

Detección de glicosaminoglicanos de la matriz del cartílago articular en el líquido sinovial de carpo equino con fractura en esquirra[#]

Detection of glycosaminoglycans of the articular cartilage matrix in the synovial fluid of equine carpal joint with chip fracture[#]

H Adarmes*, F Vásquez, M Galleguillos, E González

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

SUMMARY

The purpose of this study was to establish if the duration of chip fracture in equine carpal joint of purebred horses, affects the synovial concentration of total glycosaminoglycans (GAGsT) and glycosaminoglycans that are different from hyaluronic acid or sulfated GAGs (GAGsS). Two groups of horses with different duration of fracture period were analyzed: one group (group I) with a period of less than 30 days from carpal fracture diagnosis to arthrocentesis (n=14), and another group (group II) with a period similar or longer than 60 days (n=14). Normal synovial fluid was collected from healthy carpal joints of crossbred horses immediately after slaughter (n=14), without any major damage at *post mortem* examination. The synovial fluid concentration of protein and GAGs was determined spectrophotometrically. Protein concentration showed a significant increase ($P < 0.05$) in both fracture samples (18.19 ± 4.2 g/L (group I) and 18.28 ± 3.5 g/L (group II)) with respect to the control group (9.05 ± 5.1 g/L). GAGsT concentration significantly increased ($P < 0.05$) in the control group (1.5 ± 0.52 g/L) with respect to both fracture groups (1.07 ± 0.29 g/L (group I) and 1.17 ± 0.35 g/L (group II)). The synovial fluid GAGsS showed no significant difference ($P > 0.05$) between control group (0.19 ± 0.12 g/L) and both fracture groups (0.15 ± 0.09 g/L (group I) and 0.17 ± 0.17 g/L (group II)). The concentration of hyaluronic acid, obtained by the difference between GAGsT and GAGsS, showed a significant increase ($P < 0.05$) in the control group (1.31 ± 0.51 g/L) with respect to both fracture groups (0.92 ± 0.30 g/L (group I) and 0.90 ± 0.40 g/L (group II)). The absence of significant differences for GAGsT, GAGsS and hyaluronic acid concentrations between both fracture groups, could be related to the dilution effect caused by the inflammation, the appearance of compensatory mechanisms, or restrictions due to the use of an *in vivo* articular model.

Palabras clave: fractura, esquirra, glicosaminoglicanos, cartílago articular.

Key words: chip fracture, glycosaminoglycans, articular cartilage.

INTRODUCCION

La fractura en esquirra del carpo es una patología frecuente e inhabilitante en los equinos de competencia, constituyendo la mayor causa de invalidez y retiro de ejemplares desde las pistas de carrera. Entre los componentes articulares afectados se encuentra el cartílago articular, formado por una abundante matriz extracelular (MEC) de colágeno tipo II y de proteoglicanos (Todhunter 1996). Los proteoglicanos son responsables de gran parte de las propiedades fisicoquímicas del tejido (Bayliss y col 1999), en especial el agregán que es el más abundante (aproximadamente 90 %) y el de mayor tamaño (3×10^6 Da) (Alberts y col 1994, Hedlund y col 1999). El agregán en el cartílago adulto está formado por una proteína central a la que se unen covalentemente los glicosaminoglicanos (GAGs): condroitín -6 -sulfato y queratán sulfato que son moléculas polianiónicas, cuya repulsión y capacidad para retener agua proporciona al cartílago su propiedad de amortiguar los impactos (McIlwraith 1996).

En la MEC del cartílago articular, el agregán forma estructuras macromoleculares a través de la unión no covalente de hasta 100 unidades de agregán a una cadena de ácido hialurónico (Alberts y col 1994, Tulamo y col 1996), que aseguran la retención del agregán y por tanto, la de agua dentro de la MEC del cartílago (Maroudas y col 1998).

