



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**

**“Determinación de niveles del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1) en líquido sinovial de articulaciones normales y con osteoartritis crónica espontánea en caballos”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL PRESENTA:**

**FERNANDO GARCÍA LACY**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**FRANCISCO JOSÉ TRIGO TAVERA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA, FMVZ-UNAM.**

**COMITÉ TUTOR:**

**VÍCTOR MANUEL DÁVILA BORJA  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría en la Ciudad de México.

También fue realizado en el Laboratorio de Biología de Sistemas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en la Ciudad de México.

Se obtuvo apoyo del equipo de trabajo a cargo del MVZ. José Alejandro Barrera Morales y del MVZ. Jorge Rodríguez Lezama para la obtención de las muestras clínicas.

Se obtuvo apoyo de la M. en C. Sara Teresa Méndez Cruz, Dra. Margarita Gómez-Chavarín, Dr. Horacio Reyes Vivas, QFB Alberto Enrique Fernández Molina para los trabajos realizados en laboratorio.

Trabajo financiado con recursos obtenidos por el Dr. Francisco José Trigo Tavera (tutor principal).

Alumno becario de CONACyT, de agosto de 2015 a julio de 2019, con número de registro 425082.

## Dedicatoria

A mis familiares y amigos.

A todos los caballos del mundo que puedan beneficiarse por lo que se hizo en este trabajo. Ustedes son mi vida, todo lo que hago y haré, es para ustedes.

Especialmente te quiero dedicar esto a ti Ra, siempre estuviste ahí en todos nuestros buenos y malos momentos, en todos nuestros logros y tonterías que hacíamos. Está de más decir que fuiste más que mi tío, fuiste más que alguien que nos adoptó a todos nosotros como sus propios hijos, fuiste más que una figura paternal, fuiste un gran amigo. Alguien a quien le tenía toda la confianza del mundo, a quien le hablaba para preguntarle desde cómo usar el taladro, hasta qué hacer de mi vida. Me encanta recordar cómo te hacía burla de que te emocionabas de que los focos ahorradores sólo gastaban 0.25 Watts y que podían durar de 8 a 10 años; también cuando agarrábamos el telescopio y nos enseñabas las constelaciones con el láser verde. De cómo te atacabas de la risa del chiste ese de buenas noches, buenas noches, buenas noches, y la velita. O también de cómo te gustaba tanto jugar con nosotros fut o lo que fuera, tanto que Pili nos hablaba para comer o lo que sea y tú le decías: “¡Sí güerita, un gol más y vamos!” de lo divertido que estabas con nosotros y nosotros contigo. Gracias por enseñarme tanto de la vida, las pequeñas y las grandes cosas, siempre vas a estar conmigo. Siempre pensé que si algún día tengo hijos, quiero ser para ellos lo que tú aún eres para mi.



*Ra y Botones en Navidad*

## Agradecimientos

A mi amada y adorada UNAM, mi casa, mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, jamás podría expresar mi enorme gratitud por lo que se me ha dado, por la oportunidad que tuve de estudiar aquí y ser parte de la larga lista de quienes tenemos la fortuna de pisar tus aulas.

Agradezco enormemente a todos los maestros que he tenido la fortuna de tener durante toda mi vida académica. En especial al Dr. Alejandro Rodríguez Monterde, gracias por estar siempre y por todo tu apoyo incondicional en todo, sobre todo por tu amistad.

Al Dr. Francisco José Trigo Tavera por su enorme apoyo desde el inicio de este proyecto, sus enseñanzas, sus consejos y sus críticas constructivas, en verdad gracias Doc.

A la M. en C. Sara Teresa Méndez Cruz, gracias por todas todas tus enseñanzas, pero más que por tus enseñanzas, tu amistad. Todo lo que aprendí fue por ti, todas las risas, los conciertos, las cenas, esos desvelos en el laboratorio, los viajes, etc etc. Gracias Sarita ☺.

A la Dra. Margarita Gómez Chavarín, muchísimas muchísimas gracias por todo el apoyo, los consejos, todo el trabajo que realizamos juntos y que seguimos y seguiremos realizando, me llevo a una persona muy especial, de un gran corazón y que creyó en mi en los peores momentos. Me has enseñado que la vida hay que disfrutarla y que se puede disfrutar mientras trabajas. Este trabajo se realizó gracias a tu enorme enorme apoyo, mil gracias Margariux ☺.

Al Dr. Horacio Reyes Vivas, por todo tu apoyo, tus consejos, tus enseñanzas, por hacer muy ameno el trabajo nocturno en el laboratorio, pero sobre todo tu amistad. Mil gracias por todo, vamos por más proyectos juntos.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, por sus enseñanzas, sus consejos y sobre todo su apoyo, para mi usted fue un pilar fundamental para que yo pueda estar realizar este trabajo. No puedo expresar mi gratitud hacia usted, desde que me permitió ingresar a los seminarios, hasta su mega apoyo en la preparación de mi examen de candidatura, mismo que hasta el día de hoy me da.

Al Dr. Víctor Manuel Dávila Borja por tu apoyo durante todos estos años, tus enseñanzas me dejaron mucho en verdad. Tus consejos, tus críticas y tus comentarios para embellecer este trabajo. Siempre lo he dicho: Eres un gran gran maestro.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por su apoyo, comentarios, críticas y aportaciones para el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros del laboratorio por sus enseñanzas y apoyo durante toda la investigación, en especial al QFB Alberto Enrique Fernández Molina, por todo tu apoyo en la estandarización de ese WB que costó muchísimo y que sin tu apoyo, no hubiera sido posible.

Al Dr. Jesús Oria Hernández por permitirme realizar los experimentos en el Laboratorio de Bioquímica Genética del INP.

Al Dr. Carlos Cedillo Peláez que fuiste un gran apoyo durante todo el proyecto, desde aconsejándome en todo regresándome a mi centro, hasta ayudándome a conseguir las muestras, mil gracias.

Al MVZ. José Alejandro Barrera Morales y al MVZ. Jorge Rodríguez Lezama por ayudarme a obtener las muestras que sin las cuales, no hubiera sido posible realizar este proyecto.

A mi queridísima Clarita, ha sido un honor haber compartido los posgrados contigo, no puedo expresar mi gratitud hacia ti por todo tu apoyo durante todos estos años. Me llevo a una gran amiga por siempre.

Por último a dos de mis grandes amigos, mismos que ahora son grandes doctores e investigadores, el Dr. Luis Fernando Valenzuela

Moreno y el Dr. Lázaro Felipe Verdiguél Fernández. Ustedes dos fueron una parte más que fundamental para que yo pudiera terminar. Les agradezco que me hayan impulsado, pero sobre todo inspirado para poder aspirar a ser tan grande como ustedes.



## **Abstract**

Insulin-like growth factor I (IGF-1) is the most important known growth factor for cartilage repair in horses. It promotes mitosis of chondrocytes, collagen II expression, and extra cellular matrix production. Osteoarthritis (OA) is the most common musculoskeletal condition that causes lameness and poor performance in sport horses. A total of 11 lame horses were clinically and radiographically evaluated, and all were confirmed to suffer a front metacarpophalangeal lameness by a positive flexion test, a low-4-point nerve block and an intraarticular block. Total protein, IGF-1, IL-6 and TNF $\alpha$  were determined by ELISA, demonstrating changes and different correlations between clinical condition, radiographic changes and degree of inflammation. All horses with joint associated pain and therefore associated lameness, demonstrated a significant increase of total protein ( $p < 0.0001$ ) and IGF-1 concentration ( $p < 0.05$ ). Concentrations of IL-6 and TNF $\alpha$  between controls and lame horses demonstrated significant differences ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively). Horses with less radiographic changes, demonstrated the highest IGF-1 expression in synovial fluid, and horses with more chronic OA conditions had very similar IGF-1 expression levels than control joints. In all lame joints, we identified by Western blot a lighter isoform of IGF-1 (~7.5 kDa) which was inflammation related and it is the molecular weight of the mature peptide, and all control joints expressed a heavier isoform (~12 kDa). This finding could lead to new research for sequencing and targeting the isoform which is not expressed during an inflammatory process within a joint, and to have a better understanding of its role in the horse's joint.

**Key words:** *IGF-1, horse, osteoarthritis.*

## Resumen

El IGF-1 es el factor de crecimiento más importante para reparación de cartílago en caballos. Promueve mitosis en condrocitos, expresión de colágena II y producción de matriz extracelular. La osteoartritis es la causa más común de claudicación y baja de rendimiento en caballos. Once caballos fueron evaluados y todos fueron confirmados de tener claudicación asociada a la articulación metacarpo-falángica en miembros torácicos. Por ELISA se determinó la concentración de proteína total, IGF-1, IL-6 y TNF $\alpha$  en líquido sinovial, donde existen cambios en concentración relacionados a la condición clínica que presentaban, cambios radiográficos y grado de inflamación. Todos los caballos con claudicación, demostraron un incremento significativo en la concentración de proteína total ( $p < 0.0001$ ) e IGF-1 ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones de IL-6 y TNF $\alpha$  entre controles y caballos con claudicación también demostraron diferencias significativas ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente). Los caballos con menos cambios radiográficos demostraron una expresión mayor de IGF-1 en líquido sinovial; y los caballos con OA crónica y mayores cambios radiográficos tuvieron una expresión similar a la de los controles. En todas las muestras provenientes de caballos claudicando, se identificó por Western blot una isoforma de IGF-1 más ligera (~7.5 kDa) la cual se concluye que está relacionada a inflamación; en caballos controles se encontró una isoforma más pesada (~12 kDa). Este hallazgo puede llevar a una línea de investigación para secuenciar y dirigir los trabajos a la isoforma que no está siendo expresada durante OA y así tener un mejor entendimiento del papel que juega cada una de ellas.

**Palabras clave:** IGF-1, caballo, osteoartritis.

# Índice

	<b>Página</b>
1 Introducción	1
1.1 Artrología general	1
1.2 Articulaciones fibrosas	1
1.3 Articulaciones cartilaginosas	2
1.4 Articulaciones Sinoviales	3
2 Estructuras que componen a las articulaciones diartrósicas o sinoviales	5
2.1 Membrana sinovial	5
2.2 Circulación articular	8
2.3 Cápsula articular fibrosa	13
2.4 Líquido sinovial	14
2.5 Presión intraarticular (PIA) y dinámica del líquido sinovial	17
2.6 Estructuras anexas en las articulaciones	21
2.7 Cartílago articular	22
2.7.1 Condrocitos	23
2.7.2 Cartílago hialino	24
2.7.3 Formación de cartílago	25
2.7.4 Matriz extracelular	27
2.7.5 Cartílago fibroso	32
2.7.6 Cartílago elástico	32
3 Osteoartritis	33
3.1 Inflamación y daño articular	35
3.2 Tratamientos para la OA	39
3.3 Regeneración de cartílago	41
3.4 Participación del IGF-1 en procesos de regeneración de cartílago articular	42
4 Análisis bioinformático del gen <i>Igf-1</i>	44
5 Vías de señalización activadas por IGF-1	52
6 Justificación	55
7 Hipótesis	55
8 Objetivo general	56
8.1 Objetivos particulares	56
9 Estrategia experimental	57
10 Material y métodos	58
10.1 Criterios de inclusión	58
10.2 Criterios de exclusión	58
10.3 Criterios de eliminación	58
10.4 Evaluación clínica de aparato locomotor	58
10.5 Colección de líquido sinovial	59
10.6 Evaluación radiográfica	59
10.7 Determinación de proteína total en líquido sinovial	60

10.8 Determinación de concentración de IGF-1	60
10.9 Determinación de interleucina-6 (IL-6)	60
10.01 Determinación de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )	61
10.02 Western blot para IGF-1	61
11 Resultados	62
11.1 Concentración de IGF-1	63
11.2 Análisis de IL-6 y TNF $\alpha$	64
11.3 Western blot para IGF-1	65
12 Discusión	66
13 Conclusiones	73
14 Productos del doctorado	74
14.1 Publicaciones derivadas del proyecto de investigación	74
15 Publicaciones no derivadas del proyecto de investigación	75
15.1 Publicaciones como primer autor	75
15.2 Publicaciones como colaborador	75
15.3 Capítulos en libros	75
16 Referencias	77
17 Anexo 1: Protocolos	84
18 Anexo 2: Soluciones para PAGE y Western Blot para IGF-1 de caballo a partir de líquido sinovial	91

## Lista de Figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema que resume los tipos de articulaciones dependiendo del rango normal de movimiento, de la forma especializada de tejido conectivo y la clasificación anatómica.	4
<b>Figura 2.</b> Esquema donde ejemplifica una sección longitudinal de una vellosidad sinovial de caballo, en el centro se aprecia la arteriola central y rodeándola, la vénula helicoidal. Esta particular anatomía facilita el intercambio a contracorriente y el gradiente de oxígeno de la arteriola a las vénulas, donde también destaca la punta de la vellosidad, que es susceptible a isquemia. <i>(Imagen tomada y modificada de: Bertone, 2004)</i>	11
<b>Figura 3.</b> Esquema que ejemplifica la asociación de las vesículas extracelulares con células proinflamatorias, citocinas, enzimas degradadoras de MEC, y MMPs. en una articulación durante un proceso inflamatorio. <i>(Imagen tomada de: Buzas et al., 2014)</i>	16
<b>Figura 4.</b> Esquema que ejemplifica las fuerzas vasculares y de fluidos en articulaciones. A) Articulación normal en descanso, B) Articulación normal durante el ejercicio, donde se incrementa el flujo arterial y por lo tanto la presión arterial y flujo trans-sinovial, sin cambiar la permeabilidad. C) Articulación con proceso inflamatorio (sinovitis) durante el ejercicio, donde la presión arterial, y el flujo trans-sinovial son incrementados. La permeabilidad de la sinovia, la concentración de proteína sinovial y el edema intersticial incrementan, produciendo una cantidad anormal de líquido sinovial. <i>(Imagen tomada y modificada de: Bertone, 2004)</i>	20
<b>Figura 5.</b> Esquema que representa un comparativo del grosor en milímetros del cartílago articular no calcificado de distintas especies domésticas (perro, caballo, cabra, conejo y oveja) con el humano, en diversas regiones de la articulación	22

fémoro-tibiopatelar. PMT: *Proximal medial trochlear* (tróclea medial proximal); LT: *lateral trochlear* (tróclea lateral); DMT: *Distal medial trochlear* (tróclea medial distal); PMC: *Proximal medial chondyle* (cóndilo medial proximal); DMC: *Distal medial chondyle* (cóndilo medial distal).  
(Tomado de: McIlwraith, 2011)

**Figura 6.** Esquema que ejemplifica la formación de las fibras de colágena. (Imagen tomada y modificada de: Mescher, 2021). 28

**Figura 7.** Esquema que demuestra la interacción de las proteínas que conforman la MEC. (Proteínas de unión, proteoglicanos, colágena II, condroitín sulfato y ácido hialurónico). (Imagen tomada y modificada de: Miller EJ, 1982). 29

**Figura 8.** Microfotografía de una sección de cartílago articular de caballo adulto normal mostrando sus distintas capas. La parte superior corresponde a la superficie articular y la inferior a la adyacente al hueso subcondral. Tinción H & E. 1000x. 30

**Figura 9.** Microfotografía de un corte de grosor completo de una sección de cartílago articular de caballo adulto normal, donde en la zona superficial se observa el acomodo aplanado de los condrocitos (flecha blanca) y en la zona radial o profunda se observan las lagunas conteniendo grupos isógenos (flechas blancas). Tinción H & E. A: 100x, B y C: 400x 31

**Figura 10.** Diagrama donde se ilustran los efectos de la descarga (izquierda) y carga (derecha) en los distintos estratos del cartílago articular. TM: Matriz territorial, IM: Matriz interterritorial, I: Zona superficial, II: zona transicional o intermedia, III: Zona radial o profunda. (Tomado y modificado de: Hughes et al., 2005.) 31

**Figura 11.** Ensayo de incorporación de timidina que demuestra la proliferación celular inducida por IGF-1 y su inhibición en presencia de citocinas proinflamatorias. La proliferación celular es marcadamente inhibida cuando se coincide IGF-1 con dichas citocinas, 37

ya que hay una menor incorporación de timidina.  
(Imagen tomada de: Choukair et al., 2014)

**Figura 12.** Alineamiento de genes *Igf-1* de Humano y caballo. Mostrando 80% de identidad. 44

**Figura 13.** Alineamiento de genes *Igf-1* de Humano y ratón. Mostrando 80% de identidad. 44

**Figura 14.** Alineamiento de genes *Igf-1* de caballo y ratón, mostrando 81% de identidad. 44

**Figura 15.** Se muestra el gen de *Mus musculus* para IGF1, donde se observan los sitios de splicing alternativo. Mostrando la preproIGF1, los proIGF1 (Ea y Eb) y el péptido maduro conservado en muchas especies (70aa). (Tomado de: Tonkin, et al. 2015) 47

**Figura 16.** Esquema reportado por Nixon, et al. 1999, del mRNA de IGF-1 con sus 5 exones y dominios para los que codifican, junto con los diferentes juegos de *primers* (Fwd y Rvs) utilizados por Nixon, et al 1999, y las diversas regiones que éstos amplificaban, mismas que denominaron: IGF-13 a IGF-16. (Modificado de: Nixon, et al. 1999) 48

**Figura 17.** Análisis de variantes y cantidad de exones presentes en las bases de datos ncbi.com y ensemble.com 49

**Figura 18.** Estructura tridimensional de IGF-1 de *Equus caballus*. Modelo utilizado: Alphafold, se obtuvo de secuencias predichas disponibles en bases de datos en plataformas bioinformáticas (uniprot.com). Cuatro hojas alfa y una hoja beta plegada. 50

**Figura 19.** Ejemplos de *splicing* alternativo para células eucariontas, dentro de los cuales, destacan el salto de exones, retención intrónica, exones mutuamente exclusivos y sitios alternativos donadores 5' y aceptores 3' para el mRNA de *Igf-1*. (Imagen tomada de: Le et al. 2015) 51

**Figura 20.** Vía de señalización de IGF-1. Las proteínas de unión a IGF-1 (IGFBPs) modulan la biodisponibilidad 54

de IGF-1. Las funciones de ligando de IGF-1 lo hacen interactuar con su receptor (IGF1R), el cual está localizado en el espacio transmembranal.

**Figura 21.** Radiografías representativas de caballos con grado I (A), vista LM donde se observa una pequeña irregularidad del aspecto dorsal-proximal de la cresta sagital del tercer metacarpo (flecha); Grado II (B) toma DLPMO con un osteofito visible en el aspecto dorsomedial de P1 (flecha); Grado III (C) toma DP donde se observa un área de lisis ósea en hueso subcondral, inmediatamente adyacente al surco sagital de P1, rodeada por esclerosis ósea alrededor del mismo (flecha). 63

**Figura 22. A)** Concentración de IGF-1 de caballos control y caballos con claudicación demostrando una diferencia significativa entre ellos ( $p < 0.05$ )\*. **B)** Concentración de IL-6 entre controles y muestras de caballos claudicando donde se observa una diferencias significativas ( $P < 0.01$ )\*\*. **C)** Concentración de  $TNF\alpha$  de caballos controles y caballos claudicando donde se observan diferencias significativas ( $p < 0.001$ )\*\*\*. 64

**Figura 23.** Fotografía representativa del análisis de Western blot para IGF-1, donde se demuestra una diferencia en el peso molecular entre las muestras de líquido sinovial proveniente de caballos con diferentes grados de OA y las provenientes de caballos sanos (control). 65



## Listado de cuadros

**Cuadro 1.** Grado de severidad de cambios radiográficos y su correlación con hallazgos clínicos de caballos incluidos en el estudio.  
*(Modificado de: Verwilghen D, et al. 2009.)*

60

# 1 Introducción

## 1.1 Artrología general

La articulación es aquella estructura anatómica formada por la unión de dos o más huesos y, cuya función es la de dar ya sea estructura, soporte, o principalmente movimiento a alguna región anatómica. Los diferentes tipos de movimiento que permiten las articulaciones son: flexión, extensión, aducción, abducción, rotación interna y externa, circunducción. Están compuestas por hueso, cartílago articular, sinovia, cápsula articular fibrosa, estructuras anexas (que se detallarán más adelante) y ligamentos, ya sean intra o extra articulares, es decir, por dentro o por fuera de la cavidad articular.

Se pueden clasificar según tres categorías: 1.- Anatómicamente, 2.- Fisiológicamente, o 3.- Anatomofisiológicamente (Getty, 2000) (Figura 1). O bien, estructuralmente, es decir, según los componentes o estructuras anatómicas que la conformen, puede clasificarse en 3 tipos:

## 1.2 Articulaciones fibrosas

Son segmentos de huesos que se encuentran unidos por tejido conjuntivo fibroso. Son las únicas articulaciones que carecen de cualquier tipo de cartílago articular y, por consiguiente, de cápsula articular, sinovia, líquido sinovial y ligamentos; y por lo tanto, son articulaciones prácticamente fijas o inmóviles (Getty, 2000). Este tipo de articulaciones, pueden subdividirse en 3 diferentes clases:

1.- Suturas del cráneo. Compuestas únicamente por tejido conjuntivo fibroso. Con el paso del tiempo, éstas van desapareciendo osificándose para formar una sola placa de hueso. Es por esto, que, en medicina forense, las suturas del cráneo se utilizan para tratar de determinar la edad del individuo, sin embargo, en algunos individuos pueden no osificarse por completo, incluso en la senectud, haciéndolas no muy fiables para determinar edad.

2.- Sindesmosis. Compuestas por tejido conjuntivo fibroso blanco o elástico, o bien, una mezcla de ambos. Por ejemplo, la unión de fíbula con la tibia, unión de metatarsos o metacarpos rudimentarios con su respectivo III metatarso o metacarpo. Algunas de ellas, con el tiempo pueden llegar a osificarse, a este proceso se le llama sinostosis.

3.- Gónfosis. El único ejemplo de una gónfosis es aplicable en la unión del alveolo dentario con la pieza dental. No se considera como tal una articulación, ya que, en el sentido estricto, una articulación une a dos diferentes huesos, ahora bien, los dientes al no estar constituidos por tejido óseo, no forman parte del esqueleto axial, ni por supuesto del esqueleto apendicular (Getty, 2000 & Dyce, 2010).

Todas estas articulaciones carecen de movimiento por tanto son sinartrosis.

### 1.3 Articulaciones Cartilaginosas

Son las compuestas principalmente por cartílago hialino, fibrocartílago o una combinación de ambos. Se pueden dividir en 2 subclases:

1.- Sincondrosis. Estas articulaciones son consideradas como “temporales”, ya que

el cartílago presente se osifica conforme el individuo se hace adulto. El más claro ejemplo de una articulación sincondrósica, son las placas de crecimiento, que son fusionadas una vez que el individuo alcanza la madurez, otros ejemplos son: unión costocondral, la parte basilar del hueso occipital con el hueso basiesfenoides, las articulaciones entre esternones, el hueso estilohioideo con la porción petrosa del hueso temporal, entre otros (Getty, 2000 & Dyce, 2010).

2. Sínfisis. En ocasiones son llamadas articulaciones cartilaginosas secundarias, pero están compuestas únicamente por fibrocartílago, por consiguiente, su capacidad de movimiento es sumamente limitada. Los mejores ejemplos de una sínfisis es la articulación sacro-iliaca, o las sínfisis pélvica y púbica (Getty, 2000 & Dyce, 2010).

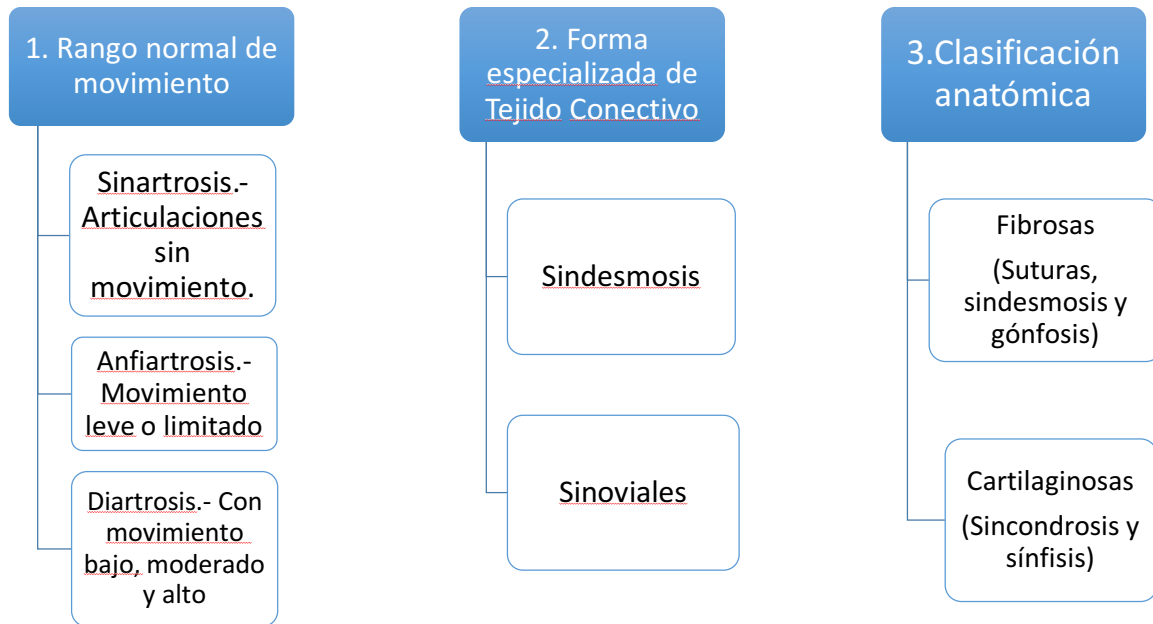
La clasificación indica que en las sincondrosis se unen los huesos por cartílago hialino y en las sínfisis por cartílago fibroso.

#### 1.4 Articulaciones Sinoviales

Conocidas también como articulaciones del tipo diartrosis por tener movimiento. Compuestas por cartílago articular, cápsula articular, cavidad articular, líquido sinovial, vasos sanguíneos y linfáticos, y nervios. Proveen alto movimiento entre los huesos que unen, el cartílago articular tiene capacidad de amortiguamiento y disipación de cargas. Algunos ejemplos de diartrosis de movimiento bajo o moderado: tarso-metatarsiana e interfalángica proximal. Y diartrosis de movimiento alto: Articulación coxo-femoral y metacarpo-falángica (Getty, 2000).

A continuación, se detallarán las estructuras que comprenden una articulación sinovial, a excepción del cartílago articular que se verá a fondo más adelante.

