



**VARIACIÓN DEL NIVEL DE CITOQUINAS EN LÍQUIDO SINOVIAL DE EQUINOS  
CON ENFERMEDAD ARTICULAR TRATADOS CON BISFOSFONATOS.**

**VARIATION OF THE LEVEL OF CYTOKINES IN SYNOVIAL FLUID OF EQUINE  
WITH JOINT DISEASE TREATED WITH BISPHOSPHONATES**

**Polli Magalí<sup>1</sup>, Caggiano Nicolás<sup>1</sup>, Rolando Jesica<sup>1</sup>, Perrone Gustavo<sup>2</sup>, Marino Mario<sup>1</sup>,  
De Simone Emilio<sup>1</sup>, Chiappe Barbará Angelina<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Fisiología Animal. Laboratorio de Diagnóstico de Metabolismo Óseo y Mineral. <sup>2</sup> Producción Equina. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires.

Magalí Polli: [magalipolli@hotmail.com](mailto:magalipolli@hotmail.com)

**RESUMEN**

La Osteoartritis es una de las artropatías más frecuentes en los equinos deportivos y es causa de grandes pérdidas económicas asociadas. El diagnóstico precoz de esta enfermedad, que en ocasiones no es factible con estudios radiográficos, deviene en la posibilidad de realizar un tratamiento temprano con el objeto de evitar mayor compromiso del hueso subcondral subyacente. Si bien ciertas citoquinas cumplen un rol fisiológico en el normal remodelado óseo y articular su incremento puede ser considerado patológico. En este estudio se postula el uso de la determinación de citoquinas de origen osteoarticular (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4), para el diagnóstico de la osteoartritis así como para la evaluación de su evolución post tratamiento con pamidronato, aminobisfosfonato de segunda generación. Se trabajó con tres grupos de equinos de distintas edades, mayores de 4 años, clasificados según la presencia o no de enfermedad articular y el grado de actividad de la misma, para luego evaluar la respuesta al tratamiento con bisfosfonatos en los casos de enfermedad articular. Como pudo observarse, los niveles de citoquinas se encontraron elevados durante la enfermedad articular activa y las mismas disminuyeron su concentración post tratamiento con el bisfosfonato utilizado.

**Palabras claves:** Citoquinas osteoarticulares, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-4, osteoartritis equina, líquido sinovial

## ABSTRACT

Osteoarthritis is one of the most common joint diseases in sport horses and is also cause of great economic losses associated. Early diagnosis of this disease, which sometimes is not feasible with radiographic studies, brings the possibility of early treatment in order to avoid greater commitment of underlying subchondral bone. While related cytokines play a physiological role in normal articular bone remodeling their increase may be considered pathological. This study postulates the determination of osteoarthicular cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-4), as early diagnosis of osteoarthritis as well as for the evaluation of pamidronate, an aminobisphosphonates of second generation, post treatment OA evolution. We divided the animals in three groups that were classified according to the presence or not of joint disease and also considering degree of activity of OA and treatment response with bisphosphonates. As can be observed, the cytokines levels were elevated during active joint disease, and decreased after bisphosphonates treatment.

**Keywords:** Cytokines osteoarthicular, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-4, equine osteoarthritis, sinovial fluid

## INTRODUCCIÓN

La Osteoartritis (OA) es una de las artropatías más frecuentes y, en los atletas equinos, es la responsable del 60% de las claudicaciones, (Caron y Genovese, 2003). Durante mucho tiempo ha sido motivo de debate si los cambios asociados a la OA, que se presentan en el hueso subcondral subyacente a la articulación, preceden, ocurren con o son posteriores a los cambios degenerativos del cartílago. Por otra parte la artritis en el equino, al igual que en los humanos, en algunos casos progresa a estadios crónicos de difícil resolución, con compromiso del hueso subcondral. En esta fase crónica la terapia convencional con analgésicos y antiinflamatorios no solo no resuelve la enfermedad sino que además, puede producir respuestas transitorias y de incierta evolución clínica, surge así la importancia de su diagnóstico temprano. La detección precoz de la OA no es sencilla, ya que los primeros estadios de la enfermedad cursan sin cambios radiológicos y con signos clínicos de presentación variable intercalados con periodos de remisión transitoria.