El incremento de la actividad de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y de agreganasas provoca la pérdida de moléculas de agregán y de colágeno tipo II, característico del proceso artrítico, afectando inicialmente la superficie articular para luego progresar hacia zonas más profundas del cartílago (Nagase y Kashiwagi 2003). Por esto, se han desarrollado trabajos en equino cuyo objetivo ha sido detectar biomarcadores que relacionen la concentración de GAGs totales, queratán sulfato, hidroxiprolina o la actividad de MMPs del líquido sinovial con el daño del cartílago en el proceso osteoartrítico (Todhunter y col 1997, McIlwraith 2005, Van den Boom y col 2005). Se ha establecido una relación entre la severidad del daño del cartílago articular con la actividad de las MMPs y con el contenido de hidroxiprolina en el líquido sinovial, aunque dicha relación ha sido contradictoria para el caso de los GAGs (Fuller y col 2001, Van den Boom y col 2005).

Aceptado: 28.06.2007.

Proyecto DTI - A - 3135/1992.

* Casilla 2 correo 15, Santiago, Chile; hadarmes@uchile.cl

El objetivo de este trabajo fue evaluar la progresión del daño de la MEC del cartílago articular en un proceso de naturaleza inflamatoria, a través de la concentración de GAGs distintos del ácido hialurónico (GAGsS) en el líquido sinovial de carpo, considerando dos períodos diferentes desde el diagnóstico de fractura en esquirola hasta la artroscopía. La presencia del trozo osteocondral en la articulación generaría un daño mecánico que provocaría la persistencia del proceso inflamatorio y de la actividad de metaloproteinasas, efecto que se podría amplificar si el ejemplar es sometido a trauma físico. Como hipótesis de trabajo se planteó la relación directa entre el incremento de GAGsS del líquido sinovial y la persistencia de la fractura en esquirola, lo que demostraría la necesidad de dar reposo a los ejemplares afectados y de realizar a la brevedad la artroscopía con el fin de eliminar el trozo osteocondral.

MATERIAL Y METODOS

Selección de los equinos. Se utilizaron equinos Fina Sangre de Carrera en competencia, entre dos y cinco años de edad, con fractura en esquirola diagnosticada clínica y radiográficamente en la Clínica del Hipódromo Chile de Santiago y sin tratamientos según sus fichas clínicas, lo que no anula la posibilidad de que hayan recibido medicamentos antiinflamatorios durante este proceso. Se dividieron en dos grupos de 14 animales cada uno, de acuerdo al tiempo transcurrido desde el diagnóstico de fractura en esquirola hasta la artroscopía. Así, el grupo I correspondió a un período menor o igual a un mes, mientras que el grupo II correspondió a un período de tiempo igual o mayor a los dos meses desde el diagnóstico de la lesión. Además, se seleccionaron como control equinos mestizos, entre dos y cuatro años de edad ($n = 14$) establecida por cronometría dentaria (Richardson 1997), provenientes de un matadero de la Región Metropolitana.

Obtención de líquido sinovial. La obtención de líquido sinovial se realizó mediante artrocéntesis aséptica inmediatamente antes de la artroscopía, desde la articulación carpal. En el caso de los equinos mestizos también se realizaron artrocéntesis aséptica luego del sacrificio de los animales, pero ante la imposibilidad de realizar análisis radiográfico, la normalidad de la articulación se estableció al examen visual considerando la ausencia de lesiones en el cartílago articular y en la membrana sinovial y el aspecto del líquido sinovial que debía ser amarillo claro, viscoso y sin trazas de sangre de acuerdo a lo descrito por Adarmes y col (2003).

Análisis de líquido sinovial. Las muestras de líquido sinovial fueron centrifugadas a $2000 \times g$ durante 5 minutos, siendo los sobrenadantes conservados a -20°C hasta su utilización. Se determinó la concentración de proteínas del líquido sinovial diluido 1:8, mediante la técnica colorimétrica de Lowry y col (1951) y utilizando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar.

Para la medición de GAGs totales (GAGsT) y de GAGs distintos del ácido hialurónico (GAGsS) se empleó el método colorimétrico de Bartold y Page (1985), utilizando como estándar soluciones de condroitín sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico al 0,1 %. Los GAGsT representan a los GAGs liberados desde la MEC del cartílago articular (GAGsS) junto al ácido hialurónico sintetizado por los sinoviocitos de la membrana sinovial. Finalmente, se realizó la estimación del contenido de ácido hialurónico al calcular la diferencia entre GAGsT y GAGsS.

