. WATSON. 1994. Cell junctions, cell adhesion, and extracellular matrix. In: *Molecular Biology of the Cell*. 3<sup>a</sup> ed. Garland Publishing. New York, USA.
- BAI, L. S., P. A. KURUP. 1976. Sex hormones and metabolism of glycosaminoglycans, I. Effect of orchidectomy and administration of testosterone in rabbits. *Clin. Exp. Metabol.* 25: 1535 - 1543
- BARTOLD, P. M., R. C. PAGE. 1985. A microdetermination method for assaying glycosaminoglycans and proteoglycans. *Anal. Biochem.* 150: 320-324
- BAYLISS, M. T., D. OSBORNE, S. WOODHOUSE, C. DAVIDSON. 1999. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. *J. Biol. Chem.* 274: 15892-15900.
- BRAMA, P. A., J. M. TEKOPPELE, B. BEEKMAN, P. R. VAN WEEREN, A. BARNEVELD. 1998. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis and osteoarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 57: 697-699.
- CROXATTO, A. 1993. Determinación de glicosaminoglicanos en líquido sinovial normal y osteoartrotico de articulación metacarpo-falángica equina. Memoria de Título, M.V. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago, Chile.
- DA SILVA, J. A., J. P. LARBRE, T. D. SPECTOR, L. A. PERRY, D. L. SCOTT, D. A. WILLOUGHBY. 1993. Protective effects of androgens against inflammation induced cartilage degradation in male rodents. *Ann. Rheum. Dis.* 52: 285-291.
- DA SILVA, J. A., D. A. WILLOUGHBY. 1994. The influence of sex in arthritis: is cartilage an overlooked factor? *J. Rheumatol.* 21: 791-796.
- FULLER, C. J., A. R. BARR, P. A. DIEPPE, M. SHARIF. 1996. Variation of an epitope of keratan sulphate and total glycosaminoglycans in normal equine joints. *Equine Vet. J.* 28: 490-493
- HARDINGHAM, T. E., M. BAYLISS. 1990. Proteoglycans of articular cartilage: Changes in aging and in joint disease. *Sem. Arth. Rheum.* 20 Suppl. 1: 12-33.
- HEDLUND, H., E. HEDBOM, D. HEINEGARD, S. MENGARELLI-WIDHOLM, F. P. REINHOLT, O. SVENSSON. 1999. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.* 274: 5777-5781.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MCILWRAITH, C. W. 1996. General pathobiology of the joint and response to injure. In McIlwraith, C.W., G.W. Trotter. *Joint disease in the horse*. W.B. Saunders. Philadelphia, USA.
- MAROUDAS, A., M. T. BAYLISS, N. UCHITEL-KAUSHANSKY, R. SCHNEIDERMAN, E. GILAV. 1998. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch. Biochem. Biophys.* 350: 61-71.
- NASATZKY, E., Z. SCHWARTZ, B. D. BOYAN, S. SOKOLNE, W. A., A. ORNOY. 1993. Sex-dependent effects of 17 -  $\beta$  - estradiol on chondrocyte differentiation in culture. *J. Cel. Physiol.* 154: 359-367.
- OKUMURA, M., T. FUJINAGA. 1998. Establishment of monoclonal antibody (1/14/16H9) for detection of equine keratan sulfate. *Am. J. Vet. Res.* 59: 1203-1208.
- PALMER, J. L., A. L. BERTONE. 1994. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in sinovitis and equine joint disease. *Equine Vet. J.* 26: 263-277.
- PLATT, D., M. T. 1996. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In: MCILWRAITH, C. W., G. W. TROTTER. *Joint disease in the horse*. W.B. Saunders. Philadelphia, USA.
- PLAZA DE LOS REYES, J. 1997. Determinación de glicosaminoglicanos en líquido sinovial normal de la articulación metacarpo-falángica equina normal en diferentes edades. Memoria de Título, M.V. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago, Chile.
- RÄSÄNEN, T., K. MESSNER. 1999. Articular cartilage compressive stiffness following oophorectomy or treatment with 17  $\beta$ -estradiol in

- young postpubertal rabbits. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 78: 357-362.
- ROUGHLEY, P. J., E. R. LEE. 1994. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc. Res. Tech.* 28: 385-397.
- SNEDECOR, G. W. 1964. Métodos Estadísticos. Compañía Editorial Continental, S.A. México DF, México. 627 p.
- SYLVIA, V. L., T. HUGHES, D. D. DEAN, B. D. BOYAN, Z. SCHWARTZ. 1998. 17  $\beta$ -estradiol regulation of protein kinase C activity in chondrocytes is sex -dependent ad involves nongenomic mechanism. *J. Cell Physiol.* 176: 435-444.
- THONAR, E.J., M. E. LENZ, G. K. KLINTWORTH, B. CATERSON, L. M. PACHMAN, P. GLICKMAN, J. KAT HUFF, K. E. KUETTNER. 1985. Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum.* 28: 1367-1376.
- TODHUNTER, R. J. 1996. Anatomy and phisiology of synovial joints. In: MCILWRAITH, C. W., G.W. TROTTER. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA.
- TODHUNTER, R. J., S. L. FUBINI, K. P. FREEMAN, G. LUST. 1997. Concentrations of keratan sulfate in plasma and synovial fluid from clinically normal horses and horses with joint disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 369-374.
- TULAMO, R., J. HOUTTU, A. TUPAMÄKI, M. SALONEN. 1996. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid fromo horses with vaious arthritides. *Am. J. Vet. Res.* 57: 932-937.
- VAN PELT, R. W. 1974. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165: 91-95.
- YOSHIHARA, Y., H. NAKAMURA, K. OBATA, H. YAMADA, T. HAYAKAWA, K. FUJIKAWA, Y. OKADA. 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis or osteo- arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59: 455-461.