Si bien el diagnóstico clínico y radiológico de la OA es sumamente importante para evaluar la evolución de la enfermedad, el diagnóstico de laboratorio puede ser de gran valor

en la detección precoz y en el seguimiento de la respuesta al tratamiento. En este trabajo analizaremos el valor del estudio de diferentes citoquinas relacionadas con el perfil osteoarticular en equinos deportivos.

Las citoquinas, proteínas de comunicación celular que, hasta hace unos años atrás no se conocían, son secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a la presencia de distintos antígenos. A su vez estas diferentes citoquinas median muchas de las funciones de estas células inmunitarias y estimulan distintas respuestas defensivas e inflamatorias. En medicina humana, las citoquinas son utilizadas con fines diagnósticos y terapéuticos mediante la aplicación de sus antagonistas específicos, o sueros anti, en numerosas enfermedades inmunitarias e inflamatorias (Elliot *et al.*, 1993; Zwerina *et al.*, 2007). Por otra parte una misma citoquina puede ser sintetizada por igual por linfocitos, monocitos y diversas células tisulares, incluyendo células endoteliales, epiteliales e incluso células óseas o del cartílago. Sus acciones pueden ser locales o sistémicas. Las respuestas celulares a la mayoría de las citoquinas suponen cambios de la expresión génica en las células diana, lo que da lugar a la expresión de nuevas funciones y e incluso a la promoción de la proliferación de las células diana. Pero todas estas respuestas encadenadas están reguladas estrechamente y existen mecanismos inhibidores de retroalimentación para modular el resultado de su acción.

Entre estas citoquinas consideraremos al factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), la interleuquina (IL) 1 $\beta$ , IL4, IL6 todas ellas presentes en distintos momentos y niveles en el líquido sinovial de animales sanos como en los que presentan signos clínicos de OA. Por otra parte se evaluó proteína C reactiva (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 (Friedman y Young, 1997).

En relación al tratamiento de aplicación en este estudio, el pamidronato es un bisfosfonato (BP) droga derivada de los pirofosfatos orgánicos ampliamente difundidas en el tratamiento de diferentes patologías óseas del equino por su marcada actividad como droga antiresortiva, (Denoix, 2002; Denoix *et al.*, 2003; Delguste *et al.*, 2007; Katzman *et al.*, 2008; Katzman, 2012). Estos compuestos también han sido aplicados en el tratamiento de la osteoartritis (Hayami *et al.*, 2004; Pasternak *et al.*, 2009), así como en distintos tipos de

cáncer, (Heikkilä, 2005) y en las lesiones arterioscleróticas especialmente por sus propiedades antiinflamatorias y sus efectos analgésicos (Amin *et al.*, 1992; Ylitalo, 2000).

Como hemos mencionado la lesión del hueso subcondral subyacente juega un rol destacado en la lesión del cartílago propiamente dicha (Kawcak *et al.*, 2001; Karsdal *et al.*, 2008; Kwan *et al.*, 2010), y los BPs con su efecto anti remodelatorio óseo podrían prevenir el inicio y la progresión del daño del articular crónico.

El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de citoquinas en líquido sinovial de tres grupos de equinos según la presencia o no de enfermedad articular y evaluar la posible modificación del grado de actividad de las mismas como respuesta al tratamiento con bisfosfonatos en los casos de enfermedad articular.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales y muestras

Inicialmente se realizó el análisis macroscópico, color, viscosidad y turbidez, estableciendo una escala de clasificación del líquido sinovial de la articulación del tarso de equinos de salto entre 2 y 15 años de edad. Los animales se dividieron en I) *basales* (n=6), de joven edad (3 años) que en ningún momento de su vida presentaron OA, II) *Enfermedad articular no activa* (n=8), animales de entre 3 y 15 años que no presentaban enfermedad clínica al momento del muestreo pero habían tenido episodios recurrentes de OA con remisiones y III) *Enfermedad articular activa* (n=6), que presentaban diferentes grados de enfermedad articular clínicamente evidente al momento del muestreo. En la evaluación clínica se usó el score de claudicaciones (1 a 5) de la AAPE (American Association of Equine Practitioners) acompañado por el grado de sensibilidad a la flexión forzada y sensibilidad a la palpación presión (de 1 a 3).