Para fines prácticos, las articulaciones pueden agruparse como lo demuestra el siguiente esquema:



**Figura 1.** Esquema que resume los tipos de articulaciones dependiendo del rango normal de movimiento, de la forma especializada de tejido conectivo y la clasificación anatómica

## **2 Estructuras que componen a las articulaciones diartrosicas o sinoviales**

### **2.1 Membrana sinovial**

Lámina de tejido conjuntivo que reviste en su totalidad a la articulación, puede llegar a estar sin el soporte que le confiere la cápsula articular fibrosa, esto es observado principalmente en vainas tendinosas. Macroscópicamente es de color rosa brillante y forma proyecciones o divertículos llamados recesos, que se extienden más allá de la superficie articular, estas proyecciones son las llamadas bolsas o *bursas*, que permiten que al realizar una artrocentesis, la aguja no tenga que entrar específicamente entre las dos superficies articulares. Constituye la capa interna de la cápsula articular, porque recubre todas las superficies internas de la cavidad articular con la única excepción del cartílago articular. La membrana sinovial se fija o ancla en los bordes del cartílago articular. Al interior de la misma, presenta unas prolongaciones digitiformes llamadas vellosidades sinoviales, que es donde se encuentran los sinoviocitos, que forman 1-2 capas de células (Dyce, 2010 & Geneser 2001).

La membrana sinovial está diseñada para el intercambio de fluido proveniente del flujo sanguíneo y tiene también a su vez la función de sintetizar hialuronatos (Bertone, 2004).

Se divide en dos regiones, sinovia (íntima) y subsinovia (subíntima). La sinovia está compuesta por una capa luminal de 1-5 células de profundidad, un plexo capilar que

yace 6-11  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie íntima. Existe una red más profunda de vasos linfáticos y la región subíntima que está compuesta de tejido adiposo, tejido conjuntivo ordinario laxo areolar y tejido conjuntivo fibroso (Bertone, 2004). La íntima está diseñada para favorecer los intercambios entre los capilares y la cavidad articular, carece de membrana basal, pero contiene espacios intercelulares y los capilares íntimos son fenestrados y orientados hacia la cavidad articular (Levick, 1984; Bertone, 2004).

La íntima adquiere una estructura tridimensional y es dependiente del ambiente biomecánico al que está sometida, es decir, en vainas tendinosas, cuyas cargas biomecánicas son altas, adquiere una forma más plana y descansa en una subíntima fibrosa y fuerte mecánicamente hablando. Por otro lado, en recesos sinoviales, la íntima forma las conocidas vellosidades sinoviales, las cuales son muy ricas en vasculatura y se ha demostrado que es el sitio preferencial para dilución e intercambio de macromoléculas, así como también se lleva a cabo en ellas la mayoría de la síntesis de hialuronato (Hardy, 1998; Myers, 1983).

Existen 2 tipos de sinoviocitos, el tipo A y el tipo B. Los sinoviocitos tipo A tienen función fagocítica, son similares a macrófagos, ya que contienen marcadores de superficie que sugieren cierta habilidad además de fagocitosis, además de ser células mononucleares provenientes de médula ósea, tienen funciones de presentación de antígeno, por lo que son los responsables iniciadores de la respuesta inmune innata dentro de la articulación; los tipo B que conforman dos tercios de la población de sinoviocitos tipo A, son similares a fibroblastos, conocidos o referidos por algunos autores como fibroblastos sinoviales, son de origen incierto,

pero poseen la función de sintetizar proteoglicanos y colágeno como parte de la matriz extracelular (MEC), así como también mucina y proteoglicano 4 (mejor conocido como lubricina), cuya función es la de lubricar la articulación y prevenir a su vez la deposición proteica por parte del líquido sinovial en el cartílago articular, gracias al control del crecimiento sinovial dependiente de adhesión e inhibiendo la adherencia de células sinoviales o de la membrana sinovial a la superficie recubierta por cartílago articular (uniprot.com; Geneser, 2001; Myers, 1983).

Ambos tipos celulares se encuentran en asociación cercana con componentes de la matriz íntima tales como la fibronectina, laminina, colágena tipo IV y V, entactina y glucosaminoglicanos sulfatados; todo lo cual funciona de anclaje de la capa celular íntima al tejido conjuntivo subyacente (Revel, 1995). La habilidad de la íntima para mantenerse como una capa más de la articulación aparenta ser por su papel en mantener la relación célula-MEC-célula, por medio de la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular-1 (por sus siglas en inglés: ICAM-1), la molécula de adhesión vascular-1 (por sus siglas en inglés: VCAM-1), fibronectina, laminina y sus ligandos a integrinas. (Bertone, 2004)

Cuando existe un proceso inflamatorio, la proporción celular de la membrana sinovial cambia, específicamente, en la parte subíntima cambia la población celular de macrófagos siendo ésta de un 50-70%. La expresión de integrinas también incrementa y por lo tanto la morfología celular se altera, puede pasar de ser un arreglo en paralelo a la superficie articular con células pequeñas, a otro más superficial y perpendicular a la cavidad articular (Myers, 1983).



Durante el proceso inflamatorio, la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células de la capa subíntima de la membrana sinovial, entre ellos los fibroblastos, puede servir para dirigir el tráfico de los leucocitos hacia el lugar de lesión. Sin embargo, existe evidencia de que las células de la subíntima también pueden dirigir leucocitos en estados no inflamatorios o normales. (Myers, 1983 & Zvaifler, 1995)

## 2.2 Circulación articular

La membrana sinovial posee un mayor número de vasos sanguíneos que la cápsula articular o el hueso subcondral, y tiene la función de mantener la homeostasis articular, ya que como bien se mencionó, provee una vía para el intercambio de nutrientes y subproductos metabólicos entre la sangre y los tejidos sinoviales, incluido el cartílago articular. La eficacia de este intercambio está dada por la densidad de capilares presentes en la sinovia, la profundidad de los mismos y el flujo sanguíneo. (Levick, 1990)

Los vasos sanguíneos presentes en la articulación (incluido el hueso subcondral) están formados por ramas provenientes de las arterias epifisarias que corren en la unión del periostio y la membrana sinovial, formando un círculo arterial. La mayor densidad de vasos sanguíneos en la sinovia, se encuentran a una profundidad de 25  $\mu\text{m}$  de la superficie articular. Las ramas más grandes de las arterias epifisarias penetran en el hueso, mientras que las ramas más pequeñas permanecen en la periferia del cartílago articular, formando así la circulación pericondrial (Bertone, 2004). En el ángulo de reflexión de la membrana sinovial, la irrigación está

compuesta por un plexo vascular y las vellosidades sinoviales están penetradas por una arteriola central proveniente de las ramas de las arterias epifisiarias. (Bertone, 2004)

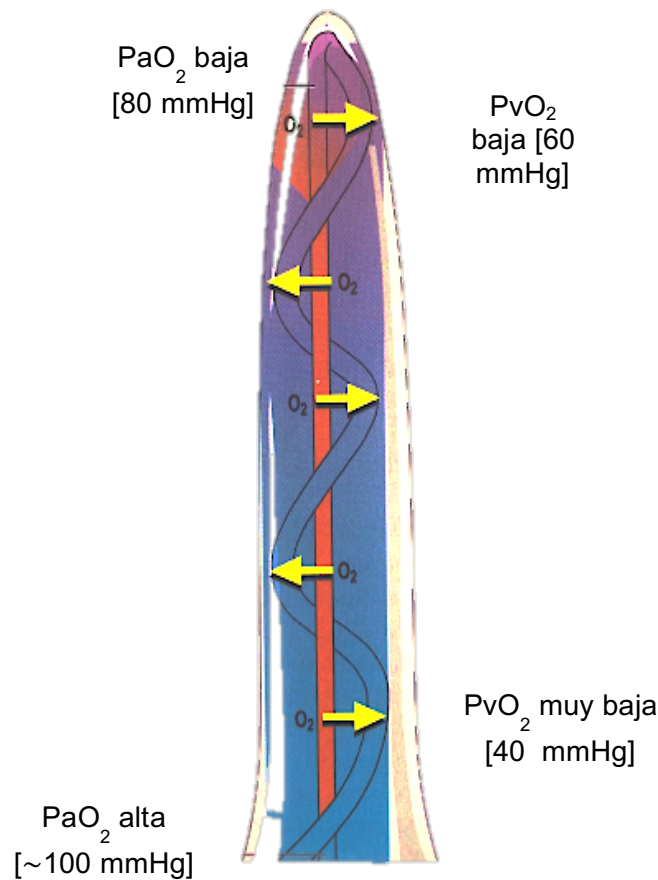
Diversos factores alteran la circulación articular, tales como la presión articular, temperatura local, movilidad de la articulación, tono vasomotor, liberación local de mediadores vasoactivos y el más importante de todos, el ejercicio. La respuesta al ejercicio de la circulación articular es considerada como el mayor factor inductor del aumento en la misma (Amudsen, 2002). Cuando la articulación pasa de un estado de extensión a flexión máximas, ocurre un efecto de bombeo, lo cual incrementa el flujo sanguíneo a la misma. (Bertone, 2004)

En la membrana sinovial, la presión intravascular está controlada principalmente por la arteriola central y los capilares presentes en ella. La presión de los últimos es relativamente baja, aunque se piensa que el flujo sanguíneo en la sinovia está dado principalmente por la presión intraarticular (PIA). Por ejemplo, cuando aumenta la PIA, ocurre efusión articular debido a la disminución de la perfusión (Hardy, 1996). Hay que destacar que la efusión articular no está ligada necesariamente a ser consecuencia de inflamación, sino con el aumento de la PIA, en caballos con efusión articular sin claudicación, la PIA es mayor a 30 mmHg. (Strand, 1994)

En la enfermedad articular crónica existe una disminución de la densidad de los capilares sinoviales y un incremento en el grado de fibrosis de la cápsula articular (lo que disminuye su distensibilidad), lo cual a su vez disminuye significativamente el flujo sanguíneo, lo que incrementa la PIA que en este caso está asociada a la

efusión articular, su movimiento y la falta de distensión de la cápsula articular. (Bertone, 2004)

En una vellosidad sinovial existe como ya se describió brevemente, una arteriola central y una vénula helicoidal que desciende desde la punta de la vellosidad, hasta la base de la misma. Esta distribución vascular la convierte en un sistema de intercambio a contracorriente, el cual crea isquemia en la punta de la vellosidad, debido a diferencias en la presión arterial y venosa de oxígeno tanto en la punta como en la base (Figura 2) (Bertone, 2004). En vasos sanguíneos normales ocurre un aplastamiento de los capilares cuando la PIA es mayor a 25 mmHg (Fitzgerald, 1991). Durante la efusión articular y en fases de movimiento normal, los valores de PIA son excedidos, lo que resulta en una disminución del flujo sanguíneo, linfático y por ende, disminución de la depuración de desechos desde el espacio articular. En caballos con artritis crónica, se da también una disminución de flujo sanguíneo, pero esto es dado por la disminución en la densidad de los capilares, y por un incremento en la distancia entre ellos, lo que conlleva a un incremento relativo de isquemia. En conclusión, articulaciones con aumento de PIA por efusión o con disminución en la distensibilidad de la cápsula articular (por OA), el flujo sanguíneo se verá disminuido, lo que conllevará a que las vellosidades disminuyan su tamaño y se vuelvan más romas, dando como resultado áreas de hipoxia en las puntas de las mismas, lo cual es la típica lesión por reperfusión isquémica. (Bertone, 2004 & Woodruff, 1986)



**Figura 2.** Esquema donde ejemplifica una sección longitudinal de una vellosidad sinovial de caballo, en el centro se aprecia la arteriola central y rodeándola, la vénula helicoidal. Esta particular anatomía facilita el intercambio a contracorriente y el gradiente de oxígeno de la arteriola a las vénulas, donde también destaca la punta de la vellosidad, que es susceptible a isquemia. (Imagen tomada y modificada de: Bertone, 2004)

En caballos neonatos, a diferencia de los adultos, la infección de articulaciones (artritis séptica) es más por vía hematogena que directa. Esto es por diferencias en la microcirculación de la articulación. En general, cualquier infección sistémica puede conllevar a infectar una articulación, por ejemplo, falla en transferencia pasiva e infecciones respiratorias, umbilicales o gastrointestinales. Lo cual conlleva a inoculación de microorganismos en membrana sinovial (infección tipo S), en hueso

subcondral epifisiario (infección tipo E), en el lado metafisiario de la fisis de crecimiento (infección tipo P), o bien, en los huesos cuboidales tanto de carpales como tarsales (infección tipo T). Las bacterias que normalmente son aisladas en potros con artritis séptica con: *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Actinobacillus equuli*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* y *Rhodococcus equi*. (Glass & Watts, 2017)

Existen dos grupos en donde se pueden clasificar los potros con sepsis músculo-esquelética: el potro neonato (<3 semanas de edad), en donde lo más probable es que dos o más articulaciones se vean afectadas; y el de potros mayores (>3 semanas de edad) donde únicamente una articulación estará infectada. En el primer grupo, se desarrollan infecciones primarias en la sinovia o en hueso epifisial (infección tipo S y tipo E), mientras que, en el segundo grupo, las infecciones primarias se desarrollan en el lado metafisiario de la fisis de crecimiento (infección tipo P). Esto es debido a que los vasos sanguíneos transfisiarios permanecen patentes hasta los 7-10 días de edad y a su vez comunican directamente con los sinusoides, en donde existe un flujo sanguíneo muy lento, lo que permite a las bacterias tener más tiempo de escapar del torrente sanguíneo para adherirse e invadir estructuras adyacentes. (Glass & Watts, 2017)

Otro factor que influye en la infección articular por vía hematológica, es que, en animales neonatos como lo es el conejo y el caballo, el cartílago articular es vascular, por lo que cualquier bacteria presente en torrente sanguíneo podrá pasar directamente a la articulación a través del cartílago articular, o bien, cualquier pequeño trauma a la superficie articular con hemorragia asociada, puede también

contribuir en la infección local (Glass & Watts, 2017).

Las articulaciones más comúnmente afectadas con artritis séptica en neonatos son la fémorotibiopatelar y tibiotarsales, después le siguen los carpos y menudillos, y finalmente son las consideradas misceláneas, como lo son el codo, hombro o coxofemoral (Vos & Ducharme, 2008).

Los signos clínicos incluyen claudicación severa, efusión sinovial, celulitis localizada y sensibilidad a la palpación, y generalmente la gente que llama al médico veterinario, reporta que “el potro está claudicando porque su madre lo pisó y lo lastimó”, razón por la cual, es necesario realizar un examen físico completo y adecuado para identificar rápidamente la causa e implementar el tratamiento adecuado.

### 2.3 Cápsula articular fibrosa

Es la estructura más cercana a la piel y envuelve a la articulación. Fija sus bordes penetrando en el periostio de los huesos que componen la articulación; dicha fijación puede ser a lo largo de los bordes del cartílago, o bien, a unos centímetros de éste. Es una estructura compuesta de tejido conjuntivo rico en colágena densa que forma fibras, las cuales se disponen en capas que transcurren dentro del periostio de los huesos que componen a la articulación. Funciona también como un soporte a la articulación adicional al que brindan los ligamentos articulares, principalmente los colaterales mediales y laterales, o el ligamento anular de la articulación metacarpo-falángica. En ocasiones, dichos ligamentos pueden penetrar a ella, o bien, transcurrir independientes a la cápsula, ya sea por dentro o por fuera de la

articulación. Algunos tendones también pueden reforzar a la cápsula para darle un soporte adicional, como sucede en las articulaciones del carpo con el tendón extensor digital común y el digital lateral. Al tener estructura rica en colágena y en tejido conjuntivo fibroso, la cápsula articular es muy resistente a fuerzas de tracción, pero a la vez flexible para permitir de manera estable el movimiento natural de la articulación. En casos de sobrecarga, puede llegar a generar entesiofitos en su inserción ósea, o bien, signos de remodelación ósea (Geneser, 2001; Getty, 2000).

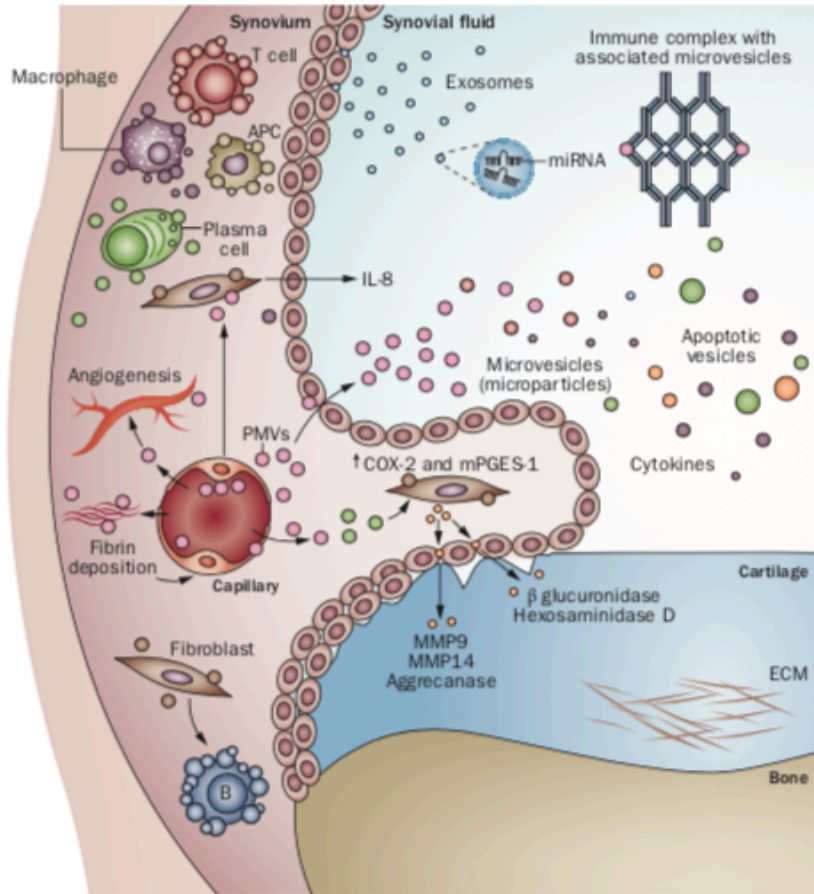
## 2.4 Líquido sinovial

Es un líquido viscoso, de color amarillo paja, y transparente. Es un ultrafiltrado del plasma que le confiere lubricación y nutrientes al cartílago articular, que, por difusión a través de la MEC, llegará a nutrir los condrocitos presentes en el cartílago. Mientras más grande sea la articulación sinovial, más cantidad de éste habrá (Geneser, 2001).

Este proviene de los vasos sanguíneos presentes en la membrana sinovial, la cual es una capa delgada que contiene sinoviocitos tipo A, B y capilares, como ya se describió anteriormente. En la subsinovia se encuentra una alta cantidad de vasos linfáticos, que ayudan a depurar productos de desecho del metabolismo de los condrocitos. En resumen, la membrana sinovial es una estructura que provee una barrera semipermeable para intercambio de macro y micromoléculas, tales como glucosa, electrolitos, los cuales pasan libremente a través de ella al líquido sinovial, y en una medida más limitada, proteínas. Existe evidencia de que se lleva a cabo también un intercambio de vesículas extracelulares secretadas por las células en la

membrana sinovial, que son liberadas hacia la cavidad articular, éstas transportan patrones moleculares asociados a patógenos, o por sus siglas en inglés: PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*), patrones moleculares asociados a daño, o por sus siglas en inglés: DAMPs (*Damage associated molecular patterns*), citocinas, miRNAs (miRNA-21 y miR-29a), auto antígenos y enzimas de degradación. Dependiendo de su tamaño y lo que transportan, las vesículas extracelulares pueden ser de 3 tipos, exosomas (50-100 nm), microvesículas (100-1000nm), y vesículas apoptósicas (100-5000 nm) (Figura 3). Dichas vesículas pueden utilizarse como biomarcadores para enfermedades inflamatorias, como lo es la artritis reumatoide y la osteoartritis. En adición a las vesículas que atraviesan también los vasos sanguíneos de la membrana sinovial, hay microvesículas que son derivadas de plaquetas y acarrean IL-1 $\beta$ , que induce la producción y secreción de IL-8 por parte de los fibroblastos sinoviales, o sinoviocitos tipo A. Éstos contribuyen a la deposición de fibrina para así inducir angiogénesis. Las microvesículas que provienen de células T y de monocitos, tienen un efecto de regulación a la alta la expresión de COX-2 y mPGES-1 por parte de los sinoviocitos tipo A, para así inducir la liberación de MMPS, en específico la MMP9 y MMP14 y la agrecanasa pueden estar en asociación con las microvesículas, así como también lo están muchas más enzimas, como son la  $\beta$ -glucuronidasa y la hexosmaninidasa (Buzas et al., 2014).





**Figura 3.** Esquema que ejemplifica la asociación de las vesículas extracelulares con células proinflamatorias, citocinas, enzimas degradadoras de MEC, y MMPs. En una articulación durante un proceso inflamatorio. (Imagen tomada de: Buzas et al., 2014)

Abreviaturas:

APC: Célula presentadora de antígeno

COX-2: Ciclooxygenasa-2

ECM: Matriz extracelular

EVs: Vesículas extracelulares

miRNA: Micro RNA

MMP: Metaloproteínasa de matriz

mPGES1: Prostaglandina E sintetasa

PMVs: Microvesículas derivadas de plaquetas

Normalmente, el líquido sinovial contiene números muy bajos de eritrocitos, casi inexistentes y un número cuantificable de células nucleadas ( $<1 \times 10^9/L$ ), de lo cual las células mononucleadas son predominantes. La proteína total presente es de un 25-35% de la concentración total del plasma, es decir,  $18 \pm 3$  g/L; se considera que un valor menor a 20 g/L es normal.

## 2.5 Presión intraarticular (PIA) y dinámica del líquido sinovial

Los valores normales en la mayoría de las articulaciones del caballo, varía en un rango de presión negativa (subatmosférica) que va de -2 a -12 mmHg, este valor es considerando en posición neutra de la articulación. En caballos en entrenamiento sin patología articular, esta presión negativa se mantiene y ayuda a su vez al flujo linfático del intersticio y la reabsorción de fluido cuando la articulación se flexiona (e incrementa la PIA), manteniendo así el balance de fluidos en la articulación (Strand, 1994; Bertone, 2004). Presiones  $>80$  mmHg pueden llegar a romper la cápsula del carpo, específicamente en la bursa palmar lateral de la articulación intercarpiana (Bertone, 1996, Datos no publicados).

Los factores determinantes en la PIA son la capacidad de distensión de la cápsula, ángulo de la articulación, historia de distensión excesiva previa, tensión muscular y cargas que recibe la articulación. Todo lo cual, está ligado a presencia o no de patología articular, por ejemplo, caballos con OA crónica, desarrollan engrosamiento y fibrosis de la cápsula articular, lo que resulta en una disminución en la capacidad de distensión, disminuyendo su capacidad de flexión y rango de movimiento. Sin embargo, cuando experimentalmente se distiende una articulación

con líquido sinovial, se observa un incremento en la distensibilidad de la cápsula a diferencia de cuando se distiende con solución salina, probablemente por la falta de la interfase para el intercambio de fluidos (disminución en vasos sanguíneos y distanciamiento entre ellos), lo cual incrementa la tensión superficial y promueve el colapso articular, confirmando la importancia del hialuronato en la lubricación de la articulación durante el ejercicio (Bertone, 2004).

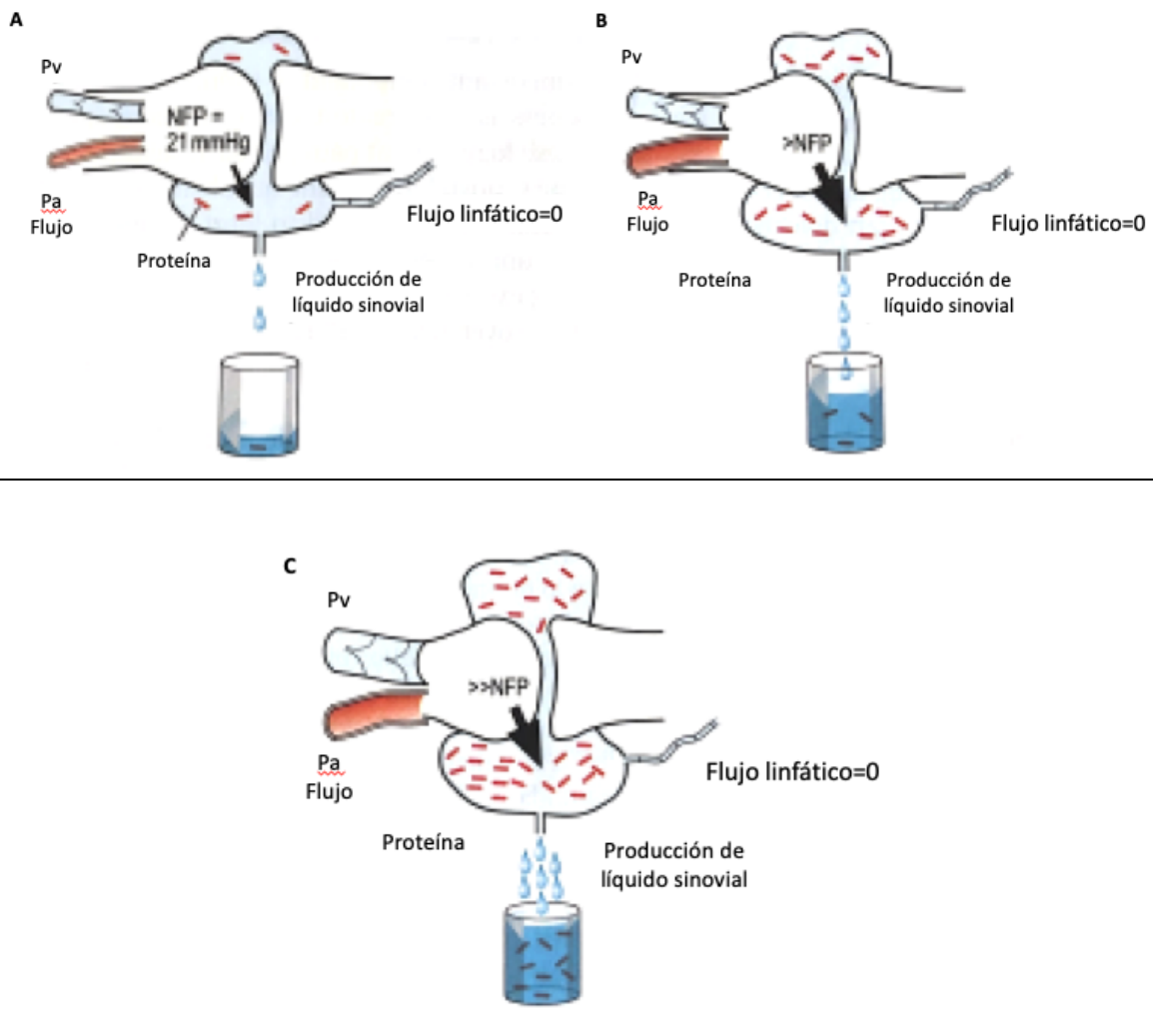
Las articulaciones que desarrollan efusión lentamente, tienen una PIA relativamente menor a las que desarrollan efusión repentina. La efusión articular cuando es dolorosa, causa baja de rendimiento por activación de receptores del dolor periarticulares. Durante el movimiento, el flujo de fluido sinovial de compartimentos de alta presión a los de menor presión, produciendo un reflujo del líquido sinovial en el cartílago articular. Este proceso provee de nutrientes al cartílago articular, que es avascular, y recibe su nutrición y lubricación por lo tanto a través de la difusión del líquido sinovial a través del cartílago. Así es como también el ejercicio ayuda al intercambio y recambio del líquido articular, a manera de bombeo al intersticio y la reabsorción linfática de fluido. En una articulación con enfermedad crónica y efusión, las presiones generadas cuando se encuentra en descanso y mucho más durante el ejercicio, son mayores a la presión de los capilares y por esta razón el recambio de fluido se ve afectado (Bertone, 2004).