Análisis estadístico. El estudio de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía para establecer diferencias entre los grupos y una prueba de Tukey para identificar los grupos homogéneos con un programa STATISTICA versión 2000 para Windows (StatSoft Inc, USA). Los resultados se expresaron como la media (g/L) \pm la desviación estándar (Zar 1996).

RESULTADOS Y DISCUSION

El modelo articular utilizado en trabajos anteriores (Adarmes y col 2003, 2006) ha sido la articulación metacarpofalángica de equinos mestizos de matadero, cuya selección se ha basado en el análisis visual *post mortem*. En dicho modelo, para el caso de las articulaciones patológicas, se han seleccionado aquellas con lesiones crónicas en el cartílago articular, pero sin signos inflamatorios, constituyendo un modelo distinto al de este estudio, fundamentalmente de tipo inflamatorio. El modelo articular de matadero tiene el defecto de carecer de antecedentes anamnésicos de los animales y de la posibilidad práctica para realizar análisis radiográfico, lo que se evitó en este trabajo con el diagnóstico clínico radiográfico de equinos Fina Sangre de Carrera del Hipódromo Chile con fractura en esquirola. Sin embargo, no fue posible obtener líquido sinovial de articulaciones de carpo normal, debido a la natural oposición de los preparadores para efectuar la artrocéntesis y por ello se decidió utilizar los equinos de matadero como control.

Con el fin de caracterizar el proceso articular se determinó la concentración de proteínas totales, encontrándose que fue similar en ambos grupos con fractura ($18,19 \pm 4,2$ g/L y $18,28 \pm 3,5$ g/L para los grupos I y II respectivamente), pero significativamente mayor ($P < 0,05$) con respecto al grupo mestizo utilizado como control ($9,05 \pm 5,1$ g/L) (cuadro 1), indicando la existencia de un proceso inflamatorio al momento de la artroscopía y la posibilidad de un derrame sanguinolento hacia la cavidad articular.

Para evaluar el daño del cartílago articular se midió la concentración de GAGsT y una fracción de éstos que corresponde a los GAGsS, representativos de los procesos catabólicos del cartílago. Los GAGsT no mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) con valores de $1,07 \pm 0,29$ g/L y de $1,07 \pm 0,35$ g/L para los grupos I y II respectivamente, mientras que en el grupo control fue de $1,50 \pm 0,52$ g/L.

(cuadro 1). Por otro lado, el contenido de GAGsS del líquido sinovial fue de $0,15 \pm 0,09$ g/L y de $0,17 \pm 0,17$ g/L que representan el 14,01 y el 15,88% de los GAGsT para los grupos I y II respectivamente, mientras que en el grupo control fue de $0,19 \pm 0,12$ g/L que representa el 12,66% de los GAGsT (cuadro 1). No se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre estos grupos.

En base a la diferencia de GAGsT y de GAGsS se estimó el contenido de ácido hialurónico, encontrándose valores de $0,92 \pm 0,3$ g/L y de $0,90 \pm 0,4$ g/L que representan el 85,98 y el 84,11% de los GAGs T para los grupos I y II respectivamente, mientras que en el grupo control fue de $1,28 \pm 0,53$ g/L que representa el 87,33% de los GAGs T (cuadro 1). Se detectaron diferencias significativas para el contenido de ácido hialurónico entre el grupo control y ambos grupos con fractura ($P < 0,05$). El ácido hialurónico constituye el GAG cuantitativamente más importante del líquido sinovial, lo que permite explicar la diferencia significativa para los GAGsT entre ambos grupos con fractura y el grupo control. La disminución de los GAGsT y del ácido hialurónico en ambos grupos con fractura se podría asociar con el posible efecto de la dilución provocado por la inflamación, cuya consecuencia sería la mayor predisposición al daño articular.