### Tabla N°1 Evaluación clínica

#### - Clasificación del 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.
4. al paso.
5. presente con mínimo apoyo en movimiento o en reposo o una completa imposibilidad de movimiento

- **Examen clínico:**
  - Sensibilidad a la palpación presión      1 a 3
  - Resultado a la flexión forzada              1 a 3

### **Medición de citoquinas**

Se evaluó las siguientes citoquinas: el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), la interleuquina 6 (IL-6), 4 (IL-4) y la 1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) en líquido sinovial de equinos clínicamente sanos (basales), con enfermedad no activa y enfermos en el día 0 y 3 de tratamiento. Los valores hallados en el muestreo previo al tratamiento en el grupo de animales con enfermedad activa se los registró como tiempo 0.

Las citoquinas IL 1  $\beta$ , IL 4, IL-6 y TNF-alfa se evaluaron por ELISA.

### **Evaluación del perfil proteico y proteína C reactiva (PCR).**

Se evaluó la presencia de cambios en el perfil proteico del líquido sinovial antes y después de la administración de bisfosfonatos mediante SDS-PAGE al 12%.

La PCR se determinó mediante kit comercial en suero y líquido sinovial de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anti-PCR (BioSystems, Barcelona, España).

### **Tratamiento con bisfosfonatos**

Los animales que presentaban enfermedad articular activa fueron tratados con dos dosis del amino-bisfosfonato, pamidronato gentilmente cedido por Laboratorio Gador SA. El día 0 y el día 1 se aplicó 90 mg pamidronato por vía IV lenta. Las muestras de líquido sinovial de los animales controles del tratamiento se obtuvieron, el día 0 correspondiente al grupo “enfermedad articular activa” y el día 3 las de estos mismos animales post tratamiento, grupo “tratados con pamidronato”.

## **RESULTADOS**

Los valores medios, desviación standard y error standard de las distintas citoquinas evaluadas en los diferentes grupos problemas se encuentran en la Tabla N° 2 y figuras N° 1, 2 y 3.

Respecto del análisis macroscópico del líquido sinovial directo, podemos decir que los líquidos muy fluidos o hemorrágicos pronostican alteraciones en el perfil de citoquinas tanto en animales de edad avanzada como en los más jóvenes.

En relación a los niveles de TNF $\alpha$  en el líquido sinovial se observó que aproximadamente el 75% de la población de caballos clínicamente sanos y el 50 % de los enfermos en fase no activa no presentaron valores detectables de este factor. Sin embargo la ausencia de TNF $\alpha$  no fue índice de salud articular ya que un 30 % de los animales con sintomatología clínica de OA no presentaron niveles detectables de TNF $\alpha$ , pero al repetir el muestreo en forma seriada fue posible encontrar niveles elevados de esta citoquina en algún momento dado. Por otra parte es de destacar que en el grupo de potrillos considerados

clínicamente sanos, por no presentar signos de claudicación ni cambios en el diámetro articular normal, un 10 % de ellos presentó citoquinas elevadas en el líquido sinovial y posteriormente, al cabo de unos meses, algunos de ellos manifestaron signos clínicos aunque acompañados de estudios radiológicos normales.