Debido a sus características histológicas, fisiológicas y anatómicas, las articulaciones pueden considerarse como un tercer compartimento del espacio intersticial (Hadler, 1981). El intersticio y el líquido sinovial son producto del

ultrafiltrado del plasma al cual se le añade hialuronato. Las fuerzas que movilizan el intercambio de fluido del torrente sanguíneo a través de la membrana y viceversa, son gobernadas por fuerzas de Starling, que no es otra cosa, sino las fuerzas ejercidas por la presión hidrostática y oncótica en el movimiento de fluidos a través de paredes capilares. En la articulación, las fuerzas de Starling dictan el balance de las presiones arteriales y venosas, junto con la coloidosmótica (dada por albúmina sinovial y hialuronato), en donde el flujo de fluido es modificado por la permeabilidad de la membrana sinovial y el área de superficie de los vasos sanguíneos que dictan el coeficiente de filtración. Dichas fuerzas están influenciadas por otros factores, como lo son la gravedad, el movimiento y la estructura de cada articulación. Dichos factores están influenciados por la ecuación de Starling:  $Q = k(P_{cap} - P_{int}) - \sigma(p_{cap} - p_{int})$ , donde el movimiento de los fluidos depende de la presión oncótica e hidrostática entre los capilares y el intersticio. Por todo lo anterior, casi cualquier desbalance en alguno de estos factores, puede alterar el flujo de los fluidos y, por lo tanto, la homeostasis de dicha articulación (Starling, 1896; Bertone, 2004).

La presión neta de filtración (PNF) se ve afectada por la PIA, presencia o no de un proceso inflamatorio y por un incremento o disminución de la presión coloidosmótica del líquido sinovial. Lo que resulta en un incremento en la producción de líquido sinovial y una disminución en el drenaje linfático. En una articulación normal durante el ejercicio, la presión arterial (por el aumento del flujo sanguíneo) y el flujo transsinovial se incrementa, pero la permeabilidad de la membrana se mantiene. En cambio, en una articulación con un proceso inflamatorio activo, la presión arterial y

el flujo trans-sinovial también aumenta, sin embargo, la permeabilidad y por lo tanto la concentración de proteína sinovial y el edema intersticial son incrementados, razón por la cual, se observa un incremento de proteína total en líquido sinovial en articulaciones con algún proceso inflamatorio (Figura 4) (Bertone, 2004).



**Figura 4.** Esquema que ejemplifica las fuerzas vasculares y de fluidos en articulaciones. A) Articulación normal en reposo, B) Articulación normal durante el ejercicio, donde se incrementa el flujo arterial y por lo tanto la presión arterial y

flujo trans-sinovial, sin cambiar la permeabilidad. C) Articulación con proceso inflamatorio (sinovitis) durante el ejercicio, donde la presión arterial, y el flujo trans-sinovial son incrementados. La permeabilidad de la sinovia, la concentración de proteína sinovial y el edema intersticial incrementan, produciendo una cantidad anormal de líquido sinovial. (*Imagen tomada y modificada de: Bertone, 2004*)

*Abreviaturas:*

*Pv= Presión venosa*

*Pa= Presión arterial*

*NFP= Presión neta de filtración*

## 2.6 Estructuras anexas en las articulaciones

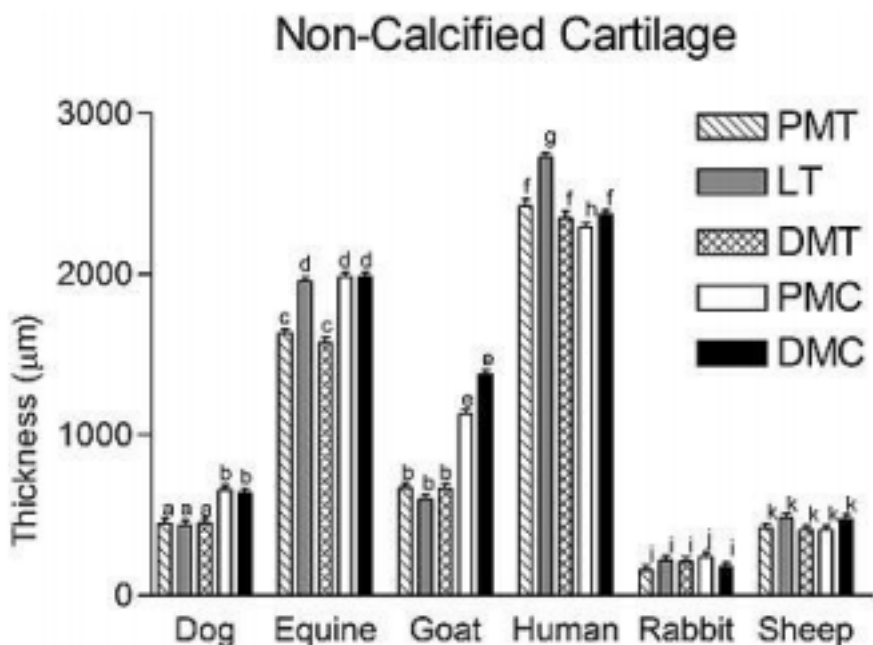
Únicamente dos articulaciones poseen meniscos o discos, la témporo-mandibular (que posee discos) donde se fusionan perfectamente con la membrana sinovial haciendo que cada articulación sea de dos compartimentos diferentes y la fémoro-tibial, donde siempre son intracapsulares (que poseen meniscos). Los meniscos siempre son pares y de forma semilunar, en el caso de la articulación fémoro-tibial, son fijados únicamente por su borde convexo y por lo tanto no pueden dividir la articulación como lo hacen en la témporo-mandibular. Están formados por cartílago hialino, fibrocartílago y tejido fibroso en distintas proporciones, según su desgaste, edad o especie (Getty, 2000 & Dyce, 2010).

Existen otras estructuras llamadas almohadillas sinoviales, formadas donde hay acúmulos de grasa entre las láminas sinovial y fibrosa de la cápsula articular, su principal función es la de permitir a la membrana sinovial acomodar su forma a la parte del hueso con la cual se encuentra en contacto durante el movimiento (Getty, 2000 & Dyce, 2010).

## 2.7 Cartílago articular

Proporciona a las superficies articulares una superficie lubricada, libre de fricción, resistente y muy elástica. En general, el grosor del cartílago articular no calcificado, varía entre especies, sin embargo, el grosor que presenta el humano, es muy cercano al grosor que presenta el caballo, lo cual lo hace el modelo animal más adecuado para investigación de ensayos en humanos (McIlwraith, 2011).

El grosor en promedio del cartílago articular en humanos es de 2.2-2.5 mm, en caballos 1.5-2 mm, en conejos 0.3 mm, en cabras 0.7-1.5 mm, en ovejas 0.4-0.5 mm y en el perro 1.3 mm (Figura 5) (McIlwraith, 2011).



**Figura 5.** Esquema que representa un comparativo del grosor en milímetros del cartílago articular no calcificado de distintas especies domésticas (perro, caballo, cabra, conejo y oveja) con el humano, en diversas regiones de la articulación

fémoro-tibiopatelar. PMT: *Proximal medial trochlear* (tróclea medial proximal); LT: *lateral trochlear* (tróclea lateral); DMT: *Distal medial trochlear* (tróclea medial distal); PMC: *Proximal medial chondyle* (cóndilo medial proximal); DMC: *Distal medial chondyle* (cóndilo medial distal). (Tomado de: McIlwraith, 2011)

El cartílago es desarrollado a partir del mesénquima, sin embargo, en la cabeza, es de origen ectodérmico y no mesodérmico, ya que evoluciona de células que migran desde la cresta neural. El cartílago puede ser de 3 diferentes tipos: hialino, elástico o fibroso (Geneser, 2001).

La función principal del cartílago articular es la de transferir y absorber cargas, y esto es gracias a su composición rica en colágena tipo II, que provee fuerza tensil y subunidades con carga negativa que provee dureza compresiva. Ésta carga negativa provista a la matriz extracelular, provee un área de almacenamiento de péptidos de extensión (péptidos-E) del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, o por sus siglas en inglés: IGF-1 (insulin-like growth factor 1).

El cartílago articular conforme la edad del animal avanza, pierde grosor y la fuerza mecánica para amortiguar y absorber cargas, se pierde también, a este proceso se le conoce como: osteoartrosis (Morris & Treadwell, 1994).

### 2.7.1 Condrocitos

Los condrocitos son el único componente celular presente en el cartílago articular. Constituyen 1-2% de todas las estructuras que componen el cartílago. Su función principal es la de sintetizar colágena II y proteoglicanos en la MEC; así como también moléculas de adhesión celular, de las cuales la mayor estudiada es la condronectina, que es una glicoproteína que fija a los condrocitos a la colágena II.



A diferencia de la fibronectina, la condronectina no requiere unirse directamente a la colágena sin que el condrocito se una primero a ésta, sino que se une a monómeros de proteoglicanos (Hewitt et al., 1982).

Los condrocitos inmaduros tienen un citoplasma basófilo, y en microscopía electrónica puede distinguirse un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado. La basofilia aumenta a medida que el proceso de diferenciación a condrocito maduro, esta basofilia puede tornarse gradualmente en acidofilia y se retrae el retículo endoplásmico rugoso. Los condrocitos maduros contienen cantidades importantes de gránulos de glucógeno y pequeñas gotas de lípidos (Geneser, 2001).

### 2.7.2 Cartílago hialino

El cartílago hialino recibe ese nombre por su aspecto en fresco como vidrioso-azulado, la palabra “hialino” proviene del griego *hyalos* que significa: vidrio. Es considerado como el tipo de cartílago más abundante en un organismo mamífero adulto, está presente en los anillos traqueales, laringe, cartílagos costales, en la región nasal, y en las superficies articulares. Excepto por éstas últimas, el cartílago hialino está recubierto por una delgada capa de tejido conjuntivo de colágeno denso, llamado pericondrio, que, al estar altamente innervado e irrigado, tiene como función la de proveer de nutrientes al cartílago que recubre (Geneser, 2001).

El cartílago articular, al carecer de pericondrio y al caracterizarse por ser avascular, aneural y alinfático, tiene una capacidad limitada de regeneración. Su componente principal es MEC (compuesta principalmente por fibras de colágena II incluidas en una sustancia fundamental, que es un gel coloidal firme y rico en agua).

Específicamente, se menciona que posee 3 componentes: Acuoso (70-80%), sólida (matriz extracelular 20-30%) y fase celular (condrocitos 1-2%) (Geneser, 2001).

El cartílago articular histológicamente presenta varias zonas o regiones, partiendo desde el hueso subcondral, le sigue la zona calcificada, zona radial o profunda, zona transicional o intermedia y zona superficial (Figura 6).

Si bien, el cartílago articular carece de pericondrio, éste tiene una delgada línea brillante, llamada "*Lamina splendens*", que es unida a las fibras de colágena. Ésta estructura fue descrita por primera vez en 1951 por MacConnail utilizando microscopía de luz polarizada y microscopía de interferencia (Geneser, 2001; Hughes et al., 2005).

Inmediatamente por debajo de la *Lamina splendens*, se encuentran varias capas de fibrillas de colágena que forman una especie de red que corre paralela a la superficie articular, éstas tienen una profundidad de 3  $\mu\text{m}$  en cartílago articular de ratón. (Hughes et al., 2005)

### 2.7.3 Formación de cartílago

En etapas embrionarias, a partir del mesénquima, se originan centros de condricación o núcleos cartilaginosos; que al diferenciarse las células mesenquimales, aumentan de tamaño que es cuando comienzan a secretar la sustancia fundamental metacromática y tropocolágeno, que al polimerizarse fuera de la célula, se forman las microfibrillas de colágeno, dando como origen a la MEC. A medida que las mitosis y diferenciación de condroblasto a condrocito maduro

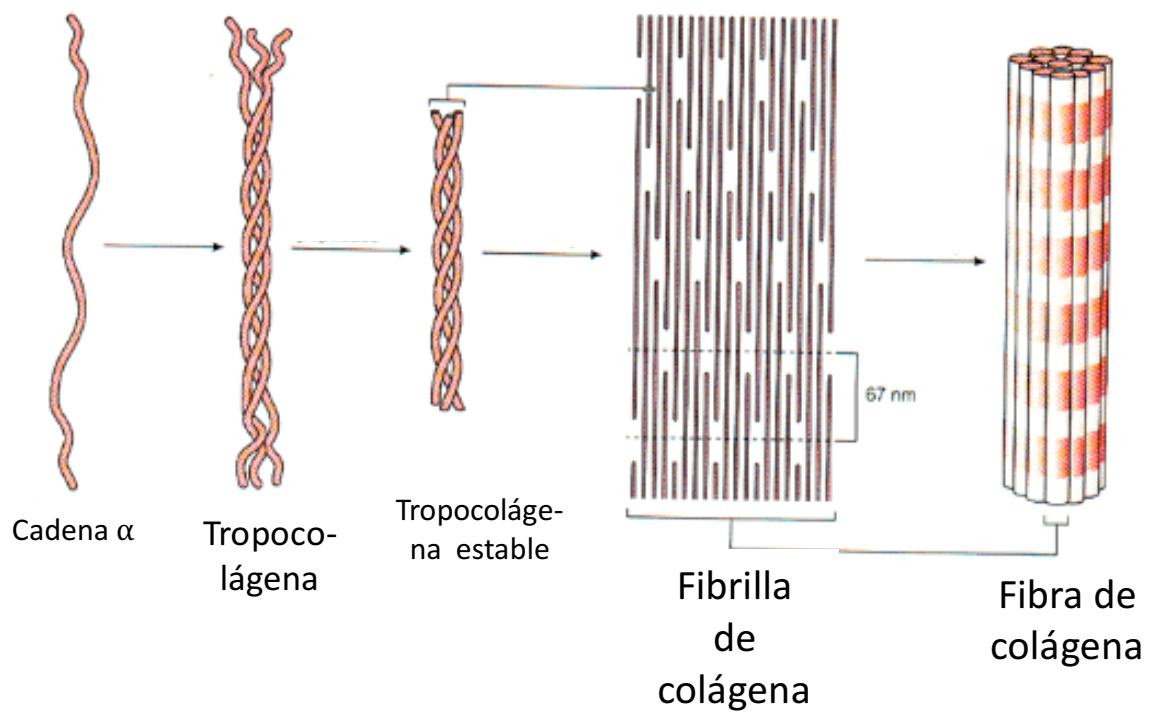
aumentan, se ubican en pequeños espacios llamados lagunas. Es importante destacar que los condrocitos son los únicos responsables de sintetizar MEC. El crecimiento o desarrollo del cartílago puede darse de dos formas, la primera es conocida como crecimiento intersticial, que se da gracias a los centros de condricificación, donde las células mesenquimales se comienzan a diferenciar a condroblasto, que, al dividirse por mitosis, las células hijas ya son denominadas: condrocitos que forman una delgada pared de matriz; y al dividirse nuevamente, se forman pequeños grupos de 4 células que, a su vez, pueden dividirse también. Estos pequeños grupos se denominan en inglés como *clusters* o grupos isógenos o condronas. Reciben este nombre porque las células (condrocitos) que contienen, son originadas por divisiones mitóticas a partir de un único condrocito progenitor (Geneser, 2001).

Otra forma de crecimiento del cartílago es la denominada crecimiento aposicional. Esta forma de crecimiento de cartílago hialino tiene lugar en cualquier tipo de cartílago hialino, excepto por el cartílago articular, donde su crecimiento es únicamente gracias a los centros de condricificación. El crecimiento aposicional consiste en la diferenciación de las células mesenquimales a condrocitos, que están presentes en el pericondrio, que contiene una estructura llamada capa condrogénica, que contiene lagunas de condrocitos recién formados ubicadas inmediatamente por debajo del pericondrio (Geneser, 2001).

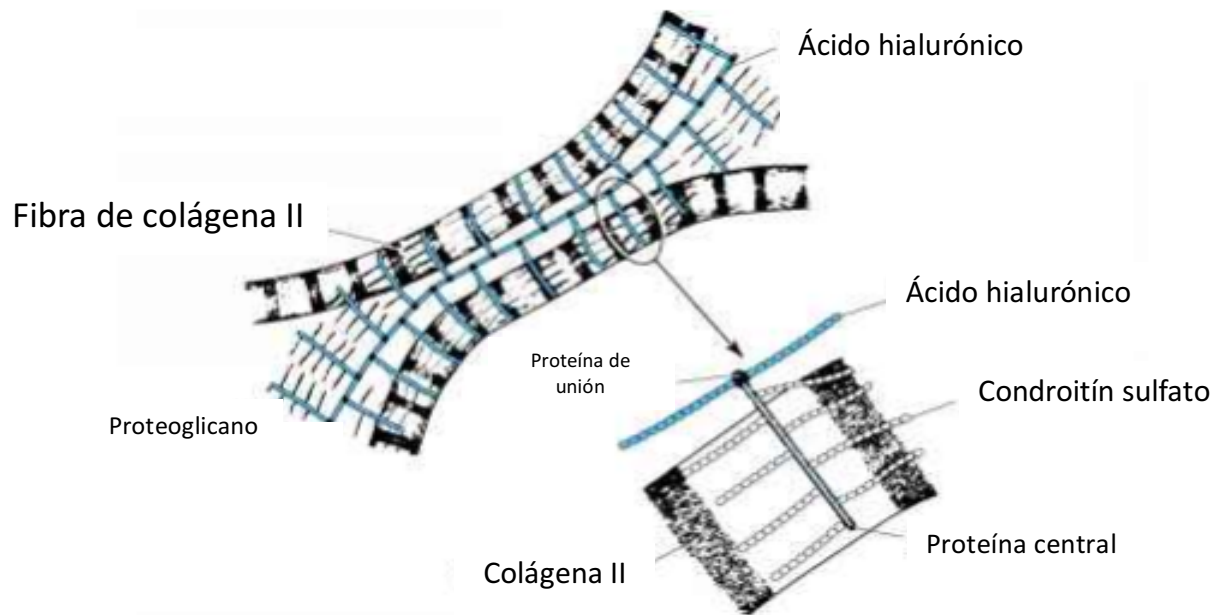
#### 2.7.4 Matriz extracelular

El cartílago articular está compuesto por condrocitos, matriz extracelular (MEC) y agua. La MEC rodea los condrocitos y les provee propiedades estructurales y biomecánicas. Está compuesta por colágena tipo II, aunque pueden encontrarse colágena IX, X y XI, y en menor medida la tipo III, V, VI, XII, y XIV; la función de éstos otros tipos de colágena, es la de entretelar el reticulado de fibras de colágena II estabilizándolo; y distintos tipos de proteoglicanos, los cuales pueden ser: proteoglicanos pequeños ricos en leucina o por sus siglas en inglés SLRPs (*Small leucine-rich proteoglycans*), en los cuales están incluidos decorina, fibromodulina, biglicano, lumican, epifican, y keratan; proteoglicanos mucho más grandes que pueden considerarse macromoléculas que forman agregados con ácido hialurónico, como lo hace el agregan y condroitín sulfato (Geneser, 2001).

Hablando específicamente de la colágena tipo II, es denominada también colágena fibrilar tipo II, ya que está formada por 3 cadenas alfa 1 ( $\alpha 1$ ) llamada triple hélice de colágena (1.5 nm) que se enrolla con orientación a la izquierda. La colágena tipo I posee fibrillas de colágena también, pero a diferencia de la tipo II, están compuestas únicamente por 2 cadenas alfa 1. A estas estructuras en triple hélice de la colágena II se le denomina: tropocolágena. Cada una de las cuales se unen entre sí por telopéptidos, formando así una red de varias cadenas de tropocolágena llamadas fibrillas de colágena (50 nm) que, en conjunto con otras, forman fibras de colágena (350 nm) (Figura 6). Dichas fibras interactúan íntimamente con los glucosaminoglicanos, ácido hialurónico y condroitín y keratán sulfato (Figura 7) (O'Donnell, 2021; Junqueira, et al. 2013).



**Figura 6.** Esquema que ejemplifica la formación de las fibras de colágena. (Imagen tomada y modificada de: Mescher, 2021).

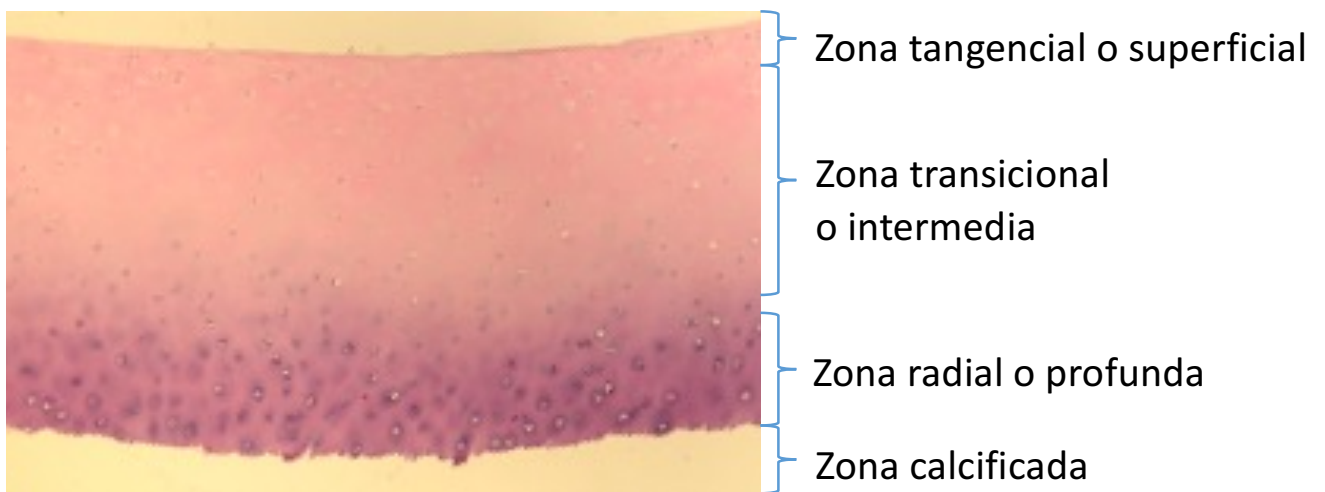


**Figura 7.** Esquema que demuestra la interacción de las proteínas que conforman la MEC. (Proteínas de unión, proteoglicanos, colágena II, condroitín sulfato y ácido hialurónico). (Imagen tomada y modificada de: Miller EJ, 1982).

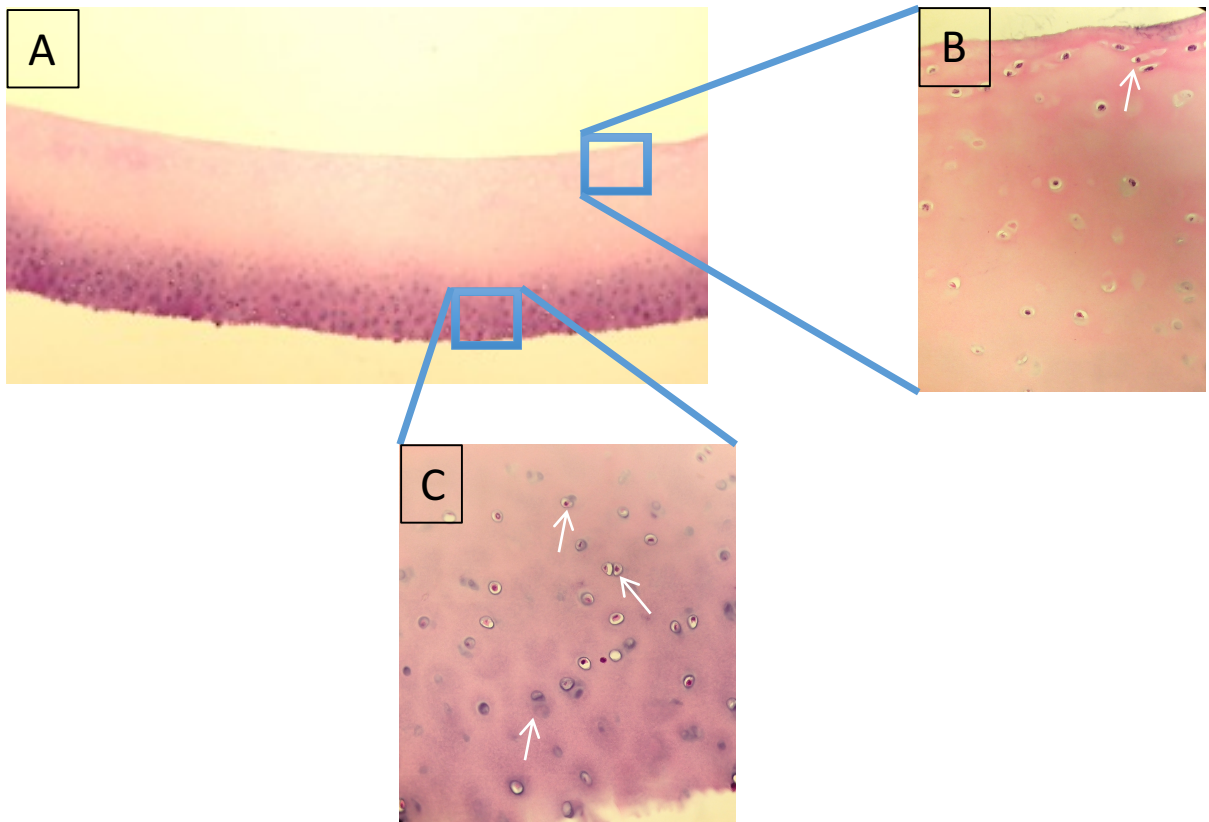
La MEC puede dividirse en dos: la matriz territorial (MT) y la matriz interterritorial (MIT). La función principal del cartílago articular es la de amortiguar impactos dados entre los huesos, gracias a la estructura del tejido dada por el arreglo de la abundante matriz extracelular (MEC). Mientras que la función del cartílago hialino que no es articular es la de dar estructura, soporte y funcionalidad. Los condrocitos tienen un arreglo perpendicular en la capa más profunda, y conforme se aproximan a la capa superficial, éstos se acomodan de manera paralela a la superficie articular. Éste arreglo está dado por la MT y la MIT encontradas dentro de la zona profunda (Figuras 8 y 9) (Getty, 2000; Geneser, 2001).