De acuerdo a la hipótesis planteada, se esperaba que el mayor daño mecánico producido en el grupo II, debido a la persistencia de la esquirola en la cavidad articular y al ejercicio efectuado por estos equinos, provocaría un incremento significativo de la concentración de GAGsS debido a la mayor degradación de los proteoglicanos del cartilago articular, producto del incremento de citoquinas proinflamatorias, como son la interleuquina - 1 (IL-1) (Morris y Treadwell 1994) y el factor de necrosis tumoral - α (TNF - α) (Billinghurst y col 1995) que se relacionan

con procesos catabólicos asociados a la mayor actividad de MMPs (Brama y col 1998, Clegg y Carter 1999, Trumble y col 2001) y de agreganasas (ADAMTS 4 y 5) (Moulharat y col 2004) y también con el incremento de especies reactivas del oxígeno en el líquido sinovial (Dimock y col 2000). Sin embargo, para los GAGsS no se encontró diferencia significativa ($P > 0,05$) entre los grupos analizados, observándose incluso una tendencia a disminuir en ambos grupos con fractura con respecto al grupo control de matadero. Este resultado se podría explicar por la dilución provocada por el cuadro inflamatorio, lo que es contradictorio con el aumento de la concentración de proteínas detectado en ambos grupos con fractura. También es posible que el incremento de GAGsS en el líquido sinovial producto de la degradación del cartilago, no sea suficiente como para presentar un comportamiento semejante al detectado en las proteínas y, por lo tanto, no sea detectable por nuestra técnica colorimétrica, menos sensible con respecto a aquellas que utilizan anticuerpos poli o monoclonales (McIlwraith 2005). Sin embargo, Fuller y col (2001) utilizando anticuerpos monoclonales para el epítipo 5D4 de queratán sulfato, evidenciaron una correlación negativa entre la articulación inflamada con respecto a la articulación contralateral normal. Tampoco Van den Boom y col (2005) y Adames y col (2006) usando técnicas colorimétricas detectaron alguna correlación entre la severidad del daño del cartilago y el incremento de GAGs. En otro estudio Adames y col (2003) con un método colorimétrico, demostraron un incremento significativo de los GAGsS en el líquido sinovial de caballos castrados con respecto a las yeguas, lo que permitiría afirmar que la metodología colorimétrica podría ser de utilidad en algunos casos. Además, se debe considerar que en el proceso inflamatorio podría aparecer un incremento compensatorio de moléculas inhibitoras de estas enzimas proteolíticas, describiéndose una familia de inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs), algunos de los cuales también inhibirían a las agreganasas (Kevorkian y col 2004), aunque para este último grupo de enzimas también se describe que la alfa-2-macroglobulina produciría una inhibición endógena (Tortorella y col 2004). Sin embargo, lo esperable es que en los procesos inflamatorios aparezca un desbalance en favor de la actividad degradativa de la MEC del cartilago.

La ausencia de diferencias entre ambos grupos con fractura también se podría asociar a los posibles tratamientos con medicamentos antiinflamatorios por parte de los preparadores. De acuerdo a nuestros resultados, es difícil proponer el uso de esta técnica colorimétrica para determinar GAGsS en cuadros articulares de naturaleza inflamatoria, en los que además no existe la certeza de la ausencia de tratamientos farmacológicos.

Además de los GAGs como marcadores bioquímicos del daño del cartilago, también se ha demostrado que los niveles de hidroxiprolina (Van den Boom y col 2005) y de colagenasa-1 (MMP-1) (Brama y col 2004) se incrementan

Cuadro 1. Concentración de proteínas (g/L), de GAGs totales (g/L), de GAGs distintos del ácido hialurónico (g/L) y de ácido hialurónico (g/L) del líquido sinovial de la articulación carpal equina.

Synovial fluid concentration of proteins (g/L), total GAGs (g/L), different GAGs of hyaluronic acid (g/L) and hyaluronic acid (g/L) in equine carpal joint.