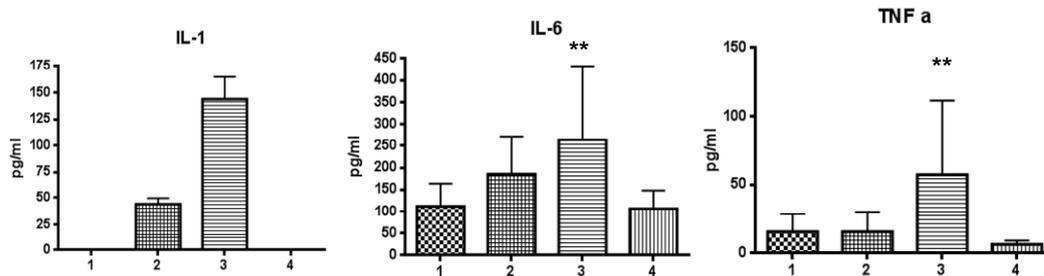
**Tabla N° 2** Niveles de citoquinas (IL-1  $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ) en el líquido sinovial de equinos sanos, enfermos no activos, activos y tratados con pamidronato al 3° día (TD3). Valor medio  $\pm$  desvío standard (Error standard)

Grupos	N	IL-1 $\beta$ pg/ ml	IL-6 pg/ ml	TNF $\alpha$ pg/ ml
<b>1. Basales</b>	6	No presente	112.20 $\pm$ 90.01 (16.43)	15.58 $\pm$ 22.51 (3.98) ***
<b>2. Enfermedad articular no activa</b>	8	43.83 $\pm$ 9.96 (3.52) ***	185.04 $\pm$ 149.87 (17.66)	23.43 $\pm$ 36.07 (9.13)
<b>3. Enfermedad articular activa Tiempo 0</b>	6	143.83 $\pm$ 35.84 (3.52)	263.83 $\pm$ 292.24 (63.77)	57.33 $\pm$ 94.11 (16.90)
<b>4. Tratados con pamidronato 3ª día</b>	6	No presente	106.33 $\pm$ 72.35 (18.68)	6.44 $\pm$ 4.71 (1.66)*

\* P<0.05, \*\*\* P<0.001 vs enfermedad articular activa

**Figura 1**

Gráficos de los perfiles de IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$  en el líquido sinovial de equinos sanos, enfermos no activos, activos y tratados con pamidronato al 3º día.



\*\* p < 0,01 enfermos activos(3) vs tratados día 3 (4)

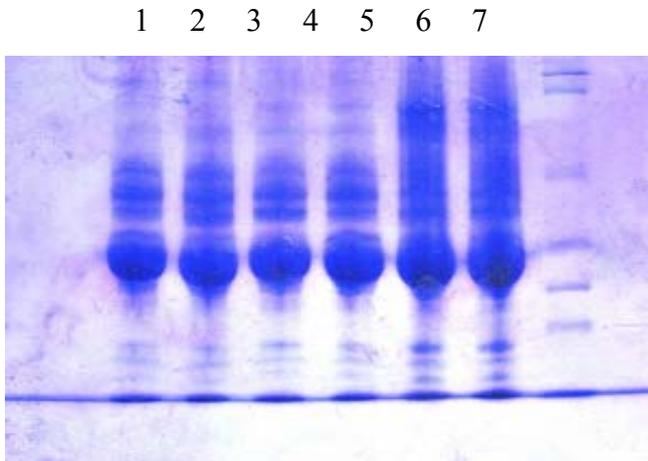
Respecto a la IL-1  $\beta$  la misma no se encontró presente en el grupo de animales sanos ni en el de animales tratados con pamidronato, a tres días de finalizado el tratamiento, pero si fue posible determinarla en los dos grupos de animales con enfermedad articular tanto en aquellos en la fase activa como en los que se encontraban en un periodo de remisión o de no actividad.

La IL-6 fue detectable en el 90 % de las muestras de líquido sinovial evaluadas, tanto en animales sanos como en aquellos con antecedentes de enfermedad articular pero sin signos clínicos al momento de la evaluación. En los animales con enfermedad articular activa, esta citoquina se presentó en el 100 % de los casos y en niveles más elevados que en los observados en los individuos sanos y en uno de ellos la misma alcanzo un valor máximo de 1318,46 pg/ml. Sin embargo a consecuencia de la amplia dispersión de los datos no fue posible observar diferencias significativas en los valores medios de los distintos grupos estudiados. Por otra parte es de destacar que en los animales enfermos a los cuales se les administró pamidronato, al tercer día de iniciado el tratamiento, el 20 % no presentaba valores detectables de IL-6 y todos ellos presentaron valores marcadamente inferiores a los determinados previamente al tratamiento.