La MT rodea los grupos isógenos y es de apariencia basófila, gracias a los grupos

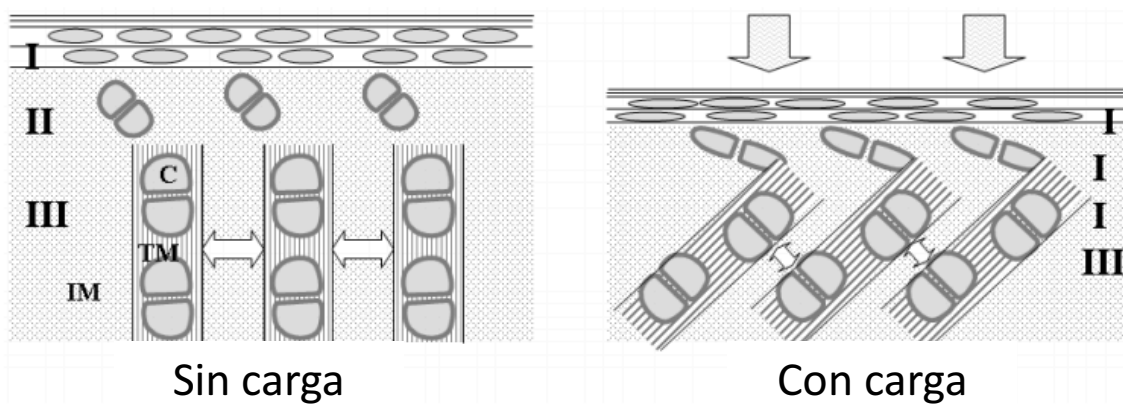
sulfato que son muy ácidos en los proteoglicanos sulfatados que son abundantes en esta zona, y acomoda a los condrocitos a manera de hileras o columnas, mientras que la MIT le da estructura al tejido adyacente a éstas. Este acomodo, le confiere la capacidad de elasticidad en el cartílago en el sentido en el que puede deformarse al resistir cargas o presiones y recuperar su forma original (Figura 10) (Geneser, 2001; Hughes, 2005).



**Figura 8.** Microfotografía de una sección de cartílago articular de caballo adulto normal mostrando sus distintas capas. La parte superior corresponde a la superficie articular y la inferior a la adyacente al hueso subcondral. Tinción H & E. 1000x.



**Figura 9.** Microfotografía de un corte de grosor completo de una sección de cartílago articular de caballo adulto normal, donde en la zona superficial se observa el acomodo aplanado de los condrocitos (flecha blanca) y en la zona radial o profunda se observan las lagunas conteniendo grupos isógenos (flechas blancas). Tinción H & E. A: 100x, B y C: 400x



**Figura 10.** Diagrama donde se ilustran los efectos de la descarga (izquierda) y carga (derecha) en los distintos estratos del cartílago articular. TM: Matriz territorial, IM: Matriz interterritorial, I: Zona superficial, II: zona transicional o intermedia, III: Zona radial o profunda. (Tomado y modificado de: Hughes et al., 2005.)



### 2.7.5 Cartílago fibroso

También llamado fibrocartílago es una forma de transición entre el tejido conjuntivo denso y cartílago hialino. Se compone de una combinación de fibras densas de colágeno y condrocitos ubicados en lagunas y rodeados por matriz extracelular. El tipo de colágena predominante es la tipo I, es decir que es el mismo tipo de tejido conjuntivo en general que está presente en todo el organismo. Está presente en gran cantidad en los bordes articulares, meniscos y discos intervertebrales, así como también en regiones de inserción de ligamentos y tendones cerca del cartílago articular hialino. Se continúa gradualmente en el tejido circundante (tejido conjuntivo de colágena, cartílago hialino o hueso) y también carece de pericondrio (Geneser, 2001).

### 2.7.6 Cartílago elástico

Es muy similar histológicamente al cartílago hialino, excepto porque se compone principalmente además de condrocitos y fibras de colágena tipo II, por elásticas alrededor de las lagunas. Estas fibras le proveen la cualidad de ser más elástico y flexible que el hialino. Está presente en los cartílagos laríngeos (epiglotis y porción corniculada del aritenoides), conducto auditivo externo y tubo auditivo. En caballos no existe el tubo auditivo como el encontrado en otras especies (trompa de Eustaquio en humanos), sino que poseen un par de bolsas guturales que son divertículos huecos de los tubos auditivos (Geneser, 2001).

### 3. Osteoartritis

Se define como una enfermedad crónico degenerativa que cursa con desgaste del cartílago articular e inflamación de estructuras adyacentes, comúnmente asociada a trauma continuo o bien, envejecimiento.

El cartílago conlleva una degeneración “natural” asociada a edad o a actividad física del individuo, se estipula que conforme el individuo se va haciendo de edad más avanzada, el cartílago pierde grosor y por lo tanto, su función de minimizar impactos, a este proceso natural se le llama osteoartrosis (Verschure et al., 1996).

Si bien, la osteoartrosis es la pérdida paulatina de grosor de un tejido cartilaginoso y es un estado considerado natural, en algunas ocasiones puede conllevar a desarrollar una condición llamada osteoartritis; que se define como una enfermedad crónico-degenerativa que cursa con un desgaste del cartílago articular e inflamación de estructuras adyacentes, y aunque es comúnmente asociada a envejecimiento, la osteoartritis no tiene preferencia por sexo, raza o edad. Todo este proceso, conlleva a la pérdida de dicha articulación teniendo como resultado final una artrodesis. Existen diversas causas para el desarrollo de osteoartritis, tales como: trauma directo, inestabilidad articular, pérdida de congruencia de superficies articulares, infección por trauma directo o por vía hematológica (artritis séptica), osteocondrosis disecante, osteoartrosis o por desórdenes de origen autoinmune, como la artritis reumatoide.

El tiempo que tarda una articulación en llegar a un estado de artrodesis es bastante

prolongado y doloroso, teniendo como consecuencia pérdidas económicas tanto en población humana (disminución de población económicamente activa) como en animales (principalmente caballos). En un estudio realizado en EUA, se estimó que en 2010 en una población diversa de caballos deportivos y de diversas edades, las pérdidas económicas ascendieron aproximadamente a 700 millones de dólares en tratamientos, tales como: antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales, ácido hialurónico, glucosaminoglicanos sistémicos e intraarticulares, tratamientos biológicos autólogos, suplementos nutricionales y terapias de rehabilitación como la terapia de ondas de choque extracorpórea, se estima que un caballo por año, puede resultar en costos superiores a los 15,000 USD; por esta razón, la investigación en medicina regenerativa y deportiva han centrado su atención a desarrollar terapias que ralenticen dicho proceso inflamatorio y tratar de regenerar el daño que haya sufrido el cartílago (Oke & McIlwraith, 2010).

Ya que como se mencionó anteriormente, el cartílago articular tiene una capacidad limitada de regeneración, por lo cual, las investigaciones realizadas hasta el momento, se centran en modificaciones genéticas de condrocitos o células troncales para sobre expresar factores de crecimiento necesarios para la regeneración del cartílago, para depositar dichas células en andamios intralesionales para así llegar a un estado de homeostasis del tejido y regreso a la función deportiva anterior, aunque lamentablemente, si bien ha habido resultados favorables, no se ha logrado hasta el momento restituir la arquitectura normal del cartílago para así detener esta condición (Goodrich et al., 2006).

### 3.1 Inflamación y daño articular

El problema central del daño articular es el desarrollo de un proceso inflamatorio exacerbado que conlleva a una cascada de eventos irreversibles que conforme pasa el tiempo, se daña más y más el cartílago sin recuperar su función anterior (Choukair et al., 2014).

Aunque el cartílago articular posee células metabólicamente activas, tiene una capacidad limitada de reparación, dada su naturaleza avascular, alinfática y aneural. Los defectos superficiales que no penetran hasta el hueso subcondral denominados como: erosión articular, pueden persistir durante largos periodos y muchas veces es una articulación dolorosa. La MEC se piensa que puede fluir o migrar, facilitada por las diferencias de cargas y el movimiento normal hasta el lugar del defecto, para repararlo. Histopatológicamente, los condrocitos se congregan en cúmulos o grupos llamados *clusters*, los cuales son evidencia de un daño local, causando un incremento en la replicación de los mismos, como respuesta al daño; sin embargo, esta respuesta siempre es ineficiente, causando que estos defectos nunca se reparen o bien, nunca progresen, a menos que por las cargas que el cartílago normal se encarga de disipar, hagan que el hueso subcondral reaccione causando esclerosis.

Cuando un defecto se extiende hasta el hueso subcondral, el cartílago conlleva a una metaplasia y es rápidamente sustituido por fibrocartílago.

El cartílago articular al ser avascular, puede pensarse que no tiene participación en la respuesta inflamatoria, sin embargo, no es así, ya que la destrucción del cartílago

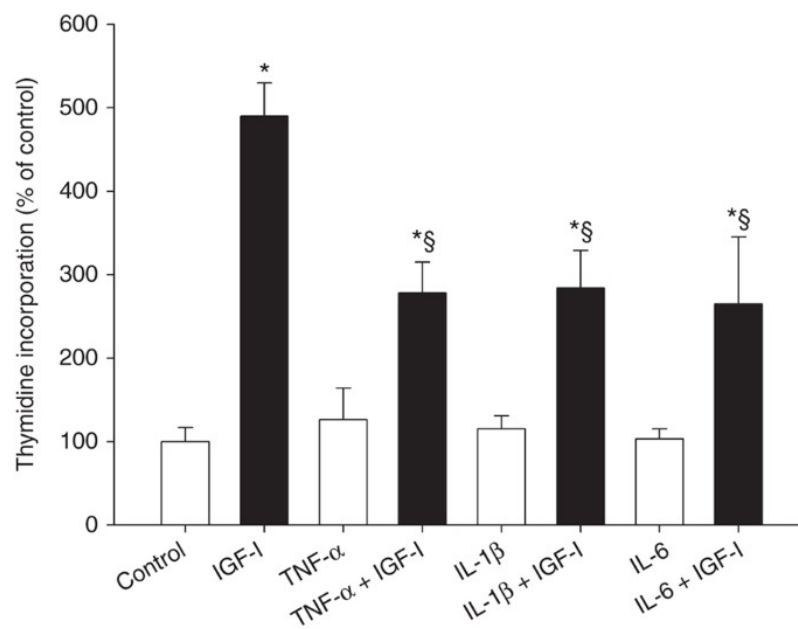
articular es una combinación de factores, tales como la destrucción de la matriz extracelular causada por enzimas degradadoras de matriz (metaloproteinasas de matriz o MMPs) y falla en la producción de matriz extracelular *de novo*, ocasionando que los condrocitos se degeneren o se necrosen. Estos cambios pueden llevarse a cabo con daño directo al cartílago o bien indirectamente por daño a la sinovia.

Las metaloproteinasas de matriz, o por sus siglas en inglés: MMPs, (*matrix metalloproteinases*) son enzimas que degradan la matriz extracelular y son un componente constitutivo normal del cartílago articular, pero en condiciones normales, se encuentran en un estado inactivo y son reguladas por inhibidores de metaloproteinasas de tejido (por sus siglas en inglés: *TIMPs*).

Una simple erosión del cartílago, puede conllevar a la pérdida de proteoglicanos que altera la permeabilidad del cartílago, haciendo que los nutrientes esenciales para su nutrición presentes en el líquido sinovial, no lleguen a su destino y conlleve a disrupción de fibras de colágena de la superficie articular causando que dichas fibras se condensen en un fenómeno llamado fibrilación, que a su vez causa que existan fisuras o indentaciones a lo largo del eje vertical (perpendicular a la superficie articular). La falta de difusión de nutrientes a través de la matriz, ocasiona que los condrocitos comiencen a degenerarse y necrosarse, haciendo que el cartílago se convierta en un tejido hipocelular, haciéndolo más propenso aún a que la reparación no se lleve a cabo. Los condrocitos restantes, comienzan a congregarse formando los ya mencionados *clusters* (Geneser, 2001).

Los condrocitos necróticos y degenerados son altamente inmunogénicos,

ocasionando que, por quimiotaxis, células inflamatorias infiltran en la sinovia, liberando sustancias y citocinas proinflamatorias tales como prostaglandinas, óxido nítrico, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 (IL1) y demás neurotransmisores como sustancia P, entre otras citocinas y quimocinas, que se incrementan en articulaciones con artritis. Específicamente, el TNF $\alpha$  inhibe la vía de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, por lo cual, la respuesta inflamatoria, además de ocasionar falla en la síntesis de MEC y su degradación, se inhibe la vía de señalización para proliferación y supervivencia de condrocitos (Choukair et al., 2014; Liu et al., 2017). (Figura 11)



**Figura 11.** Ensayo de incorporación de timidina que demuestra la proliferación celular inducida por IGF-1 y su inhibición en presencia de citocinas proinflamatorias. La proliferación celular es marcadamente inhibida cuando se coincide IGF-1 con dichas citocinas, ya que hay una menor incorporación de timidina. (Imagen tomada de: Choukair et al., 2014)

Las prostaglandinas y el óxido nítrico inhiben síntesis de proteoglicanos, la IL1 y TNF $\alpha$  son citocinas secretadas por macrófagos en la capa subíntima de la sinovia, que promueven a su vez mayor producción de prostaglandinas, óxido nítrico y proteasas neutrales producidas por fibroblastos en la sinovia y condrocitos. El incremento en la concentración de estos agentes disminuye la síntesis de MEC y favorece su destrucción (Liu et al., 2017).

El infiltrado inflamatorio a la sinovia, sinoviocitos o condrocitos pueden producir enzimas lisosomales (colagenasas, elastasas, catepsinas y arilsulfatasas) y proteasas neutrales son capaces de degradar proteoglicanos y colágena. El infiltrado inflamatorio ocasiona que la sinovia reaccione hipertrofiándose, impidiendo que el drenaje normal del fluido se lleve a cabo ocasionando una efusión articular y ocasionando a su vez, pérdida de propiedades lubricantes del líquido sinovial debido a una degradación del ácido hialurónico ocasionada por sistemas de superoxidación dados por neutrófilos (Liu et al., 2017).

Liu et al, en 2017, identificaron el papel protector de IGF-1 en condiciones de hipoxia, donde observaron que en apoptosis inducida por hipoxia existe un incremento de especies reactivas de oxígeno y autofagia a diferencia de lo observado en condiciones de normoxia. Las células donde la vía de IGF-1 no es bloqueada, se observó una tasa de apoptosis, autofagia y producción de especies reactivas de oxígeno menor que en las células donde se bloqueó el receptor para IGF-1 (IGF-1R), donde a su vez, la vía de señalización PI3/Akt/mTOR juega un papel importante en expresar proteínas de supervivencia celular ante procesos de hipoxia.

En algunas ocasiones, la sinovia puede desplegar una membrana que recubre al cartílago articular, llamada *Pannus*, lo cual no es más que una proliferación de un tejido fibrovascular e histiocítico. Es un tejido altamente vascular, rico en histiocitos y macrófagos que ocasionan lisis del cartílago. Con el paso del tiempo, ambas superficies articulares pueden recubrirse por este tejido, ocasionando así la anquilosis de la articulación. En artritis reumatoide, el pannus puede generarse tanto en la sinovia, como en el hueso subcondral, ocasionando daños tanto en las capas profundas del cartílago (capa calcificada y radial) como en la superficial. La anquilosis se lleva a cabo gracias a la formación de osteofitos periarticulares, y por hiperplasia e inflamación de la sinovia (sinovitis). Estos osteofitos no crecen continuamente, pero una vez formados, persisten como múltiples proyecciones óseas y son formados como resultado de degeneración celular de la articulación que libera citocinas como TGF $\beta$  (Geneser, 2001; Cajas et al., 2020).

### 3.2 Tratamientos para la OA

Se han propuesto varios modelos para la reparación del cartílago articular. Existen varios componentes esenciales en la osteoartritis, el primero es la inflamación, razón por la cual, se realizan inyecciones intraarticulares de antiinflamatorios esteroidales, sin embargo, esta terapia además de solamente ralentizar el proceso de OA y aliviar el dolor local, frecuentemente, debido a su uso indiscriminado, conlleva a la progresión de la enfermedad generando cambios degenerativos en el cartílago articular, llamada artropatía esteroideal (Frisbie, 2005; García-Lacy et al., 2022). Conjuntamente con los antiinflamatorios esteroidales, se aplican glucosaminoglicanos para así, tratar de reestablecer el componente de la MEC, sin



embargo, aunque logran mejorar la viscosidad del líquido sinovial y reestablecer de cierta manera la composición de proteoglicanos en el cartílago, es también insuficiente para lograr regenerar el cartílago articular. Empíricamente se ha utilizado por vía intraarticular insulina de rápida acción, lo cual tiene un efecto de regulación a la alta (*up-regulation*), por medio de la sobreexpresión de IGF-1 en líquido sinovial (García-Lacy et al., 2022).

Durante los últimos años, se han desarrollado técnicas quirúrgicas para tratar de que por medio de terapia celular (células mesenquimales, autoinjertos y xenoinjertos de condrocitos), parches de periostio, y kits comerciales de plasma rico en plaquetas y antagonistas de receptor de interleucinas, o combinaciones de ambas, se han usado en la práctica clínica en equinos, con resultados moderadamente favorables.

Con el avance de la investigación, se tornó de gran importancia un factor de crecimiento en específico, que es de vital importancia para la regeneración del cartílago articular, el cual es el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (por sus siglas en inglés: *IGF1*), el cual al ser sobreexpresado en condrocitos modificados genéticamente, se logran resultados mucho más favorables que los tratamientos anteriores (Goodrich et al., 2006).

Esta proteína, posee cualidades muy interesantes. Se trata de una proteína multimérica, es decir, que por procesos de edición post traduccionales, se generan al menos 4 isoformas en caballos, que probablemente, tienen funciones biológicas diferentes, que se discutirán más adelante. Hasta el día de hoy, no existe ningún

trabajo que tome en cuenta estas isoformas para el tratamiento de osteoartritis en caballos. Nosotros postulamos que probablemente la proteína madura, quizás no es suficiente para una mayor tasa de regeneración del cartílago articular, por lo cual creemos que es de vital importancia, la caracterización de las posibles isoformas presentes en el cartílago articular, para así orientar terapias hacia la isoforma cuya expresión se vea atenuada en procesos de inflamación articular (uniprot.com).

### 3.3 Regeneración de cartílago

El cartílago como ya se mencionó con anterioridad, posee una capacidad limitada de regeneración dada por su bajo componente celular y por la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos. Dependiendo de la profundidad del daño, el cartílago puede permanecer indoloro por largos periodos (incluso años), como lo sería por ejemplo un defecto grado 1-2 y probablemente grado 3 (Clasificación *ICRS*) (Van der Meijden et al., 2012).

El principal tipo de daño que sufre el cartílago es por trauma directo, es decir, de tipo mecánico, que a su vez desencadenará la cascada de inflamación, misma que gracias a citocinas proinflamatorias y secreción de enzimas degradadoras de MEC tales como: metilmetaloproteasas y agreganasas principalmente. Son a su vez, encargadas de continuar exacerbando el daño presente en la articulación, haciendo que los condrocitos, cuya única finalidad es la de sintetizar MEC, sean incapaces de regenerar el defecto, siendo rebasado por la acción de estas enzimas. Razón por la cual, el cartílago sufre de una metaplasia a un tejido de menor calidad, denominado fibrocartílago.

### 3.4 Participación del IGF-1 en procesos de regeneración de cartílago articular

Existe evidencia de que IGF-1 juega un papel de suma relevancia en la regulación de procesos de regeneración de distintos tipos de tejidos; al respecto, por ejemplo, Nixon *et al.* (2009) identificaron en caballo 2 isoformas de IGF-1, una corta en la que por *splicing* alternativo en el RNAm donde se elimina el exón 4, y una larga, en la que se retiene el exón 4, presentando además expresión tejido-específica. También demostraron que la isoforma predominante en animales jóvenes es la forma IB, misma que con la edad del individuo va disminuyendo su expresión. Mientras que, en procesos patológicos como la osteoartritis, sólo se ha detectado la expresión de la isoforma IA (corta). (Nixon et al, 1999)

Derivado de estudios realizados en ratón, se postula que la IGF-1 proveniente de macrófagos (M2) es vital para la regeneración del músculo estriado esquelético. Estos macrófagos son activados principalmente por IL-10 y glucocorticoides, produciendo a su vez, IL-10 y TGF $\beta$ , con lo que se estimula la angiogénesis y el remodelado de la matriz extracelular; siendo la isoforma más expresada, la IGF-1A. En dicho trabajo, se obtuvieron datos suficientes para concluir que la isoforma IA proveniente es esencial en la regeneración del tejido y para la transición de inflamación a reparación. (Tonkin et al, 2012)

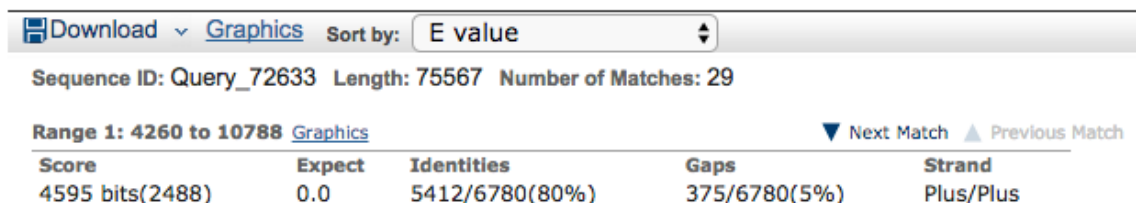
En cartílago articular, el IGF-1 es el factor de crecimiento anabólico más importante para la regulación de funciones metabólicas del cartílago normal y con defectos (lesiones) (Verschure et al, 1996; Goodrich et al, 2007). Su función principal es la

de balancear la síntesis de proteoglicanos con la degradación de la matriz extracelular para así mantener la funcionalidad del cartílago. Se ha descrito que la respuesta transcripcional de IGF-1 en cartílago dañado es mínima a las 2-16 semanas posteriores a la lesión. (Nixon et al, 1999)

La deficiencia de esta proteína, contribuye en una baja respuesta para reparar el cartílago articular posterior a una lesión, precipitando así el desarrollo de degradación por osteoartritis. El uso de IGF-1 exógena, tiende a mejorar el proceso de reparación mediante producción de MEC, síntesis de colágena tipo II y preserva el fenotipo de los condrocitos. Dada su poca producción en estadios tempranos de la enfermedad articular degenerativa, se han hecho estudios donde se suplementa esta proteína por vía exógena para así incrementar la producción de proteoglicanos y colágena tipo II para mejorar la MEC del cartílago articular. La mejor manera de hacerlo hasta el día de hoy, es mediante trasplantes de condrocitos modificados genéticamente para producir esta proteína. Por otra parte, esta proteína puede estar implicada en influenciar diferenciación de condrocitos a partir de células provenientes del “*pool*” subcondral. Ambos mecanismos aceleran la reparación de cartílago articular<sub>8</sub>. Sin embargo, ninguno de estos estudios realizados especifica qué isoforma de la proteína es la que se está suplementando, o si es solamente el péptido maduro (Nixon et al., 1999; Verschure et al., 1996).