Grupo	Proteínas (g/L)	GAGsT (g/L)	GAGsS (g/L)	Acido Hialurónico (g/L)
I	$18,19 \pm 4,2^a$	$1,07 \pm 0,29^a$	$0,15 \pm 0,09$	$0,92 \pm 0,30^a$
II	$18,28 \pm 3,5^a$	$1,07 \pm 0,35^a$	$0,17 \pm 0,17$	$0,90 \pm 0,40^a$
Control	$9,05 \pm 5,1^b$	$1,50 \pm 0,52^b$	$0,19 \pm 0,12$	$1,31 \pm 0,51^b$

a y b representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Grupo I : período menor o igual a un mes entre el diagnóstico y la artroscopía.

Grupo II : período mayor o igual a dos meses entre el diagnóstico y la artroscopía.

en los cuadros osteoarttríticos, lo que se podría asociar con el aumento de la concentración de grupos aldehído, en casos de daño articular leve, detectado por Adarmes y col (2006). En el líquido sinovial equino, también se ha analizado la concentración de la proteína oligomérica de matriz de cartílago, demostrándose su utilidad como biomarcador del daño del cartílago (Arai y col 2005).

Nuestros resultados permiten concluir que la ausencia de diferencias significativas de GAGsS en el líquido sinovial entre estos cuadros inflamatorios articulares y de ellos con el grupo control, puede asociarse a las dificultades propias del modelo *in vivo* utilizado y a la falta de sensibilidad del método espectrofotométrico para detectar las eventuales diferencias en el contenido de GAGs entre ambos grupos con fractura.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar si la duración de la fractura en esquirola de carpo en equinos Fina Sangre de Carrera afecta la concentración sinovial de glicosaminoglicanos totales (GAGsT) y de una fracción de éstos, que corresponde a los GAGs diferentes del ácido hialurónico o GAGs sulfatados (GAGsS). Se analizaron dos grupos de equinos con fractura en esquirola de distinta duración: uno con un período menor a los 30 días desde el diagnóstico hasta la artrocentesis (grupo I) (n = 14) y otro, con un período igual o mayor a los 60 días (grupo II) (n = 14), y como grupo control se obtuvo líquido sinovial de articulaciones de carpo sanas al examen visual *post mortem*, de equinos de matadero luego del sacrificio (n = 14). La concentración de proteínas, GAGsT y GAGsS en el líquido sinovial se realizó espectrofotométricamente. La concentración de proteínas fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en ambos grupos con fractura ($18,19 \pm 4,2$ g/L (I) y $18,28 \pm 3,5$ g/L (II)) con respecto al grupo control ($9,05 \pm 5,1$ g/L). La concentración de GAGsT fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en el grupo control ($1,50 \pm 0,52$ g/L) con respecto a las muestras con fractura ($1,07 \pm 0,29$ g/L (I) y $1,07 \pm 0,35$ g/L (II)). La concentración de GAGsS que representa los procesos catabólicos de la matriz extracelular del cartílago articular (MEC) no mostró diferencias significativas, con valores de $0,19 \pm 0,12$ g/L en el grupo control y de $0,15 \pm 0,09$ g/L y $0,17 \pm 0,17$ g/L para los grupos I y II, respectivamente. La concentración de ácido hialurónico, obtenida por diferencia entre GAGsT y GAGsS, mostró un incremento significativo en el grupo de referencia ($1,31 \pm 0,51$ g/L) con respecto a los grupos con fractura ($0,92 \pm 0,30$ g/L (I) y $0,90 \pm 0,40$ g/L (II)). La ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos con fractura para GAGsT, GAGsS y ácido hialurónico podría deberse a mecanismos compensatorios o a la dilución provocada por la inflamación, o bien, a las limitaciones propias de este modelo *in vivo*.

REFERENCIAS

Adarmes H, A Riveros, M Galleguillos, E González. 2003. Contenido de glicosaminoglicanos del líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica de caballos castrados y yeguas de diferentes edades. *Arch Med Vet* 35, 51-59.

Adarmes H, A Croxatto, M Galleguillos, E González. 2006. Contenido de glicosaminoglicanos, aldehídos y proteínas en el líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. *Arch Med Vet* 38, 47-52.