La IL-4 se detectó solo en algunos animales y los valores hallados resultaron muy bajos ( $7.13 \pm 1.27$  pg/ml). Hasta el momento no podemos establecer un valor de referencia o una conclusión respecto de su valor diagnóstico en los distintos grupos.

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

**Figura 2.** Perfil proteómico de líquido sinovial previo al tratamiento (calle 1 y 3) y post tratamiento (calle 2 y 4). En las calles 5 y 6 se observa el perfil proteómico del suero. Calle 7 marcador de peso molecular en kDa 45,55,66,88,97,115,205.



En función de lo observado en la figura 2 no se observan cambios significativos en el perfil proteómico de los líquidos sinoviales previos y posteriores al tratamiento. Asimismo los perfiles proteómicos del líquido sinovial son similares a los perfiles séricos, siendo la albúmina la proteína mayoritaria del líquido sinovial.

## DISCUSION

En los equinos, a diferencia de los humanos, la edad avanzada no es el factor de riesgo más significativo para la presentación de la OA. Los potrillos de alto valor genético son propensos a padecer esta enfermedad en edades tempranas debido a, su crecimiento rápido acompañado, en muchos caso, de una nutrición inadecuada que predispone a la osteocondrosis, asociado esto a un intenso y precoz entrenamiento, (Schlueter *et al.*, 2004). Es por esto, que la OA genera una gran preocupación para la industria hípica, además de

importantes pérdidas económicas para los productores. Surge de esto la importancia de su diagnóstico temprano mediante el estudio de las distintas citoquinas mencionadas previamente.

Si bien es cierto que en el mecanismo fisiológico de modelado/ remodelado óseo y articular intervienen algunas de las mencionadas citoquinas al observar los resultados en líquido sinovial de los animales clínicamente sanos o basales, es de destacar que en un alto porcentaje de ellos no se detectaron niveles de IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  y PCR, así como tampoco en el suero. En cambio la IL-6 se encontró presente en un alto porcentaje (90 %) de los líquidos sinoviales evaluados tanto sanos como enfermos. Por otra parte es de destacar que entre de los animales seleccionados como clínicamente normales se descartó un 10 % de ellos por presentar aumento marcado en los niveles de las citoquinas sinoviales.

Al analizar la función de estas citoquinas en la génesis de la OA, el TNF $\alpha$  cumple un rol predominante en el desencadenamiento de la OA, es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda y el responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves. El principal origen del TNF- $\alpha$  son los fagocitos mononucleares activados, aunque los linfocitos T estimulados por el antígeno, los linfocitos natural killer (NK) y mastocitos también pueden producirlos, ( Abbas *et al.*, 2008).

Es de destacar que solo en las primeras horas del proceso inflamatorio se produce un aumento manifiesto del TNF- $\alpha$  en suero, motivo por el cual no es muy usual detectarlo. Incluso, en muestras de líquido sinovial correspondientes a animales en fase activa de la enfermedad puede no encontrarse niveles aumentados de TNF- $\alpha$ .

En nuestro estudio aproximadamente el 75% de la población de caballos clínicamente sanos y el 50 % de los enfermos en fase no activa no presentaron valores detectables de este factor. Es decir 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. Sin embargo en los animales tratados con pamidronato fue posible observar, en aquellos animales en los cuales estaba presente, una disminución respecto el valor individual pre tratamiento.

Otra de las citoquinas de gran relevancia en el desarrollo de la OA es la IL- 1  $\beta$ , su principal lugar de síntesis son los monocitos/macrófagos, pero también es expresada por células del tejido conectivo incluyendo a los condrocitos y sinoviocitos. Es una citoquina de potente actividad en el cartílago al modular la degradación de la matriz extracelular (MEC), pero no cumple esta función de manera directa, si no que estimula, sola o en conjunto con el TNF- $\alpha$ , la liberación de NO<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y MMP. La IL-1  $\beta$  es una de las citoquinas mas

estudiadas en el desarrollo de la artritis, (Tung *et al.*, 2002). En este estudio fue posible determinar la IL-1  $\beta$  en los equinos que presentaban enfermedad articular pero no en los clínicamente sanos o en los tratados con pamidronato. Y además se observó diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre el valor medio del grupo con enfermedad activa respecto del grupo de los animales que se encontraban en un periodo de remisión de la enfermedad.