## 4 Análisis bioinformático del gen *Igf-1*

Se analizaron las secuencias del gen para IGF1 de ratón, humano y caballo, depositadas en la base de datos de NCBI. Al comparar las secuencias se determinó una homología de alrededor del 80%, por lo que los genes de estas especies están conservados en cuanto a secuencia génica. (Figuras 12-14)



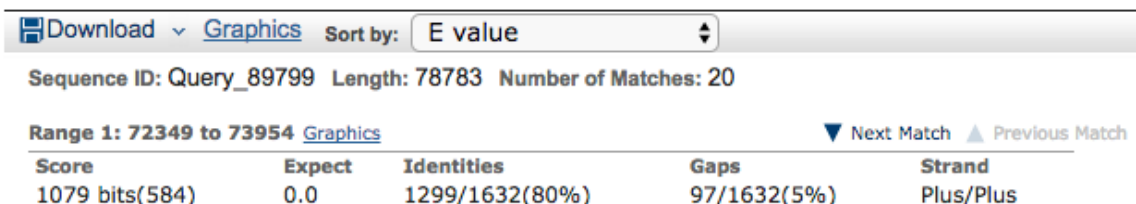
Download [Graphics](#) Sort by: E value

Sequence ID: Query\_72633 Length: 75567 Number of Matches: 29

Range 1: 4260 to 10788 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
4595 bits(2488)	0.0	5412/6780(80%)	375/6780(5%)	Plus/Plus

**Figura 12.** Alineamiento de genes *Igf-1* de Humano y caballo. Mostrando 80% de identidad.



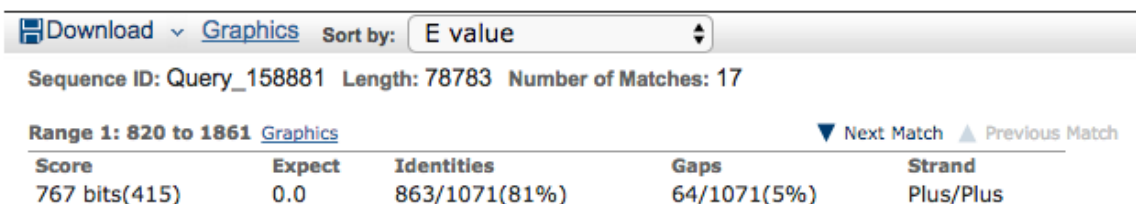
Download [Graphics](#) Sort by: E value

Sequence ID: Query\_89799 Length: 78783 Number of Matches: 20

Range 1: 72349 to 73954 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1079 bits(584)	0.0	1299/1632(80%)	97/1632(5%)	Plus/Plus

**Figura 13.** Alineamiento de genes *Igf-1* de Humano y ratón. Mostrando 80% de identidad.



Download [Graphics](#) Sort by: E value

Sequence ID: Query\_158881 Length: 78783 Number of Matches: 17

Range 1: 820 to 1861 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
767 bits(415)	0.0	863/1071(81%)	64/1071(5%)	Plus/Plus

**Figura 14.** Alineamiento de genes *Igf-1* de caballo y ratón, mostrando 81% de identidad.

Posteriormente, se realizó un análisis de las variantes por *splicing* alternativo de humano arrojó lo siguiente:

- Cuatro variantes reportadas y verificadas (*ensemble.com*, *ncbi.com*)

1: 4 exones (IA)

2: 4 exones (IIA)

3: 5 exones (IC)

4: 4 exones (IIA)

5: 6 exones (IC)

6: 2 exones (IA)

El mismo análisis para ratón:

- Variantes por *splicing* alternativo (*ensemble.com*):

1: 4 exones

2: 4 exones

3: 5 exones

4: 5 exones

5: 5 exones

6: 4 exones

7: 5 exones

8: 5 exones

- 9 variantes de mensajeros reportadas (*ncbi.com*):

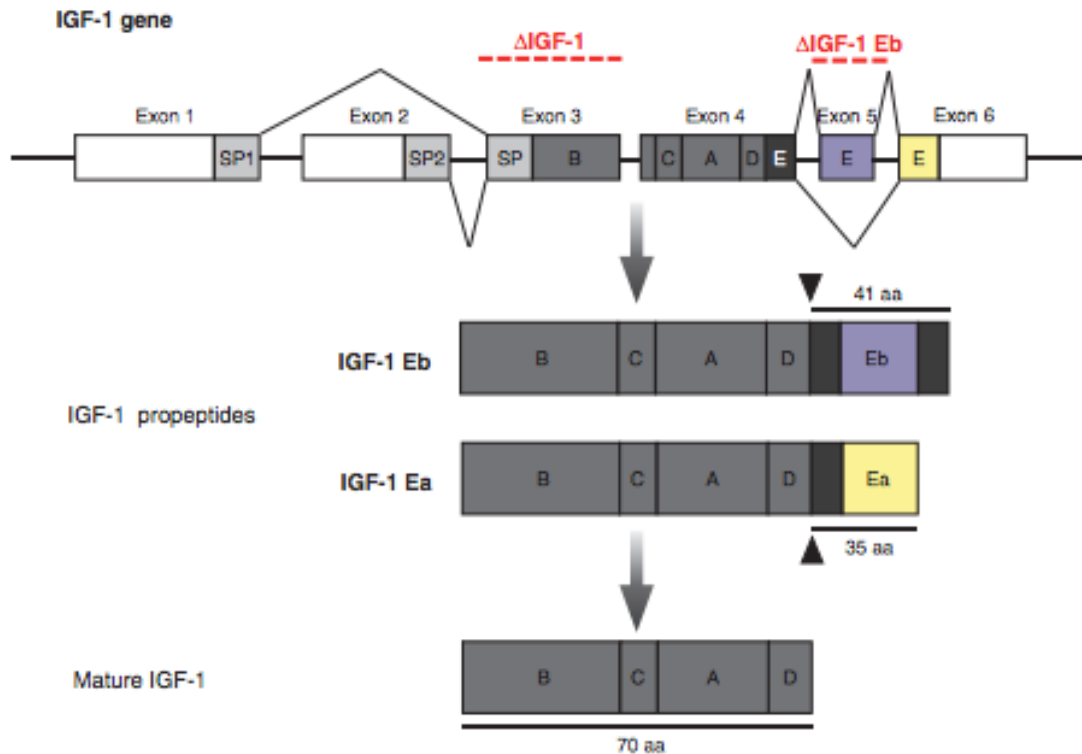
1, 3-6: verificadas

2, 7-9: Predicha

Para el caballo, se encontró que hay 1 variante reportada por *splicing* alternativo (*ensemble.com*) conteniendo 4 exones. Además, 4 variantes de mensajero (predichas) en la base *ncbi.com*.

En ratones (*Mus musculus*) existen diferencias en procesamiento del gen (*splicing* alternativo) en el que también se generan 2 péptidos de extensión (Ea y Eb), pero a su vez, 2 propéptidos (péptidos señal): clase 1 y clase 2 (N-terminal), en el que la clase 1 es mitogénico y la clase 2 tiene que ver con diferenciación celular (Tonkin, et al. 2015).

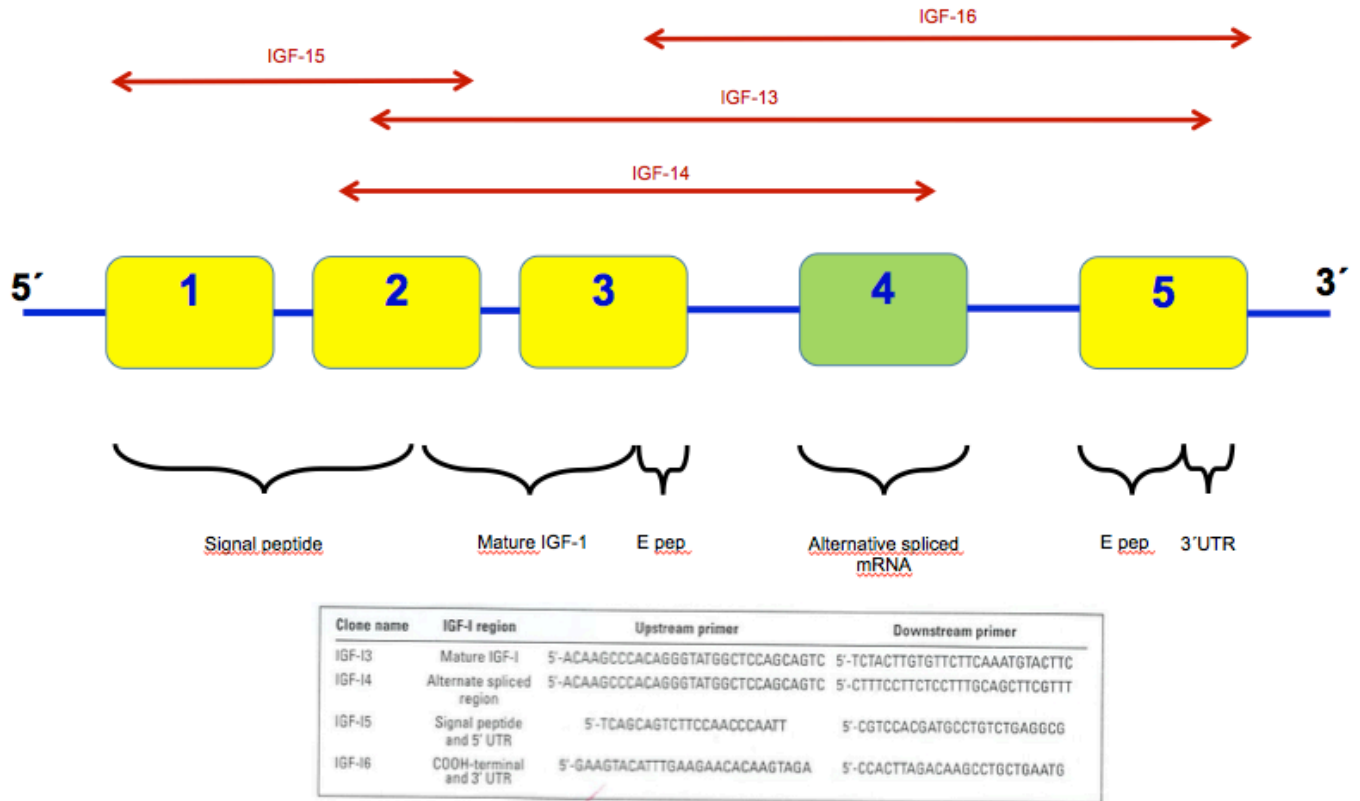
La diferencia más significativa es que la forma Ea es el que tiene más actividad biológica en reparación (6 exones, 5 intrones). En esta especie, los exones 3 y 4 codifican para el péptido maduro y el *splicing* alternativo elimina el exón 5 en lugar del exon 4 como se observa en humanos y caballos. Los dos péptidos de extensión generados son el Ea de 41aa y el Eb de 35aa. (Figura 15)



**Figura 15.** Se muestra el gen de *Mus musculus* para IGF1, donde se observan los sitios de *splicing* alternativo. Mostrando la preproIGF1, los proIGF1 (Ea y Eb) y el péptido maduro conservado en muchas especies (70aa). (Tomado de: Tonkin, et al. 2015)

El único trabajo que se encontró que habla acerca de isoformas de IGF1 en caballos, es el trabajo realizado por Nixon, et al. (1999), y analizando cómo se determinaron dichas isoformas, se dio a conocer que se realizó con un diseño específico de oligonucleótidos, para el exón 4 para determinar expresión de isoforma IA (corta) y específicos para la isoforma IB (larga). (Figura 16)



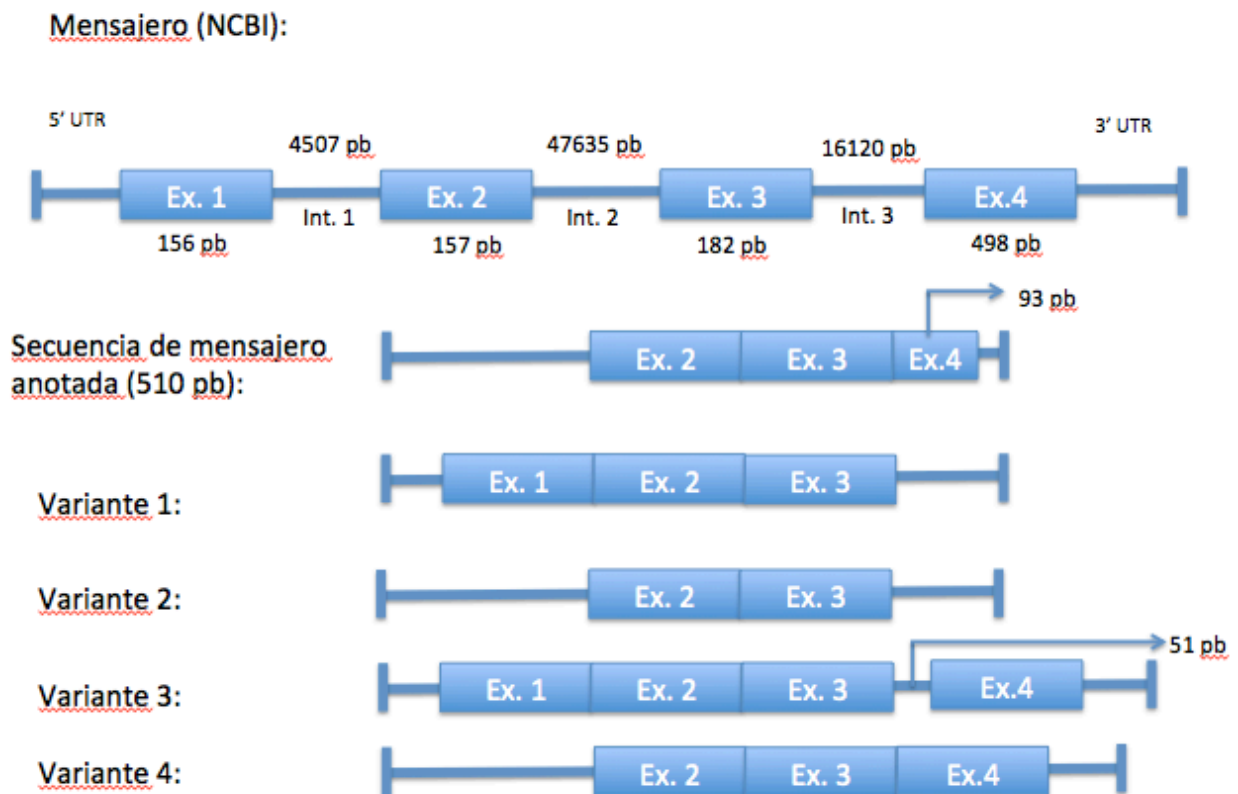


**Figura 16.** Esquema reportado por Nixon, *et al.* 1999, del mRNA de IGF-1 con sus 5 exones y dominios para los que codifican, junto con los diferentes juegos de oligonucleótidos (Fwd y Rvs) utilizados por Nixon, *et al.* 1999, y las diversas regiones que éstos amplificaban, mismas que denominaron: IGF-13 a IGF-16. (Modificado de: Nixon, *et al.* 1999)

Al realizar un análisis de los oligonucleótidos utilizados por Nixon *et al.*, 1999 (Figura 7), se llegó a la conclusión de que la TM, para el Fwd estaba muy elevada (76°C), y comenzaba al comienzo del exón 3, no donde comenzaba el péptido maduro, además de que en ese entonces, se pensaba que las variantes tenían 5 exones o bien, que el exón 4 era el que se eliminaba por *splicing* alternativo, al analizar lo obtenido en PCRs de hígado por secuenciación y comparando con la secuencia reportada en este artículo, el fragmento obtenido, correspondía a la isoforma IA, es decir la corta, la cual carece del exón 4. Sin embargo, al comparar la secuencia reportada en este artículo, con la reportada en la base de datos de ncbi.com, fue

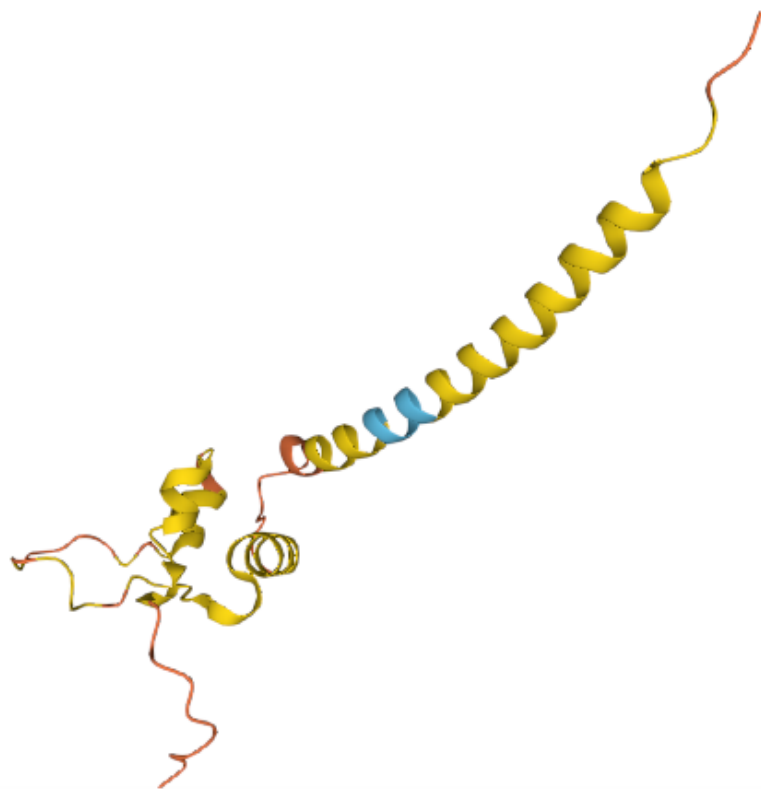
evidente que no representaba a ninguna de las isoformas, ya que todas las reportadas en esta base de datos y en [ensembl.com](http://ensembl.com), tienen tan sólo 4 exones. Lo cual quiere decir que, con el tiempo y el avance de la tecnología, se han ido recorriendo (río arriba) las secuencias posibles para IGF-1, por lo tanto, es necesario secuenciar y anotar las variantes de mensajero que existen para esta proteína, idealmente por RACE 5' y 3'.

Al analizar las variantes que existen reportadas en las bases de datos, fue evidente que las 4 variantes o isoformas por *splicing* alternativo, varían en número de exones y en tamaño, sin embargo, ninguna de éstas está anotada. (Figura 17)



**Figura 17.** Análisis de variantes y cantidad de exones presentes en las bases de datos [ncbi.com](http://ncbi.com) y [ensembl.com](http://ensembl.com)

Existe una variante anotada en NCBI, sin embargo, no existe información acerca de qué isoforma pertenece esta variante. Aún no se conoce la estructura tridimensional de IGF-1, ya que no se han anotado las diversas secuencias de las isoformas funcionales que se dan a lugar. Sin embargo, gracias a herramientas bioinformáticas como uniprot.com, se puede inferir su estructura 3D utilizando modelos como el Alphafold. (Figura 18)



**Figura 18.** Estructura tridimensional de IGF-1 de *Equus caballus*. Modelo utilizado: Alphafold, se obtuvo de secuencias predichas disponibles en bases de datos en plataformas bioinformáticas (uniprot.com). Cuatro hojas alfa y una hoja beta plegada.

Azul.- Alto nivel de confianza del modelo (pLDDT>90)

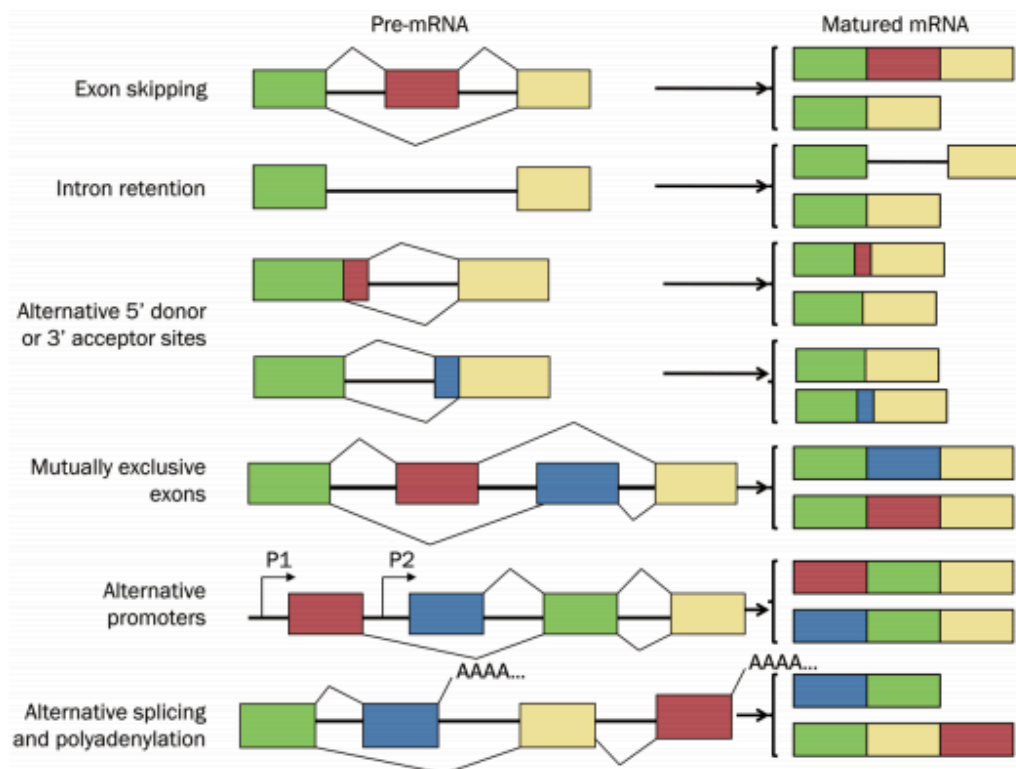
Verde.- Nivel medio de confianza del modelo (90>pLDDT>70)

Amarillo.- Nivel bajo de confianza del modelo (70>pLDDT>50)

Rojo.- Nivel muy bajo de confianza del modelo (pLDDT<50)

pLDDT.- *Predicted local distance difference test*.

Es claro que el mRNA de *Igf-1* de caballo, conlleva procesos de edición post-transcripcional y post-traduccionales, lo cual le confiere a IGF-1 una amplia gama de funciones que en esta especie aún no se han descrito. Según lo reportado por Le *et al.* (2015), y nuestro análisis bioinformático, podemos concluir que en el mRNA de *Igf-1* se llevan a cabo los siguientes tipos de *splicing* alternativo: salto de exones, retención intrónica, exones mutuamente exclusivos, y sitios alternativos donantes 5' y aceptores 3'. (Figura 19)



**Figura 19.** Ejemplos de *splicing* alternativo para células eucariontas, dentro de los cuales, destacan el salto de exones, retención intrónica, exones mutuamente exclusivos y sitios alternativos donadores 5' y aceptores 3' para el mRNA de *Igf-1*. (Imagen tomada de: Le *et al.* 2015)

## 5. Vías de señalización activadas por IGF-1

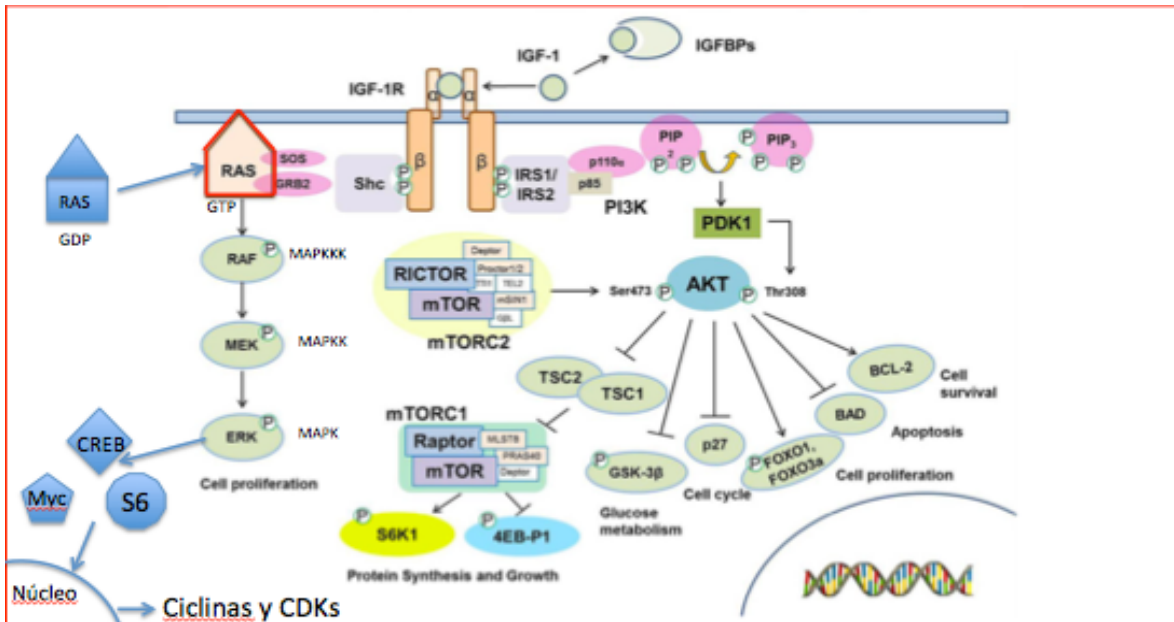
Los factores de crecimiento similares a insulina aislados del plasma, son estructuralmente relacionados con la insulina, sin embargo, poseen una mucho mayor actividad promotora de crecimiento que la insulina. Puede ser tanto un regulador fisiológico del transporte de [1-14C]-2-deoxi-D-glucosa (2DG), como de síntesis de glucógeno en osteoblastos. En el tejido óseo, promueve el transporte de glucosa en células osteoblásticas derivadas de hueso gracias a: PyMS (*Pyrolysis mass spectrometry* o espectrometría de masas de pirólisis); y es efectivo incluso a concentraciones mucho más bajas que la insulina, no sólo con respecto a la síntesis de glucógeno y DNA, sino también para la inclusión de glucosa a la célula. En otras funciones, puede también tener un papel de maduración de sinapsis, así como la exocitosis  $Ca^{2+}$ -dependiente de IGF-1 que es necesaria para la percepción sensorial del olor en el bulbo olfatorio (uniprot.com).

IGF-1 actúa como ligando para el receptor para IGF-1 (IGF-1R), específicamente a su subunidad alfa, activando así la tirosin-quinasa intrínseca que autofosforila residuos de tirosina en la subunidad beta, iniciando así la cascada “río abajo” que a su vez conlleva a la activación de las vías PI3K-AKT/PKB y Ras-MAPK.

Se une a integrinas como: ITGA5:ITGB3 e ITGA6:ITGB4, lo cual forma un complejo terciario con IGFR1, lo cual es esencial para la vía de señalización de IGF-1. (uniprot.com). El IGF-1 junto con el estradiol, juegan un papel clave en el desarrollo cerebral, regulando así una gran variedad de eventos neuroplásticos y del desarrollo (García-Segura et al., 2010). Existe evidencia con respecto a la eficacia del uso

exógeno de IGF-1 in vitro, el cual promueve la síntesis de poliglicanos por parte de condrocitos estimulados. Existen terapias como el trasplante de condrocitos maduros y neonatales, condrocitos modificados genéticamente para sobre expresar IGF-1, entre otras. El problema es que todas estas terapias son bajo anestesia general y requiere equipo y personal especializado (Aguilar et al., 2015; Goodrich et al., 2006).

La proteína central de la vía de señalización de MAPK es RAS, que a su vez es activada por su fosforilación gracias a GDP. Una vez activada (fosforilada) RAS, activará a RAF, también conocida como MAPKKK, que activará a MEK, conocida como MAPKK, y que ésta última activará a ERK, conocida como MAPK. ERK activará a los factores de transcripción CREB, Myc y S6 para translocar al núcleo y que genere expresión de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas. (Figura 20)



**Figura 20.** Vía de señalización de IGF-1. Las proteínas de unión a IGF-1 (IGFBPs) modulan la biodisponibilidad de IGF-1. Las funciones de ligando de IGF-1 lo hacen interactuar con su receptor (IGF1R), el cual está localizado en el espacio transmembranal. Éste último al ser activado por su ligando, se autofosforila reclutando proteínas adaptativas como: IRS-1, IRS-2 y Shc. La interacción de IRS-1 e IRS-2 con IGF1R induce la activación de la cinasa de clase 1 de fosfatidil inositol 3' (PI3K); el cual convierte a PIP<sub>2</sub> a un segundo mensajero lipídico PIP<sub>3</sub>. La familia de cinasas de AKT se activa por PDK1 y por el complejo mTOR que contiene a mTORC2 que resulta en la fosforilación de la treonina 308 (Thr308) y de la serina 473 (Ser473) respectivamente. La AKT activada regula la vía de señalización río abajo, incluyendo a TSC1/2 (*tuberous sclerosis protein 1/2*), la cual inhibe al complejo mTORC1 y regula la fosforilación de S6K1/2 y de 4EB-P1, los factores de transcripción FOXO como: GSK-3 $\beta$ , p27, BAD y BCL-2. Estas moléculas se involucran en muchos procesos celulares que incluyen síntesis de proteínas, metabolismo de glucosa y supervivencia celular. Paralelamente, la activación de Shc induce la activación de la vía RAS/MAPK, la cual resulta en un incremento en la proliferación celular. (Imagen tomada y modificada de: Jung & Su, 2015)

*mTOR*= *Mammalian target of rapamycin*. Control de inicio de transcripción, organización de citoesqueleto, formación de ribosomas y regulación de crecimiento, proliferación y muerte celular. Es diana para tratamientos contra el cáncer donde su expresión está incrementada.

*RAPTOR*= *Regulatory assoc-protein of mTOR*. Se une al factor 4E. Regula a la baja a la kinasa de mTOR. Mantiene expresión de mTOR y también el tamaño celular.