Alberts B, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts, JD Watson. 1994. Cell junctions, cell adhesion and extracellular matrix. In: *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. Garland Publishing, New York, USA.

Arai K, K Misumi, SD Carter, S Shinbara, M Fujiki, H Sakamoto. 2005. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation and synthesis in equine joint disease. *Equine Vet J* 37, 31-36.

Bartold PM, RC Page. 1985. A microdetermination method for assaying glycosaminoglycans and proteoglycans. *Anal Biochem* 150, 320-324.

Bayliss MT, 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.

Billinghurst RC, PB Fretz, JR Gordon. 1995. Induction of intra-articular tumour necrosis factor during acute inflammatory responses in equine arthritis. *Equine Vet J* 27, 208-216.

Brama PA, JM Tekoppele, B Beekman, PR Van Weeren, A Barneveld. 1998. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis and osteochondrosis. *Ann Rheum Dis* 57, 697-699.

Brama PA, R van den Boom, J DeGroot, GH Kiers, PR van Weeren. 2004. Collagenase-1 (MMP-1) activity in equine synovial fluid: influence of age, joint pathology, exercise and repeated arthrocentesis. *Equine Vet J* 36, 34-40.

Clegg PD, SD Carter. 1999. Matrix metalloproteinase 2 and 9 are activated in joint disease. *Equine Vet J* 31, 324-330.

Dimock AN, PD Siciliano, CW McIlwraith. 2000. Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. *Equine Vet J* 32, 439-443.

Fuller CJ, AR Barr, M Sharif, PA Dieppe. 2001. Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 49-55.

Hedlund H, E Hedbom, D Heinegard, S Mengarelli-Widholm, FP Reinhold, O Svensson. 1999. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J Biol Chem* 274, 5777-5781.

Kevorkian L, DA Young, C Darrah, ST Donell, L Shepstone, S Porter, S Brockbank, DR Edwards, AE Parker, IM Clark. 2004. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum* 50, 131-141.

Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr, RJ Randall. 1951. Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Maroudas A, MT 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.

McIlwraith CW. 1996. General pathobiology of the joint and response to injure. In: McIlwraith, CW, Trotter GW. *Joint disease in the horse*. WB Saunders, Philadelphia, USA.

McIlwraith CW. 2005. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet J* 37, 473-482.

Morris EA, BV Treadwell. 1994. Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res* 55, 13-146.

Moulharat N, C Lesur, M Thomas, G Rolland-Valognes, P Pastoureaux, P Anract, F De Ceuninck, M Sabatini. 2004. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes *in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 296-305.

Nagase H, M Kashiwagi. 2003. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 5, 94103.

Richardson J. 1997. Ageing horses-an illustrated guide. In *Practice* 19, 486-489.

Todhunter RJ. 1996. Anatomy and physiology of synovial joints. In: McIlwraith CW, Trotter GW. *Joint disease in the horse*. WB Saunders, Philadelphia, USA.

Todhunter RJ, SL Fubini, KP 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.

Tortorella MD, EC Arner, R Hills, A Easton, J Korte-Sarfaty, K Fok, AJ Wittwer, RQ Liu, AM Malfait. 2004. Alpha 2-macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous of these enzymes. *J Biol Chem* 279, 17554-17561.

- Trumble TN, GW Trotter, JRT Oxford, CW McIlwraith, S Cammarata, JL Goodnight, RC Billingham, DD Frisbie. 2001. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am J Vet Res* 62, 1467-1477.
- Tulamo R, J Houttu, A Tupamäki, M Salonen. 1996. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. *Am J Vet Res* 57, 932-937.
- Van den Boom R, MR van der Harst, H Brommer, PAJ Brama, A Barneveld, PR van Weeren, J DeGroot. 2005. Relationship between synovial levels of glycosaminoglycans, hydroxyproline, and general MMP activity and the presence and severity of articular cartilage change on the proximal articular surface of P1. *Equine Vet J* 37, 19-25.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd ed. Prentice - Hall Englewood Cliff, New Jersey, USA.