La IL-1  $\beta$  también juega un papel muy importante en el mantenimiento de la reacción inflamatoria, ya que ejerce un efecto quimiotáctico produciendo la migración de leucocitos hacia la articulación. Su nivel de expresión, síntesis y secreción estará en relación con el estímulo inicial que origina la lesión, el sistema de complemento y los componentes de la MEC, (von Rechenberg, 1999).

Respecto de los niveles de IL-6 estos se encuentran elevados en una gran variedad de situaciones inflamatorias y además cuando la resorción ósea se encuentra elevada. El papel de la IL-6 en la inflamación es diferente del de TNF- $\alpha$ , la IL-6 no causa síntomas de inflamación cuando se infunde en dosis altas, pero estimula la producción hepática de proteínas de fase aguda, tales como la PCR.

Los resultados de nuestra experiencia son concordantes con estos conceptos ya que la IL-6 se encontraba presente en prácticamente todos los líquidos sinoviales evaluados, solamente en un 10 % de los animales sanos y un 20 % de los tratados con pamidronato no fue posible encontrar niveles detectables de esta citoquina. Asimismo el pamidronato provocó un marcado descenso en los niveles de IL-6 en el líquido sinovial de los equinos tratados con enfermedad activa.

Muchos tipos de células dentro de la articulación son capaces de producir IL-6 incluyendo fibroblastos sinoviales y condrocitos articulares. Se sugiere que la síntesis de IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$  podrían inducir la producción de IL-6, y en consecuencia de PCR. Los niveles elevados de estos factores en conjunto pueden a su vez contribuir al desarrollo de la OA. Esto es apoyado por los datos que muestran que en la OA i) existe una relación entre los niveles plasmáticos elevados de PCR, niveles elevados de líquido sinovial de IL-6 y la presencia de inflamación sinovial crónica clasificado histológicamente, (Pearle *et al.*, 2007), ii) la IL-6 resulta ser un factor predictivo significativo de la evidencia radiológica de OA en la articulación femorotibiorrotuliana, (Livshits *et al.*, 2009), y iii) los niveles elevados de esta citoquina son predictivos de un mayor riesgo de pérdida de cartílago en la OA y de una pobre respuesta al tratamiento, (Martel-Pelletier *et al.*, 2009; Pelletier, 2010).

En el tejido óseo, la IL-6 produce un efecto resorptivo ya que su papel es promover la diferenciación de los osteoclastos a partir de las células precursoras. A su vez, este efecto

parece ser dependiente de la IL-1  $\beta$ , la cual es simultáneamente producida por las células del mismo tejido. Las IL-1  $\beta$  e IL-6 poseen un efecto sinérgico sobre la resorción del hueso, pero la IL-6 es menos efectiva que la IL-1  $\beta$ , (von Rechenberg, 1999). El bloqueo del receptor de la IL-6 ha resultado ser una terapia eficaz, dosis dependiente, para el tratamiento de la artritis reumatoide en humanos (Nishimoto *et al.*, 2004).

Algunos autores postulan que el papel del TNF- $\alpha$  sobre el daño en la articulación es mediado por su acción sobre IL-1  $\beta$ , y también han utilizado bloqueantes de la IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$  como tratamientos en artritis reumatoide en humanos. Y sugieren que la IL-1  $\beta$  es el mediador crucial para la inflamación y la degradación del hueso, (Zwerina *et al.*, 2007). El tratamiento en humanos de la artritis reumatoide con anticuerpos quiméricos monoclonales anti-TNF $\alpha$  es muy bien tolerado y se observan significativas mejorías tanto en la clínica como en los parámetros de laboratorio. Además aparentemente la producción de IL-1  $\beta$  bioactiva se anula cuando se trata con este anticuerpo anti-TNF y el valor de la IL-6 también disminuye desde el principio del tratamiento, (Elliot *et al.*, 1993).