*RICTOR*= *Rapamycin insensitive companion of mTOR*. Es "resistente" a Rapamicina. Activa a AKT, cuya disregulación conlleva a cáncer y diabetes. mTORC2 también tiene esta última función.

## **6. Justificación**

Hasta el día de hoy, no se tiene información disponible acerca de la concentración normal y anormal de IGF-1 libre en líquido sinovial, de caballos sin cambios radiográficos, ni signos clínicos asociados a claudicación.

Consideramos que este trabajo servirá como base para entender mejor y conocer el comportamiento de dicha proteína en procesos inflamatorios crónicos y degenerativos como lo es la osteoartritis, esto es importante, ya que IGF-1 es el factor de crecimiento clave en la reparación del cartílago articular. El resultado de este trabajo puede ayudar a que en futuras investigaciones se pueda considerar este factor de crecimiento como biomarcador tanto de pronóstico, como de cronicidad de la enfermedad, y si su reposición temprana o tardía podrá ayudar a una reparación del cartílago de mejor calidad que la que puede darse en una reparación por sustitución con tejido conjuntivo fibroso o fibrocartílago.

## **7. Hipótesis**

Los caballos con mayor grado de cambios asociados a osteoartritis en la articulación metacarpo-falángica de miembros torácicos tendrán una mayor expresión de IGF-1 asociado a que tienen un mayor daño que los caballos con menor grado de cambios asociados.



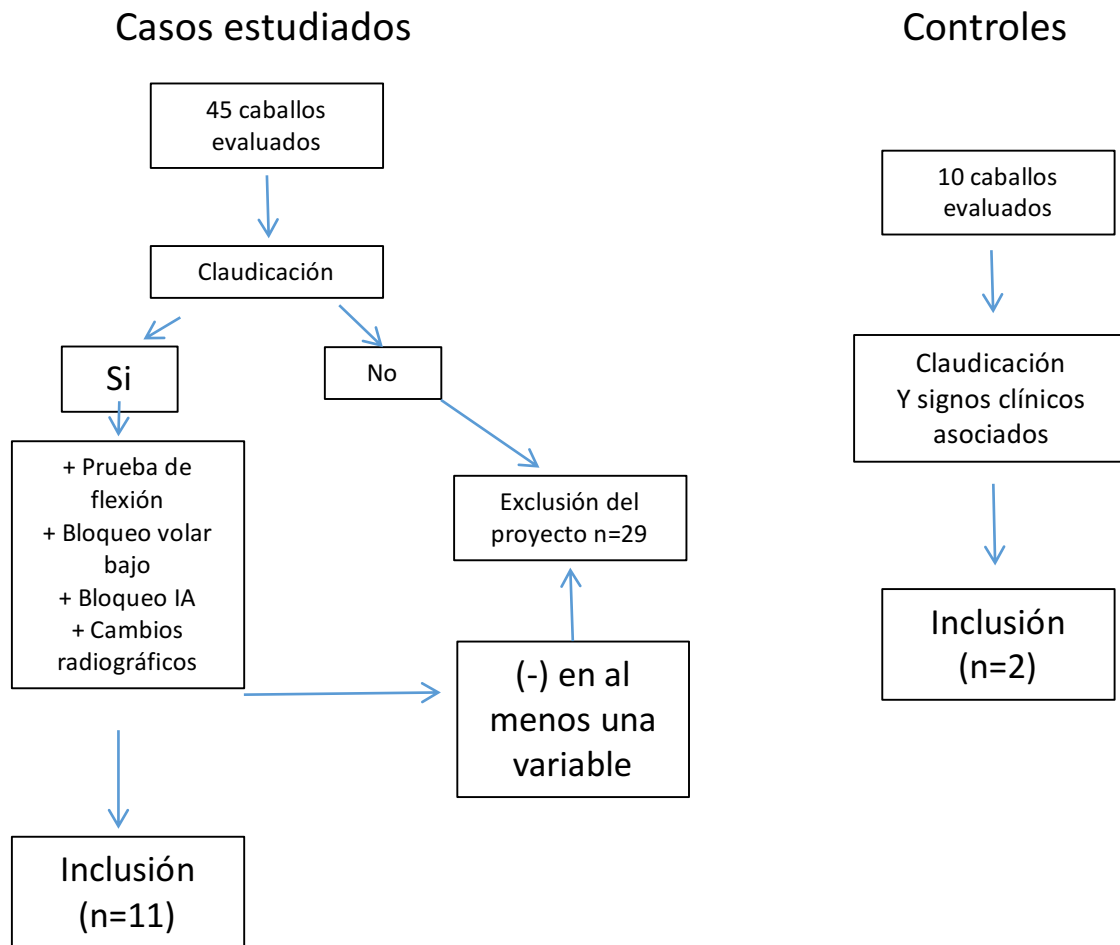
## 8. Objetivo general

- Determinar la expresión diferencial de IGF-1 en líquido sinovial de caballos con diversos grados de osteoartritis.

### 8.1 Objetivos particulares

- Obtención de muestras de líquido sinovial de caballos previamente diagnosticados clínica y radiográficamente con osteoartritis en articulaciones metacarpo-falángicas de miembros torácicos.
- Cuantificar y analizar niveles de IGF-1,  $TNF\alpha$  e IL-6.
- Realizar Western blot para IGF-1.
- Correlacionar signos clínicos, cambios radiográficos y niveles de líquido sinovial de estas proteínas.

## 9. Estrategia experimental



## **10. Material y métodos**

Se colectaron muestras de líquido sinovial de caballos raza Warmblood y Pura Sangre Inglés (n=11), de dos distintas disciplinas: salto (Warmbloods) (n=8), y carreras (Pura Sangre Inglés) (n=3), con una media de edad de 10.5 años y un peso promedio de 520 kg. Las muestras de líquido sinovial que fueron utilizadas como controles, se obtuvieron de 2 caballos castrados raza Warmblood de 5 y de 7 años de edad (n=2).

### **10.1 Criterios de inclusión**

Caballos con evidencia de claudicación (2-3/5 AAEP) proveniente de la articulación metacarpo-falángica de miembros torácicos, respuesta positiva a prueba de flexión de dígito, bloqueo volar bajo en 4 puntos positivo y bloqueo intraarticular positivo.

### **10.2 Criterios de exclusión**

Cualquier caballo que resultó negativo a evidencia de claudicación o que en caso contrario, el origen de la claudicación no fuera proveniente de la articulación metacarpo-falángica.

### **10.3 Criterios de eliminación**

Ningún caballo que haya sido elegido para el estudio, fue eliminado del mismo.

### **10.4 Evaluación clínica de aparato locomotor**

Se realizó a todos los caballos incluidos en este estudio con el fin de encontrar evidencia de claudicación asociada a la articulación metacarpo-falángica en miembros torácicos.

La evaluación consistió en evaluación en estática, palpación directa y respuesta a flexiones pasivas, evaluación en dinámica al paso y al trote en línea recta en piso

duro y suave, y después a la cuerda en piso suave y duro. Todos los caballos incluidos en el estudio demostraron una claudicación AAEP 2-3/5 de dicha articulación, después de 1 minuto de flexión de dígito. Adicionalmente, se les realizó un bloqueo volar bajo en 4 puntos (nervios palmares lateral y medial y nervios metacarpianos lateral y medial), utilizando 2 y 1.5 ml respectivamente de mepivacaína 2% (Carbocaine, Zoetis Inc.); y un bloqueo intraarticular de la articulación metacarpo-falángica 2% (Carbocaine, Zoetis Inc.) como se describió previamente (Moyer, et al. 2007).

### **10.5 Colección de líquido sinovial**

Todas las muestras de líquido sinovial fueron obtenidas de la articulación metacarpo-falángica de miembros torácicos utilizando técnica aséptica en el abordaje palmaro-lateral como se describió previamente (Moyer, et al. 2007).

### **10.6 Evaluación radiográfica**

A todos los caballos incluidos en el estudio se les realizó un estudio radiográfico de la región del menudillo, utilizando las 4 tomas estándar de la misma (dorso-palmar, látero-medial, dorso-lateral palmaro-medial oblicua, y dorso-medial palmaro-lateral oblicua), para así evaluar la condición radiográfica y poder agrupar a cada caballo en 3 grupos según los cambios óseos que presentaron y así correlacionar dichos cambios con la condición clínica de cada caballo. (Cuadro 1)

<b>Grado</b>	<b>Hallazgos radiográficos y clínicos</b>
I	Cambios menores o inexistentes asociados con dolor articular y claudicación: Irregularidad leve y pérdida de homogeneidad de la cresta sagital del metacarpo III; efusión articular.
II	Cambios moderados asociados con dolor articular y claudicación: Osteofitos en la región proximal lateral y medial de primera falange y/o de metacarpo III.
III	Cambios severos asociados con claudicación y disminución de rango de movimiento: Lisis supra o infracondilar de hueso subcondral, osteofitos y hueso de neoformación con reacción perióstica y pérdida de espacio articular y esclerosis de hueso subcondral.

**Cuadro 1.** Grado de severidad de cambios radiográficos y su correlación con hallazgos clínicos de caballos incluidos en el estudio. (*Modificado de: Verwilghen D, et al. 2009.*)

### **10.7 Determinación de proteína total en líquido sinovial**

La concentración de proteína total de todas las muestras de líquido sinovial tanto controles como muestras problema, se realizó por el método de ácido bicinconínico (BCA, Protein assay kit. Pierce BCA protein assay kit #23225), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada muestra, la concentración final que se obtuvo para los procedimientos de ELISA, fue de 100 µg/50 µl.

### **10.8 Determinación de concentración de IGF-1**

Se midió la concentración de IGF-1 de muestras de 50 µl de líquido sinovial obtenido de caballos con osteoartritis como controles utilizando un kit comercial de ELISA para IGF-1 (Horse IGF1 ELISA kit, #MBS017382, MyBio-Source), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **10.9 Determinación de interleucina-6 (IL-6)**

Se realizó la determinación cuantitativa de IL-6 en líquido sinovial obtenido de caballos con osteoartritis utilizando un kit comercial de ELISA (Horse interleukin-6 ELISA kit, cat. #: CSB-E16634Hs), el cual consiste en un ensayo en sandwich,

donde las placas son cubiertas con un anticuerpo anti IL-6, para después añadir la muestra y un anticuerpo secundario específico conjugado con biotina, y después incubados con peroxidasa de rábano conjugada con avidina. El protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **10.01 Determinación de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )**

La determinación de la concentración de TNF $\alpha$  de las muestras de líquido sinovial de caballos con osteoartritis y controles se realizó por medio de ELISA, utilizando un volumen de 100  $\mu$ l (Equine TNF $\alpha$  ELISA kit, cat #: ESS0017 Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

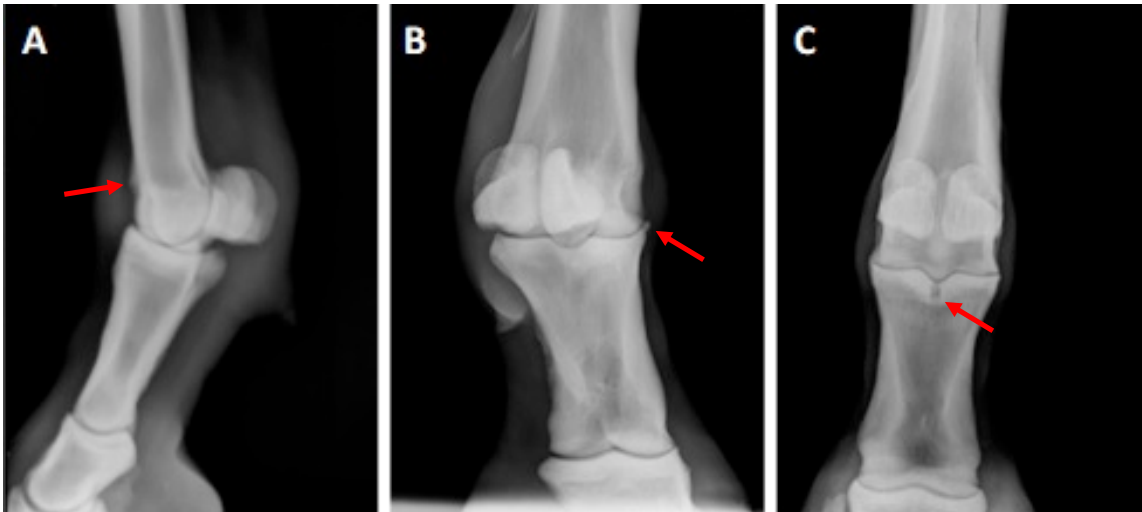
### **10.02 Western blot para IGF-1**

Se utilizaron concentraciones iguales de proteína cruda de las muestras de líquido sinovial para la SDS-PAGE al 16% (90V por 30 min y 120V por 3.5 h). Como marcador de peso molecular se utilizó un marcador preteñido (Protein Plus Protein Dual Color Standards, Biorad), conteniendo proteínas recombinantes (10-250 kDa), incluyendo 8 bandas azules y dos bandas color rosa para referencia (25 y 75 kDa). Después de la electroforesis, un gel se tiñó con Coomassie coloidal y el otro se transfirió a una membrana PVDF (0.45  $\mu$ M, Bio-Rad) usando un sistema de transferencia semi-húmedo (271 mA por 15 minutos). Las membranas se bloquearon con leche sin grasa al 4%, diluida en PBS (pH 7.4) e incubadas a 37°C, 120 rpm durante 2 horas. Después del bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces (lavados de 5 minutos cada uno en orbitador) usando PBS con Tween-20 (0.05%). Como anticuerpo primario, se utilizó un anti-IGF-1 policlonal de cabra (1:1000) (Sta. Cruz #Sc-1422) y se incubó primero a 37°C, 120 rpm durante 2 horas, y después a

4°C durante toda la noche. Las membranas se lavaron nuevamente como previamente se describió, para después incubar el anticuerpo secundario policlonal anti-goat IgG (1:5000), y se incubó a 37°C, 120 rpm durante 2 horas. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces como previamente se describió. La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando un detector de alta resolución (Bio-Rad ChemiDoc). Previamente, las membranas se incubaron con una dilución de peroxidasa y luminol (1:1) (Merck Millipore, Luminata # WBLUF0500), y fueron sometidas a diversos tiempos de exposición, donde el tiempo óptimo para las muestras fue de 35 segundos.

## **11. Resultados**

Un total de 45 caballos fueron evaluados, de los cuales únicamente 11 (22 muestras de líquido sinovial) fueron incluidos en el estudio, y 2 caballos como controles (4 muestras de líquido sinovial). Todos los caballos variaron en cuanto a grado de claudicación y cambios radiográficos, y todos respondieron positivamente a los bloqueos tanto volar bajo, como intraarticular. Seis caballos fueron clasificados en el grado I, 5 caballos en grado II y 8 con grado III. (Figura 21)



**Figura 21.** Radiografías representativas de caballos con grado I (A), vista LM donde se observa una pequeña irregularidad del aspecto dorsal-proximal de la cresta sagital del tercer metacarpo (flecha); Grado II (B) toma DLPMO con un osteofito visible en el aspecto dorsomedial de P1 (flecha); Grado III (C) toma DP donde se observa un área de lisis ósea en hueso subcondral, inmediatamente adyacente al surco sagital de P1, rodeada por esclerosis ósea alrededor del mismo (flecha).

*LM: Toma latero-medial*

*DLPMO: Toma dorsolateral-palmaromedial oblicua*

*DP: Toma dorsopalmar*

*P1: Falange proximal*

## 11.1 Concentración de IGF-1

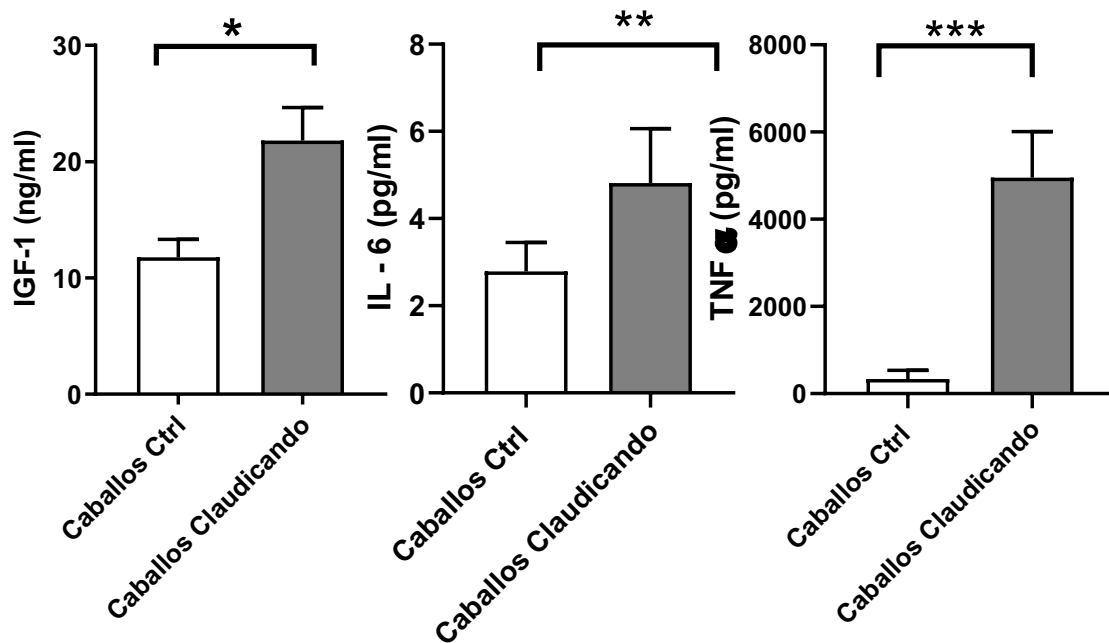
Todos los caballos con dolor articular y por lo tanto claudicación asociada, y con menos cambios radiográficos, demostraron un incremento significativo en la concentración de IGF-1 ( $p < 0.05$ ). Todas las muestras fueron pareadas y leídas en 3 distintos tiempos (5, 10 y 15 min) sin encontrar diferencia entre las mediciones y con valores de regresión lineal de la curva estándar fueron de  $p < 0.001$ ;  $r^2 = 0.9931$ .

(Figura 20)



## 11.2 Análisis de IL-6 y TNF $\alpha$

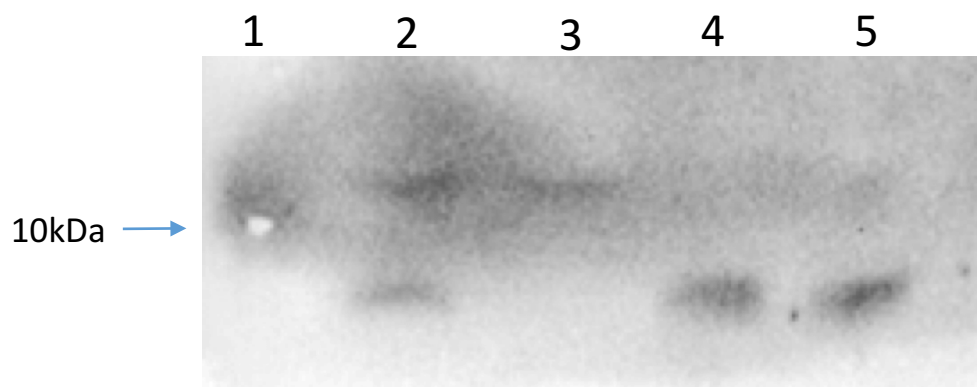
Las concentraciones de IL-6 y TNF $\alpha$  entre muestras control y muestras de caballos claudicando, mostraron un incremento significativo ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente), siendo mayor la concentración de los mismos en las muestras provenientes de caballos claudicando. Se realizó un análisis de correlación de Pearson en el cual se demostró una correlación positiva entre la concentración de proteína total y la concentración de IGF-1 ( $r=1$ ), el cual se observó en los caballos grado I y II. Los caballos con grado III y los controles, demostraron una concentración de IGF-1 y TNF $\alpha$  similar. (Figura 22)



**Figura 22.** **A)** Concentración de IGF-1 de caballos control y caballos con claudicación demostrando una diferencia significativa entre ellos ( $p < 0.05$ )\*. **B)** Concentración de IL-6 entre controles y muestras de caballos claudicando donde se observa una diferencias significativas ( $P < 0.01$ )\*\*. **C)** Concentración de TNF $\alpha$  de caballos controles y caballos claudicando donde se observan diferencias significativas ( $p < 0.001$ )\*\*\*.

### 11.3 Western blot para IGF-1

Los caballos con menos cambios radiográficos (Grado I y II) demostraron por ELISA una concentración mayor de IGF-1, que concordó con lo observado en el Western blot. Los caballos con cambios radiográficos más severos, que por consiguiente, fueron los caballos con OA crónica (Grado III), demostraron una concentración menor de IGF-1, misma que también se observó en la prueba de ELISA. Interesantemente, con esta técnica se lograron identificar 2 bandas de diferente peso molecular, una más pesada (~12 kDa), la cual se observó únicamente en caballos normales (muestras control) y una más ligera (~7.5 kDa) que se observó en todas las muestras provenientes de caballos claudicando, sin importar el grado al que fueron asignadas. (Figura 23)



**Figura 23.** Fotografía representativa del análisis de Western blot para IGF-1, donde se demuestra una diferencia en el peso molecular entre las muestras de líquido sinovial proveniente de caballos con diferentes grados de OA y las provenientes de caballos sanos (control).

*1: Marcador de peso molecular: Precision plus protein dual color marker (flecha: 10kDa).*

*2: Mezcla de muestras de un caballo control y un caballo con OA.*

*3: Muestra de un caballo control.*

*4 & 5: Dos muestras diferentes provenientes de caballos con distintos grados de OA.*

## 12. Discusión

Los caballos deportivos están sometidos a cargas excesivas tanto en articulaciones como en tejidos blandos. La articulación que puede sufrir de OA de origen traumático depende de la disciplina en la cual el caballo se desempeñe, y de varios otros factores, como lo son: herraje, conformación, tipo de piso donde entrena y el tipo de entrenamiento. Existe evidencia en la cual se demuestra que las intervenciones (tratamientos) tempranas intraarticulares como lo son las artrocentesis, pueden ayudar a modificar el curso natural de la enfermedad, modificando su curso (ralentizándolo) y así prevenir un daño mayor mientras el caballo se desempeña (Chu et al., 2011).

Las cargas por impacto debido al ejercicio son las responsables de dañar el cartílago articular, primero con defectos superficiales y dependiendo de la fuerza aplicada y el tiempo en el cual ésta se aplica, será la profundidad del defecto y por ende la rapidez en el desarrollo de la OA. La caracterización de las consecuencias mecánicas de las lesiones por impacto en cartílago articular, ha demostrado desarrollar daño mayor por estrés directo a las estructuras articulares (Bonnievie et al., 2015).

Cuando ocurre un proceso inflamatorio, los condrocitos dentro del cartílago articular, migran al sitio de defecto, formando grupos de células llamados *clusters* para así sintetizar nueva MEC sustituyendo a la que se ha perdido. Debido a que el único componente celular del cartílago articular son los condrocitos y a que la población de éstos es del 1-2% del total del cartílago, son incapaces de reparar el área

dañada, y su habilidad de sintetizar nueva MEC es rebasada por las MMP y demás enzimas que la degradan (agrecanasa principalmente), y que están presentes en un cartílago ya dañado, creando una condición agravante, ya que incrementa la necrosis local, activando así el proceso inflamatorio gracias a los componentes intracelulares liberados actuando como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), citocinas proinflamatorias como prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) y sustancia P. Particularmente, el  $TNF\alpha$  inhibe la vía de señalización de IGF-1 incrementando el catabolismo de la MEC y bloqueando la vía AKT por activación de la vía JNK. Si el defecto del cartílago llega a hueso subcondral, el cartílago se repara por sustitución con tejido conjuntivo fibroso llamado fibrocartílago, el cual no tiene la capacidad de amortiguar cargas y repartir las fuerzas de presión que sufre la articulación, generando que dicha presión llegue a hueso subcondral generando dolor al apoyar el miembro (Choukair et al., 2014; Tonkin et al., 2015; Fortier et al., 2001).

Además de las citocinas proinflamatorias, se han descrito otros factores que influyen en la cascada inflamatoria en articulaciones, los cuales son vesículas extracelulares, las cuales juegan un papel importante no sólo en inflamación, sino en apoptosis, silenciamiento de genes y degradación de MEC. Estas vesículas pueden ser de 3 tipos: exosomas, microvesículas y vesículas apoptóticas, las cuales son liberadas a la cavidad articular (en el líquido sinovial), a través de la membrana sinovial, y tienen una importante relación con la comunicación célula-célula en el proceso inflamatorio (Fortier et al., 2001; Frisbie et al., 2005; Buzas et al., 2014).

El objetivo principal de este estudio fue el de comparar la concentración de IGF-1 en líquido sinovial de articulaciones sanas y con un proceso inflamatorio (OA) en la articulación metacarpo-falángica en miembros torácicos. Hipotetizamos que los caballos con mayores cambios radiográficos y por lo tanto un estado más avanzado de OA, presentarían una mayor concentración de IGF-1 en líquido sinovial, debido a que la articulación tendría una alta demanda de dicho factor en comparación con los caballos con cambios menores (Grado I y II). Dado que hasta el día de hoy no existe evidencia científica del comportamiento de este factor durante un proceso inflamatorio en la articulación del caballo, los autores realizamos un estudio piloto, donde se colectaron 13 muestras de líquido sinovial de diversas articulaciones de caballos deportivos dedicados al salto, que presentaban dolor articular (prueba de flexión positiva) y baja de rendimiento, a los cuales no se les realizó ningún estudio radiográfico. Los resultados obtenidos de dicho estudio revelaron que existe un incremento tanto en la concentración de la proteína total, como en la concentración de IGF-1 en líquido sinovial y que los datos obtenidos, demostraron una correlación positiva entre ambas (correlación de Pearson,  $p=0.0229$ ). En otras palabras, el incremento de la concentración de proteína total, se debió a un incremento de expresión de IGF-1 en líquido sinovial en caballos con dolor articular cuando se compararon con los controles. Lo anterior nos brindó información suficiente, para desarrollar la hipótesis de que los caballos con mayor grado o cronicidad de patología articular, tendrían un incremento de concentración de IGF-1.

Sin embargo, e interesantemente, con los resultados obtenidos en este trabajo, nuestra hipótesis fue refutada. Debido a que los resultados obtenidos por ELISA y

Western blot, nos demostraron que de todos los caballos con OA, los que tenían los cambios radiográficos más severos y por lo tanto OA crónica, fueron los que demostraron un nivel de IGF-1 muy similar al observado en las articulaciones control. Resultados similares se han observado en estudios donde experimentalmente se inducen lesiones en cartílago articular, donde se observa un promedio de expresión de mRNA de *Igf-1* elevado, cuando se comparan con los controles, pero esta elevación decrece a lo largo de 4 semanas. Cuando esto sucede, el TGF- $\beta$  predomina, y se ha observado que es el responsable de la activación de linfocitos quiescentes a diferenciarse a un perfil inmunológico Th17, y a su vez, de producción de hueso de neoformación en la articulación afectada (Fortier et al., 2001).