Respecto el tratamiento con BP estudios *in vitro* han demostrado que el tiludronate, bisfosfonato de segunda generación, inhibe la secreción de enzimas que degradan la matriz cartilaginosa mediada por IL-1  $\beta$ , de parte de condrocitos y células sinoviales, (Emonds-Alt *et al.*, 1985; Poircuitte, 2004).

En un modelo experimental de osteoartritis, el tratamiento con tiludronato mostró efecto positivo en los signos clínicos y en el andar con reducción en los mediadores inflamatorios tales como prostanglandina E2 en liquido sinovial, metaloproteinasa 13 y ADAMT5 en cartílago, y catepsina K en hueso subcondral, (Moreau *et al.*, 2011). También se detalla un efecto condroprotector del alendronato, inhibiendo la activación del TNF $\beta$  en osteoartritis experimental, (Hayami *et al.*, 2004), así como también del icandronato, (Zhao *et al.*, 2006).

En este estudio el tratamiento con dos (2) dosis seguidas de pamidronato permitió, al 3er día de tratamiento, observar una disminución significativa en las citoquinas evaluadas, presentando valores similares a las de los animales basales e incluso el valor medio del TNF- $\alpha$  resulto menor que el de los basales. Ahora resta constatar si este efecto se mantiene en el tiempo así como sus efectos clínicos positivos que presentaban los animales con OA activa tratados (n= 6).

## CONCLUSIONES

La inducción inapropiada de estas citoquinas proinflamatorias es muy importante en los eventos fisiopatológicos que conllevan a desarrollar la degradación de la matriz extracelular en el cartílago. La medición de sus niveles en líquido sinovial puede ser considerando como un importante biomarcador inflamatorio precoz para el diagnóstico de la OA en el equino y también para el seguimiento del tratamiento aplicado.

El tratamiento con pamidronato resulto positivo en relación a la disminución de las citoquinas evaluadas, sin embargo, debería ser aplicado en una dosis tal vez mayor o en su defecto reiterarse el tratamiento algunas veces más para evaluar el efecto real en el tiempo sobre la evolución de la OA.

Por otro lado los resultados obtenidos respecto de los niveles de TNF- $\alpha$  nos permiten plantear la posibilidad la utilización de anticuerpos anti-TNF como tratamiento para la terapia de la OA en los equinos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas Abul K , Litchman Andrew H , Pillai Shiv. Citocinas. En Inmunología celular y molecular. Barcelona, España. Editores: Abbas Abul K , Litchman Andrew H , Pillai Shiv. Elsevier (2008). 6ta edicion. p267-301.
- Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ullrich JW, Bilder GE, Perrone MH (1992). Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res.* 33: 1657–1663
- Caron JP, Genovese RL (2003). Principal and practices of joint disease treatment. In, *Diagnostics and Management of Lameness in the Horse*. Philadelphia, Elsevier Science. Editores: MW Ross and SJ Dyson. 1st edition. p 746-763.
- Delguste C., Lepage O., Amory H., Doucet M (2007). Pharmacologie clinique des bisphosphonates : revue de littérature axée sur le tiludronate chez le cheval. *Ann. Méd. Vét.* 151: 269-280
- Denoix JM (2002). Efficacy of tiludronate, a new bisphosphonate, in the treatment of navicular disease and bone spavin. A multicentric European clinical trial. *Ippologia* 13: 7-9
- Denoix JM, Thibaud D, Riccio B (2003). Tiludronate as a new therapeutic agent in the treatment of navicular disease: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Equine Vet J.* 35:407-13.
- Elliot JM, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghayeb J, and Woody JM (1993). Treatment of rheumatoid arthritis with

- chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum*, 36:1681-1690.
- Emonds-Alt X, Brelière JC, Roncucci R (1985). Effects of 1-hydroxyethylidene-1,1 bisphosphonate and (chloro-4 phenyl) thiomethylene bisphosphonic acid (SR 41319) on the mononuclear cell factor-mediated release of neutral proteinases by articular chondrocytes and synovial cells. *Biochem Pharmacol*. 34:4043-9.
- Friedman K, Young DS (). Effects of disease on clinical laboratory tests. 3th ed. Washington DC. AACC Press.1997.
- Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, et al. (2004). The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*. 50: 1193–206
- Heikkilä P (2005). Effects of bisphosphonates and small cyclic peptides on matrix metalloproteinases and human cancer cells. PhD thesis Institute of Dentistry, Faculty of Medicine, Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Karsdal MA, Leeming DJ, Dam EB, Henriksen K, Alexandersen P, Pastoureau P, Altman RD, Christiansen C (2008). Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage*. 16:638-46.
- Katzman SA, McIlwraith W, Kawcak C (2008). A review of the efficacy of tiludronate in the horse. *J Equine Vet Sci*. 28:209–214.
- Katzman SA, Nieto JE, Arens AM, MacDonald MH, Puchalski SM, Galuppo LD, Snyder JR, Maher O, Bell R (2012). Use of zoledronate for treatment of a bone fragility disorder in horses. *J Am Vet Med Assoc*. 240:1323-8.
- Kawcak CE, McIlwraith CW, Norrdin RW, Park RD, James SP (2001). The role of subchondral bone in joint disease: a review. *Equine Vet J*. 33:120-6.
- Kwan Tat S, Pelletier JP, Mineau F, Caron J, Martel-Pelletier J (2011). Strontium ranelate inhibits key factors affecting bone remodelling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone* 49:559-567.
- Livshits G, Zhai G, Hart DJ, Kato BS, Wang H, Williams FM, Spector TD (2009) Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: the Chingford study. *Arthritis Rheum* 2009;60:2037–45.

- Moreau M, Rialland P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Boileau C, et al.(2011). Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model . *Arthritis Res Ther* 2011; 13(3): R98.
- Martel-Pelletier J, Wildi LM, Pelletier JP (2012) Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone* 51: 297–311
- Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen P.L (1995). Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin. Chem.* 41: 892-896.
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T (2004) Treatment of Rheumatoid Arthritis With Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody. *Arthritis & Rheumatism* 50: 1761–1769.
- Pasternak B, Aspenberg P.(2009). Metalloproteinases and their inhibitors—diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics. *Acta Orthop* 2009; 80: 693–703
- Pearle AD, Scanzello CR, George S, Mandl LA, DiCarlo EF, Peterson M, Sculco TP, CrowMK (2007). Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*;15: 516-523
- Pelletier JP, Raynauld JP, 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* 69:2095–101.
- Poircuitte G. (2004) Le tiludronate: mode d'action et utilisation thérapeutique dans l'espèce équine en pathologie locomotrice. Thèse méd. vét., Alfort. France
- Schlueter AE., Orth MW (2004). Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. *Eq. Comp. Exercise Physiol* 1: 221-231
- Tung JT, Fenton JI, Arnold C, Alexander L, Yuzbasiyan-Gurkan V, Venta PJ, Peters TL, Orth MW, Richardson DW, Caron JP (2002). Recombinant equine interleukin-1B induces putative mediators of articular cartilage degradation in equine chondrocytes. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 66:19-25
- Von Rechenberg B, Guenther H, McIlwraith CW, Leutenegger C, Frisbie DD, Akens MK, Auer JA. (2000). Fibrous Tissue of Subchondral Cystic Lesions in Horses Produce Local Mediators and Neutral Metalloproteinases and Cause Bone Resorption in Vitro. *Veterinary Surgery.* 29: 420-429.
- Ylitalo R (2000) Bisphosphonates and atherosclerosis. *Gen Pharmacol.* 35:287-96.

- Zhao H, Liu S, Huang D, Xu Q, Shuto T, Iwamoto Y. (2006). The protective effects of icandronate on inflammation and joint destruction in established adjuvant arthritis. *Rheumatol Int.* 26:732-40
- Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Kronke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Schenecker C, Smolen JF, van den Berg W, and Schett G. (2007). TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *PNAS* 104: 11742-11747.