El IGF-1 se ha estudiado ampliamente. Existen muchos estudios donde se demuestra su importancia en proliferación, crecimiento y supervivencia celular, reparación y producción de MEC, sin embargo, no existen aún estudios que demuestren y describan las diversas isoformas que expresa y su funcionalidad (uniprot.com). Se sabe que el mRNA de IGF-1 conlleva ediciones post-transcripcionales (*splicing* alternativo) y post-traduccionales, lo que genera diversas isoformas funcionales de la misma proteína. Los pro-péptidos de IGF-1 son codificados por varios transcritos del gen *Igf-1*, y contienen péptido señal en el extremo amino terminal y en el extremo carbono terminal péptidos de extensión llamados péptidos E. Cuando un péptido inmaduro en su cadena peptídica tiene péptido señal, péptido maduro y péptido de extensión, es llamado pre-proIGF-1, y cuando el péptido señal se escinde de la cadena, dejando el péptido maduro (el cual

es altamente conservado en mamíferos) y los péptidos E, es llamado pro-IGF-1. Y cuando únicamente se encuentra el péptido maduro, es llamado IGF-1. Los péptidos E controlan la biodisponibilidad local de IGF-1, debido a que se unen a la MEC debido a que están cargados positivamente, y así previene la circulación sistémica del IGF-1 asegurando su uso local. Además de esto, en líneas celulares de célula muscular de ratón, se ha comprobado que los péptidos E modulan la re-entrada del IGF-1 maduro a la célula, controlando así su biodisponibilidad (Brisson et al., 2012; Pfeffer et al., 2009).

En humanos, se han descrito 3 isoformas funcionales diferentes para IGF-1 (IGF-1Ea, IGF-1Eb y la IGF-1Ec, o también conocido como el factor mecánico de crecimiento o *mecano-growth factor* MGF), y se ha propuesto que juegan un papel importante y varias funciones diferentes en la reparación de músculo estriado esquelético (Phillipou et al., 2009).

Nixon et al., (1999) describieron que el gen *Igf-1* de caballo consiste de 5 exones y 4 secuencias intrónicas, las cuales conllevan modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales, donde por *splicing* alternativo el exon 4 es escindido y las proteínas traducidas formaban dos isoformas, una más pequeña (105 aminoácidos) llamada pre-proIGF-1A que consistía en un péptido señal (codificado por los exones 1 y 2), el péptido maduro (codificado por los exones 2 y 3) y un péptido de extensión (codificado por los exones 3 y 5); y una más larga (111 aminoácidos), donde el exon 4 es conservado. Según la literatura que hemos revisado, este es el último trabajo que habla acerca de modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales del mRNA de IGF-1 en caballos y su funcionalidad. Por lo cual se realizó un análisis

bioinformático del gen *Igf-1*, donde se demostró que conlleva varios tipos de splicing alternativo, los cuales según Le et al., (2015) son: salto de exones, retención intrónica, exones mutuamente exclusivos y sitios alternativos donadores 5' y aceptores 3'. Este análisis también reveló que el mRNA de IGF-1 consiste no de 5, sino de 4 exones con 3 intrones, donde los transcritos forman 4 diferentes variantes: variante 1 (exones 1-3), variante 2 (exones 2 y 3), variante 3 (exones 1-3, retención intrónica de 93 pb, y exón 4) y variante 4 (exones 2-4) (Le et al., 2015).

Con el análisis de Western blot, se demostró la presencia de al menos 2 diferentes isoformas funcionales de IGF-1, donde una únicamente se observó en las muestras control, siendo más pesada (~12 kDa) y otra más ligera observada en las muestras provenientes de caballos con diferentes grados de OA (~7.5 kDa). Con lo cual asumimos que ésta última corresponde al péptido maduro de IGF-1, sin embargo, para tener certeza de dicha aseveración, es necesario realizar experimentos adicionales como lo es la secuenciación avanzada de proteínas por espectrometría de masas para así confirmar dicha hipótesis. Con este resultado, asumimos que la expresión de estas dos isoformas de IGF-1 es dependiente de inflamación.

Lo anterior puede resultar en el desarrollo de una línea de investigación, cuyo enfoque se centre en determinar las isoformas de IGF-1 expresadas o no durante un proceso inflamatorio, y así centrarse en la sobre expresión de la isoforma que no es expresada durante el mismo, para fines terapéuticos o como biomarcador pronóstico de la enfermedad y su papel en la regeneración del cartílago articular en caballos.

El cartílago articular es incapaz de regenerarse, dado que es el único tejido conjuntivo que no cuenta con vasos sanguíneos, linfáticos o nervios (Geneser,



2001). Por lo tanto, debido a esto, es virtualmente imposible que pueda regenerarse después de una lesión, por lo cual se repara por sustitución de tejido conjuntivo fibroso. Existen varios tratamientos para mejorar la regeneración del cartílago articular, en humanos, el trasplante con aloinjertos ha demostrado ser efectivo en función de la regeneración y la reparación en general de defectos, teniendo una eficacia de hasta el 80% en pacientes con tratamiento quirúrgico previo, como por ejemplo: microfracturas, debridamiento de cartílago, forrajeo, condroplastía por ablación, injertos osteocondrales y periósticos, fijación de un colgajo de cartílago, entre otros (Fortier et al., 2001; Nixon et al., 1999; Briggs et al., 2015).

En la práctica clínica en caballos, se usan ampliamente anestésicos locales y antiinflamatorios esteroidales, ya sea por razones de diagnóstico, o bien de tratamiento. Sin embargo, el uso excesivo de los mismos ha probado ser dañino para el cartílago articular. La inyección intraarticular de dichos fármacos ha incrementado la preocupación acerca de su potencial condrotóxico y sinoviotóxico. Se han utilizado insulina y atropina por vía IA con resultados favorables, En un estudio realizado por el autor, se observó que la insulina de rápida acción tiene un efecto de sobreexpresión de IGF-1 (García-Lacy et al., 2022).

Sherman *et al.*, (2015) realizaron un interesante estudio donde compararon diferentes anestésicos locales (lidocaína y bupivacaína) y algunos de los esteroides más usados como son acetato de betametasona, acetato de metilprednisolona, y acetato de triamcinolona en un modelo canino. Donde se encontró que *in vitro*, la lidocaína al 1 y 0.5%, junto con la bupivacaína al 0.2 y 0.25%, el acetato de betametasona y de metilprednisolona fueron los que demostraron mayor evidencia

de condrotoxicidad y sinoviotoxicidad, en comparación con 0.625% de bupivacaína y triamcinolona (Sherman et al., 2015).

Por esta razón, en cuanto a esquemas terapéuticos se refiere, el objetivo principal del tratamiento de OA para ser usado en la práctica clínica, es el de proveer más opciones de tratamiento, además de los antiinflamatorios esteroidales y demás tratamientos autólogos biológicos disponibles comercialmente, para así agotar el mayor número de recursos antes de someter al caballo a una cirugía artroscópica bajo anestesia general, y aún tener un efecto benéfico dirigido a mantener el rendimiento deportivo del caballo por más tiempo. Nosotros creemos que este trabajo provee de información importante que puede servir de base para futuros trabajos en relación a IGF-1 y el papel de sus diversas isoformas en la reparación del cartílago articular en caballos.

### **13. Conclusiones**

- Diferencias significativas en concentración de proteína total y de IGF-1 en líquido sinovial entre controles y problema.
- La concentración de IGF-1 en las muestras de caballos con osteoartritis crónica y cambios radiográficos grado III, fue muy similar a la de las muestras control.
- Cuanto más crónica es la OA, mayores cambios radiográficos y menor expresión de IGF-1. Por el contrario, cuan más aguda es la OA, menores cambios radiográficos y mayor expresión de IGF-1.

- La concentración de IGF-1 es inversamente proporcional a los cambios radiográficos encontrados.
- La expresión de al menos dos isoformas de IGF-1; una ligera (~7.5 kDa) y una pesada (~12 kDa) depende de inflamación.
- Diferencias significativas en concentración de IL-6 entre controles y problema.

## 14. Productos del doctorado

### 14.1 Publicaciones derivadas del proyecto de investigación

1. **García-Lacy F**, Méndez-Cruz ST, Reyes-Vivas H, Dávila-Borja VM, Barrera-Morales JA, Gutiérrez-Ospina G, Gómez-Chavarín M, Trigo-Tavera FJ. Insulin-like growth factor I (IGF-1) concentrations in synovial fluid of sound and osteoarthritic horses, and its correlation with proinflammatory cytokines IL-6 and TNF $\alpha$ . Rev Mex Cienc Pecu 2022 (Disponible al final de la tesis)

2. **García-Lacy F**, Gutiérrez-Olvera L, Bernad M, Fortier L, Trigo-Tavera FJ, Gómez-Chavarín M, Rodríguez-Monterde A. Pharmacokinetic analysis of intraarticular injection of insulin and its effect on IGF-1 expression in synovial fluid of healthy horses. Rev Mex Cienc Pecu 2022;13(2):391-407.

<https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i2.5942> (Disponible al final de la tesis)

## 15. Publicaciones no derivadas del proyecto de investigación

### 15.1 Publicaciones como primer autor

1. **García-Lacy F**, Craig L, Trigo-Tavera FJ, Schumacher J, Rodríguez-Monterde A. Multicentric T-cell lymphoma in a 21-year-old Tennessee Walking Horse mare. Vet Rec Case Rep. 2022;e441. <https://doi.org/10.1002/vrc2.441>  
(Disponible al final de la tesis)

### 15.2 Publicaciones como colaborador

1. Walter S, Rasche A, Moreira-Soto A, Pfaender S, Bletsa M, Corman VM, Aguilar-Setien A, **García-Lacy F**, Hans A, Todt D, Schuler G, Shnaiderman-Torban A, Steinman A, Roncoroni C, Veneziano V, Rusenova N, Sandev N, Rusenov A, Zapryanova D, García-Bocanegra I, Jores J, Carluccio A, Veronesi MC, Cavalleri JMV, Drosten C, Lemey P, Steinmann E, Drexler JF. 2017. Differential infection patterns and recent evolutionary origins of equine hepaciviruses in donkeys. J Virol 91:e01711-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01711-16> (Disponible al final de la tesis)

### 15.3 Capítulos en libros

1. **García Lacy F**, Verdiguél Fernández LF. Inflamación. En: Basurto Alcántara FJ, Gómez Romero NE, Verdiguél Fernández LF. Inmunología Básica en la Clínica en Pequeñas Especies CEAMVET. 1a Ed. 2022. México

2. **García Lacy F**, Mejía JA, Verdiguél Fernández LF. Citocinas. En: Basurto Alcántara FJ, Gómez Romero NE, Verdiguél Fernández LF. Inmunología Básica en la Clínica en Pequeñas Especies CEAMVET. 1a Ed. 2022. México.

3. **García Lacy F**, Verdiguél Fernández LF. Selección del inmunógeno. En: Basurto Alcántara FJ, Gómez Romero NE, Verdiguél Fernández LF. Inmunología Básica en la Clínica en Pequeñas Especies CEAMVET. 1a Ed. 2022. México.

## 16. Referencias

Aguilar IN, Trippel SB, Shuiliang S, Bonassar LJ. (2015) Comparison of efficacy of endogenous and exogenous IGF-I in stimulating matrix production and mature chondrocytes. *Cartilage*. 6(4):264-72.

Amudsen BH, Wisloff U, Helgerud J, et al. (2002) Ultrasound recorded axillary artery blood flow during elbow-flexion exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 34:1288-93.

Bertone A. (2004) Joint physiology: Responses to exercise and training. In: Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ. *Equine sports medicine and surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete*. Ed Elsevier Limited. China:152-160.

Buzas EI, Gyrgöry B, Nagy G, Falus A, Gay S. (2014) Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 10(6):356-64.

Bonnevie ED, Delco ML, Fortier LA, Alexander PG, Tuan RS, Bonassar LJ. (2015) Characterization of tissue response to impact loads delivered using a hand-held instrument for studying articular cartilage injury. *Cartilage*. 6(4):226-32.

Briggs DT, Sadr KN, Pulido PA, Bugbee WD. (2015) The use of osteochondral allograft transplantation for primary treatment of cartilage lesions in the knee. *Cartilage*. 6(4):203-7.

Brisson BK, Barton ER. (2012) Insulin-Like Growth Factor-I E-Peptide Activity is Dependent on the IGF-I Receptor. *PLoS ONE* 7(9): e45588. doi:10.1371/journal.pone.0045588

Cajas LJ, Casallas A, Medina YF, Quintana G, Rondón F. (2020) Pannus y artritis reumatoide: evolución histórica y fisiopatológica. *Rev Colomb Reumatol*. 26(2). <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2018.05.003>

Choukair D, Hügel U, Sander A, Uhlmann L, Tönshoff B. (2014) Inhibition of IGF-1-related intracellular signaling pathways by proinflammatory cytokines in growth plate chondrocytes. *Ped Res.* 76,3. 245-251.

Chu CR, Beynon BD, Buckwalter JA, Garrett WE Jr, Katz JN, Rodeo SA. (2011) Closing the gap between bench and bedside research for early arthritis therapies (EARTH): report from the AOSSM/NIH U-13 Post-joint injury osteoarthritis conference II. *Am J Sports Med.* 39(7): 1569-78.

Dyce KM. (2010) Aparato locomotor. Cap. 2, en: Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Anatomía de los animales domésticos. Manual moderno, 4ª Ed. México. 39-99.

Fitzgerald O, Soden M, Yanni G, et al. (1991) Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 50:792-96.

Fortier LA, Balkman CE, Sandell LJ, Ratcliffe A, Nixon A. (2001) Insulin-like growth factor-1 gene expression patterns during spontaneous repair of acute articular cartilage injury. *J Orth Res.* 19:720-728.

Frisbie D. (2005) Future directions in treatment of joint disease in horses. *Vet Clin Equine.* 21:713-724.

García-Lacy F, Gutiérrez-Olvera L, Bernad M, Fortier L, Trigo-Tavera FJ, Gómez-Chavarín M, Rodríguez-Monterde A. (2022) Pharmacokinetic analysis of intraarticular injection of insulin and its effect on IGF-1 expression in synovial fluid of healthy horses. *Rev Mex Cienc Pecu.* 13(2):391-407.

García-Segura LM, Arévalo MA, Azcoitia I. (2010) Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signaling in the nervous system: new advances. *Prog Brain Res.* 181:251-72.

Geneser F. (2001) Tejido esquelético. Cap 12, En: Geneser F. *Histología*. Editorial Médica Panamericana, 3rd Ed. Madrid, España. 263-97.

Getty R. (2000) Sindesmología general (artrología). Cap 3, en: Getty R. Sisson y Grossman *Anatomía de los animales domésticos*. Masson SA, 5ª Ed. México. 39-44.

Glass K, Watts A. (2017) Septic arthritis, physitis and osteomyelitis in foals. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 33(2):299-314.

Goodrich LR, Brower-Toland BD, Warnick L, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ. (2006) Genetic Modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-I enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg.* 89-B:672-85.

Hadler NA, Palmer JL, Jones J. (1981) The biology of the extracellular space. *Clin Rheum Dis.* 7:71-97.

Hardy J, Bertone AL, Muir WW. (1996) Joint pressure influences synovial blood flow as determined by colored microspheres. *J Appl Physiol.* 80:1225-32.

Hardy J, Bertone AL, Muir WW. (1998) Local hemodynamics, permeability and oxygen metabolism of innervated or denervated isolated equine joints. *Am J Vet Res.* 59(10):1307-16.

Hewitt AT, Varner HH, Silver MH, Martin GR. (1982) The role of chondronectin and cartilage proteoglycan in the attachment of chondrocytes to collagen. *Prog Clin Biol Res.* 110 Pt B:25-33.



Hughes LC, Archer CW, Gwynn I. (2005) The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *Eruop C and Mat.* 9:68-84.

Oke SL & Mcllwraith CW. (2010) Review of the economic impact of osteoarthritis and oral joint health supplements in horses. *AAEP Proceedings.* 56:12-16.

Le, Kq., Prabhakar, B., Hong, Wj. et al. (2015) Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* **36**:1212–1218.

Levick JR. (1984) Blood flow and mass transport in sinovial joints. The cardiovascular system IV: The microcirculation. En: Renkin EM, Michel CC, eds. *Handbook of physiology.* Bethesda, MD: American Physiological Society:917-994.

Levick JR. (1990) Hypoxia and acidosis in chronic inflammatory arthritis: relation to vascular supple and dynamic effusion pressure. *J Rheumatol.* 17:579-82.

Liu Q, Guan JZ, Sun Y, Le Z, Zhang P, Yu D, Liu Y. (2017) Insulin-like growth factor 1 receptor-mediated cell survival in hypoxia depends on the promotion of autophagy via supression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol med rep.*15. 2136-2142.

Mcllwraith CW, Fortier LA, Frisbie DD, Nixon AJ. (2011) Equine models of articular cartilage repair. *Cartilage.* 2(14):317-26.

Mescher AL. (2021) Cartilage. En: Junqueira's basic histology text & atlas. 16a Ed. McGraw Hill. Nueva York, EUA.

Miller EJ, Rhodes RK. (1982) Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol.* 82:33-64.

Morris EA, Treadwell BV. (1994) Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res.* 5(1):138-46.

Moyer W, Schumacher J, Schumacher J. (2007) A guide to equine joint injection and regional anesthesia. Yardley PA: Veterinary Learning Systems, USA.

Myers SL, Christine TA. (1983) Hyaluronate synthesis by sinovial villi in organ culture. *Arthritis Rheum.* 26:764-70.

Nixon AJ, Brower-Toland BD, Sandell LJ. (1999) Primary nucleotide structure of predominant and alternate splice forms of equine insulin-like growth factor I and their gene expression patterns in tissues. *AJVR.* 60(10):1234-41.

Phillipou A, Papageorgiou E, Bogdanis G, Halapas A, Sourla A, Maridaki M, Pissimissis N, Koutsilieris M. (2009) Expression of IGF-1 isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: Characterization of the MGF E peptide actions *in vitro*. *In vivo.* 23:567-76.

Pfeffer LA, Brisson BK, Hanquin L, Barton ER. (2009) The Insulin-like Growth Factor (IGF-1) E-peptides modulate cell entry to mature IGF-1 protein. *Mol Biol of the Cell.* 20, 3810-3817.

Revel PA, Al-Saffar N, Fish S, et al. (1995) Extracellular matrix of the sinovial intimal cell layer. *Ann Rheum Dis.* 54:404-407.

Sherman SL, Khazai RS, James CH, Stoker AM, Flood DL, Cook JL. (2015) *In vitro* toxicity of local anesthetics and corticosteroids on chondrocyte and synoviocyte viability and metabolism. *Cartilage.* 6(4):233-40.

Strand E, Martin GS, Crawford MP, et al. (1994) Intra-articular pressure and elastance of the equine metacarpophalangeal joint in health and disease (abstract). *Vet Surg.* 23:417.

Tonkin J, Temmerman L, Sampson RD, Gallego-Colon E, Barberi L, Bilbao D, Schneider MD, Musarò A, Rosenthal N. (2015) Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 orchestrates murine skeletal muscle regeneration and modulates autocrine polarization. *Am Soc of Gene & Cell Ther.* 23(7):1189-1200.

*uniprot.com*

Van der Meijden OAJ, Gaskill TR, Millet P. (2012) Glenohumeral joint preservation: A review of management options for young, active patients with osteoarthritis. *Adv Orthop.* 2012: 160923. doi: 10.1155/2012/160923

Verschure PJ, Van Noorden CJ, van Marle J, van den Berg WB. (1996) Articular cartilage destruction in experimental inflammatory arthritis: insulin-like growth factor-1 regulation of proteoglycan metabolism in chondrocytes. *Histochem J.* 28:835-57.

Verwilghen D, Busoni V, Gangl M, Franck T, Lejeune JP, Vanderheyden L, Dentilleux J, Grulke S, Deberg M, Henrotin Y, Serteyn D. (2009) Relationship between biochemical markers and radiographic scores in the evaluation of the osteoarticular status of Warmblood stallions. *Res Vet Sci.* 87(2):319-28.

Vos NJ, Ducharme NG. (2008) Analysis of factors influencing prognosis in foals with septic arthritis. *Ir Vet J.* 61(2):102-6.

Woodruff T, Blake DR, Freeman J, et al. (1986) Is chronic synovitis an example of reperfusion injury? *Ann Rheum Dis.* 45:608-11.

Zvaifler NJ. (1995) Macrophages and the synovial lining. *Scand J Rheumatol.*  
24(suppl 101):67-75.

## 17. Anexo1: Protocolos

### Cuantificación de proteína total de líquido sinovial (BCA PROTEIN ASSAY KIT):

1. Congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$  las muestras de líquido sinovial hasta su uso.
2. Para preparar la solución de trabajo calcular lo siguiente:  
(# Estándares + # de muestras) x (# de réplicas) x (volumen de solución de trabajo por muestra) = volumen total de la solución de trabajo requerida.  
Ej. (9 estándares+3 muestras) x (2 réplicas) x 2 ml de solución de trabajo) = 48 ml de solución de trabajo.  
*Se requiere 2 ml de solución de trabajo para cada tubo si el procedimiento se hace en tubos, si se hace en microplaca se requiere 200  $\mu\text{l}$  por placa, es decir 9.6 ml ~ 10 ml.*  
Prepare la solución de trabajo mezclando 50 partes del reactivo (A) con 1 parte del reactivo B.  
Es decir 50 ml de A + 1 ml de B.  
Para 10 ml cuanto se necesitan 10 ml de A + 0.2 ml de B
3. Agregar 25  $\mu\text{l}$  de cada estándar o muestra por duplicado en los tubos de la microplaca (se pueden diluir las muestras tomando 10 o 5  $\mu\text{l}$  de cada una y disolver en 5  $\mu\text{l}$  de agua, tratando de ajustar al agregar a la placa 25  $\mu\text{l}$ ).
4. Agregar 200  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo (A+B) a cada pozo y mezclando en un agitador por 30 segundos.
5. Cubrir la placa e incubar 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ .
6. Lleve la placa a un lector de placas y medir la absorbancia entre a **540-590nm**.

### Determinación por ELISA de IGF-1 (MyBIOSource, Horse Insulin Like Growth Factor 1 (IGF1) ELISA kit, #MSBS017382)

#### Preparación de reactivos y almacenamiento:

1. El período válido del kit sin abrir es de hasta seis meses a  $2^{\circ}\text{C}$  -  $8^{\circ}\text{C}$ . El kit no puede usarse más allá de la fecha de caducidad.
2. La solución de lavado (1 x) – se diluyen un volumen de solución de lavado (20 x) con 19 volúmenes de agua destilada o desionizada. Solución es estable durante un mes a  $2^{\circ}\text{C}$  -  $8^{\circ}\text{C}$ . Sin diluir y el resto de los reactivos son estables hasta por seis meses a  $2^{\circ}\text{C}$  -  $8^{\circ}\text{C}$
3. Cuando abra el kit, por favor utilice la placa tan pronto como sea posible después de retirarla de la bolsa de aluminio, porque puede humedecerse. La placa es desmontable, así que regrese los pocillos no utilizados a la bolsa

que contiene el paquete de desecante y selle a lo largo de todo el filo del cierre para prevenir la humedad. Los reactivos restantes también deben almacenarse entre 2° C - 8° C. El período válido de kits de apertura puede variar dependiendo de varios factores, para obtener mejores resultados el kit se debe utilizar para arriba tan pronto como sea posible

**Procedimiento:**

1. Revisar la placa y los reactivos del kit y equipos antes de iniciar los experimentos para evitar problemas
2. Permitir que la placa, reactivos y muestras lleguen a temperatura ambiente (18° C - 25° C) antes de iniciar procedimientos de ensayo.
3. Como la placa es desmontable, se guardan en la bolsa las tiras no utilizadas con el desecante, cerrándola herméticamente para prevenir la humedad.
4. Establecer pozos blanco, estándares y muestra.
5. Depositar en los pozos cada muestra
  - a. No agregue nada al blanco
  - b. Agregue 50 µl de los estándares de S1 a S5 al pozo correspondientes
  - c. Agregue 50 µl de la muestra a cada pozo
6. Añadir 100 µl de reactivo de HRP-conjugado a cada pozo, excepto para pozos en blanco
7. Tapar la placa con una membrana e incubar durante 60 minutos a 37° C.
8. Lavar la placa 4 veces con el buffer de lavado.
9. Agregar 50 µl de solución de cromógeno A a cada pozo
10. Agregue 50 µl de solución de cromógeno B a cada pozo y cubra de la luz
11. Mezclar suavemente e incubar la placa durante 15 minutos a 37° C y cubrir de la luz
12. Agregar 50 µl de la solución de paro
13. Leer a densidad óptica (O.D.) a 450 nm utilizando un lector de ELISA en 15 minutos después de agregar la solución de parada (alrededor de 5 minutos es generalmente el mejor momento)

**Cálculos:**

Promedio de las lecturas duplicadas para cada estándar

<b>Concentración</b>	<b>Blanco</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>
<b>Media</b> <b>OD<sub>(450nm)</sub></b>	<b>OD0</b>	<b>OD1</b>	<b>OD2</b>	<b>OD3</b>	<b>OD4</b>	<b>OD5</b>	<b>OD6</b>

Mediante el software Graphpad Prism® se realiza la curva estándar (generalmente la curva estándar es de curva lineal, cuadrática y cúbica) y se calcula el nivel de análisis.

Si el valor de OD de las muestras es mayor que el valor de OD más alto de los estándares, se diluyen las muestras con igual o el doble del volumen de diluyente de muestra y se repite el ensayo.

### **Medición de TNF $\alpha$ por ELISA (Invitrogen, # ESS0017)**

Preparación de la placa:

1. Diluir el anticuerpo para cubrir la placa en 1:100 en buffer de carbonato-bicarbonato y añadir 110 $\mu$ L a 10.89ml del buffer de carbonato bicarbonato.
2. Añadir 100 $\mu$ L del anticuerpo diluido a cada pozo. Cubrir la placa con el sellador de placa e incubar toda la noche a temperatura ambiente.
3. Aspirar la solución y añadir 300 $\mu$ L del buffer de bloqueo a cada pozo. Cubrir la placa con el sellador de placa e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
4. Aspirar el buffer de bloqueo y proceder al ensayo o bien, permita secar toda la noche a temperatura ambiente. Cuando la placa está sellada, puede almacenarse 2-8°C por 6 meses.

Procedimiento:

1. Reconstituir el estandar con el diluyente con el volumen que dice en la etiqueta. La concentración del estándar reconstituido es de 10,000 pg/ml.
2. Diluir el estándar reconstituido 1:10 en el diluyente de reagente, para preparar el estándar mayor (1000pg/ml). Utilizando el diluyente de reagente, preparar soluciones seriadas 1:2 del estándar mayor y diluir cualquier sobrenadante que se espera que se lea por encima del estándar. Añadir 100 $\mu$ L de la muestra o del estándar a cada pozo. Cubrir y sellar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Aspirar y lavar 3 veces con el buffer de lavado usando 300 $\mu$ L por pozo.
4. Diluir el anticuerpo de detección 1:100 en el diluyente de reagente añadiendo 110 $\mu$ L del anticuerpo de detección a 10.89 ml del diluyente de reagente.
5. Añadir 100 $\mu$ L del anticuerpo de detección a cada pozo. Cubrir y sellar la placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
6. Aspirar y lavar 3 veces con el buffer de lavado usando 300 $\mu$ L por pozo.
7. Diluir Streptavidina-HRP 1:200 en el diluyente de reagente añadiendo 60 $\mu$ L de streptavidina-HRP a 12 ml del diluyente de reagente.

8. Añadir 100µL de esta solución a cada pozo. Cubrir y sellar la placa e incubarla por 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Aspirar y lavar 3 veces con el buffer de lavado usando 300µL por pozo.
10. Añadir 100µL de la solución de sustrato a cada pozo. Cubrir y sellar la placa e incubar en oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente.
11. Detener la reacción añadiendo 100µL de la solución de paro a cada pozo.
12. Medir absorbancia a 450-550nm.

### **Medición de IL-6 por ELISA (Cusabio, #CSB-E16634Hs)**

#### Procedimiento:

1. Preparar los reagentes, los estándares y las muestras como lo indica el fabricante.
2. Revisar la hoja de ensayo para determinar el número de pozos a utilizarse y colocar los restantes en la bolsa y sellar el ziploc, para almacenarlos a 4°C.
3. Añadir 100µL del estándar y muestra por pozo. Cubrir y sellar la placa e incubar por 2 horas a 37°C. Una hoja de la placa es provista para anotar todos los estándares y muestras que fueron utilizados.
4. Retirar el líquido de cada pozo. Sin lavar.
5. Añadir 100µL del complejo avidina-anticuerpo (1x) a cada pozo. Cubrir con una nueva tira adhesiva e incubar por 1 hora a 37°C. (El complejo avidina-anticuerpo 1x puede parecer turbio. Se puede temperar a temperatura ambiente y agitar gentilmente hasta que la solución se vea uniforme).
6. Aspirar cada pozo y lavar 5x utilizando el buffer de lavado (200µL) y dejar reposando por 2 minutos, quitar el líquido en cada paso es esencial para tener un buen rendimiento en la reacción. Entre cada lavado, remover el exceso de buffer de lavado. Se puede invertir la placa sobre papel secante o servitoallas.
7. Añadir 100µL del complejo avidina-HRP (1x) a cada pozo. Cubrir y sellar la placa e incubar por 1 hora a 37°C.
8. Repetir el paso 6.
9. Añadir 90µL del sustrato TMB a cada pozo. Cubrir y sellar la placa e incubar por 15-30 min a 37°C y en oscuridad.
10. Añadir 50µL de la solución de paro a cada pozo, golpear la placa con la mesa gentilmente para asegurar una buena mezcla.
11. Determinar la densidad óptica dentro de los 5 minutos posteriores a la solución de paro y leer a 450nm. Si el equipo tiene disponible la función de corrección de longitud de onda, configurar la lectura a 540nm o a 570nm. Restar las lecturas de 540 o 570nm a las de 450nm, esto corregirá las imperfecciones ópticas en la placa.



## Determinación de concentración de proteína total en muestras de líquido sinovial por el método de cuantificación Lowry

1. Preparar 21 g de BSA y diluir en 1 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ.
2. Calibrar a 0 el espectrofotómetro (280nm) con una cubeta de cuarzo utilizando H<sub>2</sub>O MilliQ.
3. Se diluye 1:50 la solución de BSA (980µL de H<sub>2</sub>O MilliQ y 20µL de BSA, para 1 ml) y se realiza la lectura por triplicado y se saca el promedio del valor de absorbancia.
4. Calcular con la fórmula de coeficiente de extinción molar para así obtener el valor en 1mg/ml. Ej:

$$\text{CEM} = 0.653 - 1\text{mg/ml}$$

Realizar regla de 3 donde:

$$\begin{array}{l} 0.653 \text{ ---- } 1\text{mg/ml} \\ (\text{valor de absorbancia}) \text{---- } X \end{array}$$

Donde X se multiplicará por el factor de dilución (50). Ahora se puede calcular el volumen para preparar 2 mg/ml.

5. Determinar estándares de BSA a partir de la solución a 2 mg/ml como sigue:

Etiqueta	H <sub>2</sub> O (ml)	BSA (µL)	Cantidad en µG
A	0	50	100
B	10	40	80
C	20	30	60
D	30	20	40
E	35	15	30
F	40	10	20
G	45	5	10
H	47.5	2.5	5
I	50	0	0

6. Medir absorbancias por triplicado de cada estándar a 280 nm. Y calcular la ecuación de la recta para determinar la concentración en µg/µL a partir de la densidad óptica, utilizando la fórmula:

$$y = mx + b$$

Nota: El valor de R<sup>2</sup> debe ser lo más cercano a 1.

7. Medir absorbancias de las muestras por triplicado a 280 nm.
8. Preparar soluciones A+B+C (50:0.5:0.5), dependiendo la cantidad de tubos a utilizar, calcular 600µL por tubo y añadir uno extra. Una vez preparada, se agregan los 600µL a cada tubo y dejar incubar 15 min en oscuridad.
9. Calcular la cantidad de la solución de Folin (1:4) y añadir 300µL a cada tubo. Ej: tengo 16 tubos, se calcula  $300 \times 16 = 4,800 \mu\text{L}$ . Se calcula la dilución 1:4 de solución de Folin lo que da: 1.2 ml de ésta, con 3.6 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ.
10. Se añaden 300µL de la solución de Folin a cada tubo y se deja incubar 30 min en oscuridad.
11. Se procede a leer la absorbancia por triplicado a 280 nm y se calcula la concentración basado en la ecuación de la recta.

### **Protocolo para PAGE y Western blot para IGF-1 de caballo a partir de líquido sinovial**

1. Preparar el PAGE a 16% con glicerol 13%.
2. Cargar cada pozo con 100µg de proteína con 5µL de buffer de corrida y 1µL de DTT. (Hacer dos geles en espejo).
3. Hervir las muestras por 4 minutos y cargar el gel.
4. Correr el gel en frío a 90V por 30 min y a 120V por 3.5 horas.
5. Una vez terminada la electroforesis, equilibrar gel por 13 min y esponjas y membrana (activada previamente con MetOH) por 30 minutos.
6. Transferir un gel (sistema semihúmedo a 271mA por 15 min) a membrana PVDF (0.45µM) y el otro teñirlo con Coomasie coloidal.
7. Una vez transferido, lavar 3x con H<sub>2</sub>O MilliQ (se puede guardar toda la noche en PBS (pH7.4) a 4°C. y se lava una cuarta vez con PBS (pH7.4).
8. Se prepara la solución de bloqueo con leche en polvo sin grasa al 4% diluida en PBS (pH7.4). Y se incuba en agitación (120rpm) a 37°C por 2 horas.
9. Lavar 3x por 5 minutos con PBS-T (0.05%).
10. Incubar con anticuerpo primario anti-IGF-1 (Sta. Cruz #Sc-1422) diluido 1:1000 en PBS-T (0.05%) en agitación (120rpm) a 37°C por 2 horas.
11. Dejar toda la noche a 4°C.
12. Lavar 3x por 5 minutos con PBS-T (0.05%).
13. Incubar con anticuerpo secundario anti-goat (Millipore #AP180B) diluido 1:5000 en PBS-T (0.05%) en agitación (120rpm) a 37°C por 2 horas.
14. Lavar 3x por 5 minutos con PBS-T (0.05%). Y un cuarto lavado con PBS (pH7.4).
15. Revelar membrana con Quimioluminiscencia utilizando: Merck Millipore, Luminata # WBLUF0500, e incubar con luminol y peroxidasa 1:1. Y quitar el excedente con pipeta. Y colocando la membrana entre 2 acetatos.

16. Fotografiar con equipo de alta resolución (Bio-Rad ChemiDoc), donde el tiempo óptimo de exposición es de 35 segundos.

## 18. Anexo 2: Soluciones para PAGE y Western Blot para IGF-1 de caballo a partir de líquido sinovial

### Acrilamida Bis 30%:

Acrilamida	60 g
Bis-Acrilamida	1.6 g
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 200 ml*

\*Desgasificar la preparación antes de usarse.

### Buffer Laemmli pH 8.3 (Buffer de corrida):

	2L	1L
Tris	6.1 g	3.05 g
Glicina	28.88 g	14.44 g
SDS	2 g	1 g
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 2 L	Aforar a 1 L

NOTA: Antes de aforar, ajustar pH a 8.3

### Glicerol 80%:

	50 ml	100 ml
Glicerol	40 ml	80 ml
dH <sub>2</sub> O	10 ml	20 ml

### 4x Resolving gel Buffer (Tris-HCl, pH 8.8) (Gel separador):

	100 ml	200 ml
Tris	18.15 g	36.3 g
SDS	0.4 g	0.8 g
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 100 ml	Aforar a 200 ml

NOTA: Antes de aforar, ajustar pH a 8.8

### 4x Stacking gel Buffer (Tris-HCl, pH 6.8) (Gel concentrador):

	50 ml
Tris	3 g
SDS	0.2 g
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 50 ml

NOTA: Antes de aforar, ajustar pH a 6.8

### Protocolo tinción Coomassie coloidal:

1. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O MilliQ por 2 minutos, 3 veces. O hasta retirar el exceso de SDS.
2. Verter solución de Coomassie e incubar en agitación por 2-12 horas. A los 10 minutos, se pueden ver las primeras proteínas y a las 2 horas, estarán teñidas hasta el 80% de las proteínas. (Agitar bien la solución antes de usarse).
3. Remover la solución de Coomassie (decentar).
4. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O MilliQ, 3 veces.
5. Remover las partículas de Coomassie del recipiente con una gasa.
6. Incubar el gel con solución desteñidora por 10-60 minutos.
7. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O MilliQ, 3 veces.
8. Incubar el gel con H<sub>2</sub>O MilliQ overnight. Y estará listo para fotodocumentarse.

### Solución de Coomassie coloidal:

	100 ml	200ml	1 L
1. Sulfato de Al y K	5 g	10 g	50 g
2. Etanol absoluto	10 ml	20 ml	100 ml
3. Coomassie brilliant Blue G-250 (90%)	22.2 mg	44.4 mg	222 mg
4. Ácido fosfórico	5.5 ml	10.2 ml	55 ml
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 100 ml	Aforar a 200 ml	Aforar a 1L

NOTA: El orden de cómo añadir a la mezcla debe respetarse para que la solución no se precipite. El Sulfato de Al y K debe irse añadiendo poco a poco y esperar a que esté bien disuelto antes de añadir el etanol también poco a poco. No debe filtrarse y debe guardarse en una botella ámbar u oscura.

### Solución desteñidora para Coomassie coloidal:

	100 ml	1L
Etanol absoluto	10 ml	14 ml
Ácido fosfórico	1.4 ml	55 ml
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 100 ml	Aforar a 1 L

**Preparación de PAGE con glicerol 13%:**

	Gel concentrador	Gel separador (Resolving gel)	
	4%	12%	16%
Acrilamida (30%)	330 uL	1.995 ml	2.7 ml
Tris-HCl pH 6.8	500 uL	--	--
Tris-HCl pH 8.8	--	1.3 ml	1.3 ml
Glicerol 80%	325 uL	812 uL	812 uL
dH <sub>2</sub> O	915 uL	188 uL	188 uL
PSA 10%	20 uL	50 uL	50 uL
TEMED	2 uL	2 uL	2 uL
Volumen final	2 ml	5.05 ml	5.05 ml

**PBS 1x (pH 7.4):**

	500 ml	1 L
Fosfato de Na monobásico monohidratado	0.132 g	0.264 g
Fosfato de Na dibásico anídrido	0.575 g	1.15 g
NaCl	4.375 g	8.75 g
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 500 ml	Aforar a 1 L

NOTA: Antes de aforar, ajustar pH a 7.4

**Buffer de transferencia**

Tris Base	30.3 g
Glicina	144 g
Ajustar pH 8.6	
Aforar a 1L	

**Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) concentrations in synovial fluid of sound and osteoarthritic horses, and its correlation with proinflammatory cytokines IL-6 and TNF $\alpha$**

Fernando García-Lacy <sup>a</sup>

Sara Teresa Méndez-Cruz <sup>b</sup>

Horacio Reyes-Vivas <sup>b</sup>

Victor Manuel Dávila-Borja <sup>c</sup>

Jose Alejandro Barrera-Morales <sup>d</sup>

Gabriel Gutiérrez-Ospina <sup>e</sup>

Margarita Gómez-Chavarín <sup>f\*</sup>

Francisco José Trigo-Tavera <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos. Ciudad de México. México.

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Pediatría. Laboratorio de Bioquímica Genética. Ciudad de México. México.

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Pediatría. Laboratorio de Oncología Experimental. México.

<sup>d</sup> SEDENA. Centro Ecuestre de Alto Rendimiento. Ciudad México. México.

<sup>e</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Ciudad de México. México.

<sup>f</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina. Departamento de Fisiología. Ciudad de México. Mexico.

<sup>g</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Patología. Ciudad de México. México.

\*Corresponding author: margaritachavarin@gmail.com

## Abstract

Insulin-like growth factor I (IGF-1) is the most important known growth factor for cartilage repair in horses. It promotes mitosis of chondrocytes, collagen II expression, and extra cellular matrix production. Osteoarthritis (OA) is the most common musculoskeletal condition that causes lameness and poor performance in sport horses. A total of 11 lame horses were clinically and radiographically evaluated, and all were confirmed to suffer a front metacarpophalangeal lameness by a positive flexion test, a low-4-point nerve block and an intraarticular block. Total protein, IGF-1, IL-6 and TNF $\alpha$  were determined by ELISA, demonstrating changes and different correlations between clinical condition, radiographic changes and degree of inflammation. All horses with joint associated pain and therefore associated lameness, demonstrated a significant increase of total protein ( $P<0.0001$ ) and IGF-1 concentration ( $P<0.05$ ). Concentrations of IL-6 and TNF $\alpha$  between controls and lame horses demonstrated significant differences ( $P<0.01$  and  $P<0.001$  respectively). Horses with less radiographic changes, demonstrated the highest IGF-1 expression in synovial fluid, and horses with more chronic OA conditions had very similar IGF-1 expression levels than control joints. In all lame joints, we identified by Western blot a lighter isoform of IGF-1 (~7.5 kDa) which was inflammation related and it is the molecular weight of the mature peptide, and all control joints expressed a heavier isoform (~12 kDa). This finding could lead to new research for sequencing and targeting the isoform which is not expressed during an inflammatory process within a joint, and to have a better understanding of its role in the horse's joint.

**Key words:** Insulin growth factor 1 (IGF-1), Horse, Osteoarthritis (OA), Lame.

Received: 21/05/2022

Accepted: 07/09/2022

## Introduction

Insulin-like growth factor I (IGF-1) is the most important known growth factor for cartilage repair in horses, because it stimulates proteoglycan synthesis, and therefore extra cellular matrix (ECM), and promotes mitosis of chondrocytes. It has an important growth-promoting activity not only in articular cartilage, but in several tissues, mainly in muscle, bones and brain. It activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, having several effects in promoting: cell survival, growth, proliferation, protection to hypoxia, inflammation regulation in muscle injuries and in bone growth plates<sup>(1-4)</sup>. It has also a key role in brain development, along with estradiol, regulating a variety of developmental and neuroplastic



events<sup>(5)</sup>. In structure, it is very similar to insulin. When insulin is instilled in a joint, IGF-1 expression in synovial fluid is enhanced<sup>(6)</sup>.

Injuries of the articular cartilage are normally repaired by substitution with fibrocartilage, which leads to loss of function of the joint resulting in osteoarthritis (OA)<sup>(7)</sup>. Lameness is the most frequent reason for which equine practitioners are required from horse owners, and OA represents more than 60 % of all lameness cases in sport horses<sup>(8)</sup>. The main problem in OA is inflammation, conditioning an imbalance between catabolism and anabolism in the articular cartilage. In this particular tissue, the only cellular component is constituted by chondrocytes, which are responsible of ECM synthesis, in order to maintain adequate cartilage function.

There is evidence regarding exogenous efficacy of IGF-1 *in vitro*, which enhances proteoglycan synthesis by stimulated chondrocytes. Other therapies, such as chondrocyte transplantation from mature and neonatal chondrocytes, gene therapy strategies to upregulate IGF-1 expression by transfected chondrocytes, require general anesthesia, a surgical procedure and therefore specialized equipment and personnel<sup>(9)</sup>.

On a pilot study conducted by the authors in which 13 synovial fluid samples obtained from different joints (distal interphalangeal joints, metacarpophalangeal joints, shoulder joints, tarsometatarsal joints, and stifles) from horses with associated lameness AAEP (American Association of Equine Practitioners) grade: 2/5, no radiographic changes but a positive response on 1-minute flexion test. By ELISA, a significant increase of IGF-1 and a positive correlation between total protein and IGF-1 levels in synovial fluid (data not shown) were found. In this study it was obtained synovial fluid samples from 21 horses with different degrees of OA (confirmed by intraarticular block and radiographic changes) in the metacarpo-phalangeal joint (MCPJ), where IGF-1 and total protein correlated positively in horses with acute OA, and negatively in horses with chronic OA and marked bone remodeling. In horses with mild or non-radiographic changes (acute OA), IGF-1 correlated negatively with interleukin-6 (IL-6) and tumoral necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ). Interestingly, were able to find by western blot, at least two functional isoforms of IGF-1 expressed in synovial fluid, one present only in control horses, and the other in lame horses.

To our knowledge, there is no information regarding IGF-1 fluctuations on naturally occurring OA. There are no *in vivo* studies regarding IGF-1 levels during OA. Perhaps this paper can help practitioners to understand the role of IGF-1 for this particular condition and could be used as a baseline for further studies on IGF-1 concentration and its possible use as an alternative treatment.

## **Material and methods**

Synovial fluid samples were obtained from Warmblood and Thoroughbred horses (n=11) from two different disciplines: showjumpers (Warmblood) (n= 8), and race horses (Thoroughbred) (n= 3) with a mean age of 10.5 yr old and a mean weight of 520 kg. Control (Ctrl) samples were obtained from two geldings, Warmblood horses of 5 and 7 yr old. No more control horses were available for the study, since they all were sound, it was not easy to obtain consent from the owners to sample their joints. A complete lameness evaluation and radiographic assessment were performed in all control horses in order to be included in this study. None of them showed signs of front limb lameness and were negative to passive and active flexion tests (30 sec). Additionally, none of them presented any radiographic changes associated with joint pathology in the metacarpophalangeal joint.

### **Lameness evaluation**

A clinical evaluation was performed on all horses included in this study, in order to find evidence of lameness associated with the metacarpo-phalangeal joint of the front limbs. Evaluation consisted on static observation, palpation and passive flexion response; dynamic evaluation of walk and trot on a straight line and lunged on hard and soft surface. All included horses demonstrated a 2 and 3/5 lameness (AAEP), with a positive flexion test (1 min). Additionally, all horses were positive to low-4-point block (lateral and medial palmar nerves and lateral and medial metacarpal nerves), using 2 and 1.5 ml respectively of 2 % mepivacaine (Carbocaine, Zoetis Inc.) and further intra-articular block of the metacarpal-phalangeal joint, using a volume of 6 ml of 2 % Mepivacaine (Carbocaine, Zoetis Inc.) as previously described<sup>(10)</sup>. Any horse negative to these blocks, was excluded from the study.

### **Synovial fluid collection**

All synovial fluid samples were obtained from the metacarpal-phalangeal joint MCPJ joints of lame horses, using an aseptic technique on the palmaro-lateral approach as previously described and 5 d after the intraarticular (IA) block<sup>(10)</sup>. Samples were obtained from healthy horses and were used as controls (n= 4).

## Radiographic evaluation

All selected horses were radiographically evaluated from the MCPJ, using four standard views (dorso-palmar, latero-medial, dorso-lateral palmaro-medial, and dorso-medial palmaro-lateral) in order to assess the radiologic condition of all horses. Three different grades of radiologic changes were determined associated with the clinical condition of the horse (Table 1).

**Table 1:** Grade of severity and its relation on clinical and radiographic findings on horses included in this study

Grade	Radiographic and clinical findings
I	Non to minor changes associated with joint pain and lameness: Irregularity and loss of normal homogeneity of the sagittal ridge of MTCIII.
II	Moderate changes associated with joint pain and lameness: Osselets (osteophytes) on P1 and MTCIII.
III	Severe changes associated with severe lameness and decrease of motion range: suprachondilar or subchondral lysis, osteophytes and new bone formation with periostic reaction and loss of articular space.

(Modified from: Verwilghen D, *et al.* 2009)<sup>(11)</sup>.

## Protein concentration determination

The concentration of total protein from all synovial fluid samples was obtained by using the BCA Protein Assay Kit, (Pierce BCA Protein Assay Kit cat. 23225), according with the manufacturer's instructions. For each sample the final concentration was 100 µg/50 µL for the ELISA procedure.

## IGF-1 concentration analysis

Determination of IGF-1 concentration in synovial fluid samples of control and osteoarthritic horses was made with 50 µL using a commercial ELISA kit (Horse IGF1 ELISA kit, #MBS017382, MyBio-Source®) following the manufacturer's instructions.

## **Interleukin 6 (IL-6) concentration**

A quantitative determination of IL-6 in synovial fluid of all samples was performed using a commercial ELISA kit (Horse interleukin-6 ELISA kit, cat. #: CSB-E16634Hs), which is a sandwich immunoassay technique, where the plates are coated with a specific horse IL-6 antibody, then, a specific biotin-conjugated antibody for IL-6 and then avidin conjugated horseradish peroxidase (HRP) are added. Protocol is performed following manufacturer's instructions.

## **Tumoral necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) concentration**

Determination of TNF $\alpha$  concentration in synovial fluid samples of control and osteoarthritic horses was made with 100  $\mu$ l using a commercial ELISA kit (Equine TNF $\alpha$  ELISA kit, cat #: ESS0017 Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

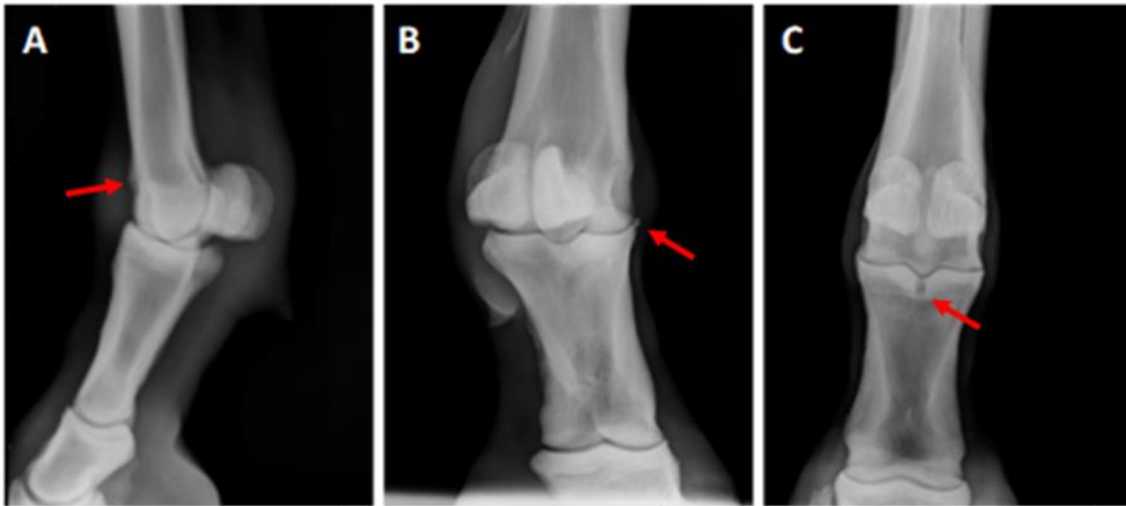
## **Western Blot analysis**

Equal amounts of protein (100  $\mu$ g per lane), were subjected to a 16 % SDS-PAGE (90V for 30 min and 120 V for 3.5 h). Precision Plus Protein Dual Color Standards marker was used, containing ten prestained recombinant proteins (10 to 250 kD), including eight blue-stained bands and two pink reference bands (25 and 75 kD). After electrophoresis, gels were transferred using a semi-dry transfer system (271mA for 15 min) to PVDF (0.45 $\mu$ M) (Bio-Rad) membranes, which were blocked using 4% skim milk diluted in PBS (pH 7.4) and incubated on a shaker at 37 °C, 120 rpm for 2 h. After blocking, membranes were washed 3x (for 5 min each) using PBS containing 0.05% Tween-20. As a primary antibody, a goat polyclonal anti-IGF-1 (1:1000) (Sta. Cruz #Sc-1422) was used, incubated on a shaker first at 37 °C, 120 rpm for 2 h, and left overnight at 4 °C; membranes were washed again as previously described and as a secondary antibody, a polyclonal anti-goat IgG (1:5000) (Millipore #AP180B) was used, and incubated on a shaker at 37 °C, 120 rpm for 2 h and a final wash of the membranes was performed. Proteins were detected by using an enhanced chemiluminescence method and visualized using a high-resolution Imaging System (Bio-Rad ChemiDoc). Membranes were incubated to a 1:1 dilution of luminol and peroxidase (Merck Millipore, Luminata # WBLUF0500), and exposed at various times, where the optimum time of exposure was 35 seconds.

## Results

A total of 45 horses were examined, from which only 11 horses (22 samples) were included in this study, and 2 horses (4 samples) as controls. All horses varied from each other in degrees of lameness and radiographic changes, and all responded positively to the digital flexion test, low-4-point block and intraarticular (IA) block of the fetlock joint. Six joints were scored as grade I, five joints were scored as grade II and 8 joints were grade III (Figure 1).

**Figure 1:** Representative radiographs from horses scored with various grades Grade 1 (A) Lateromedial view with a mild irregularity of the proximal-dorsal aspect of the sagittal ridge (arrow); Grade II (B) Dorsolateral palmaromedial oblique view with a visible osteophyte on the proximal dorso-medial aspect of P1 (arrow); and Grade III (C) Dorsopalmar view where a subchondral bone cyst in the proximal aspect of first phalanx in the sagittal groove with areas of bone sclerosis (arrow).



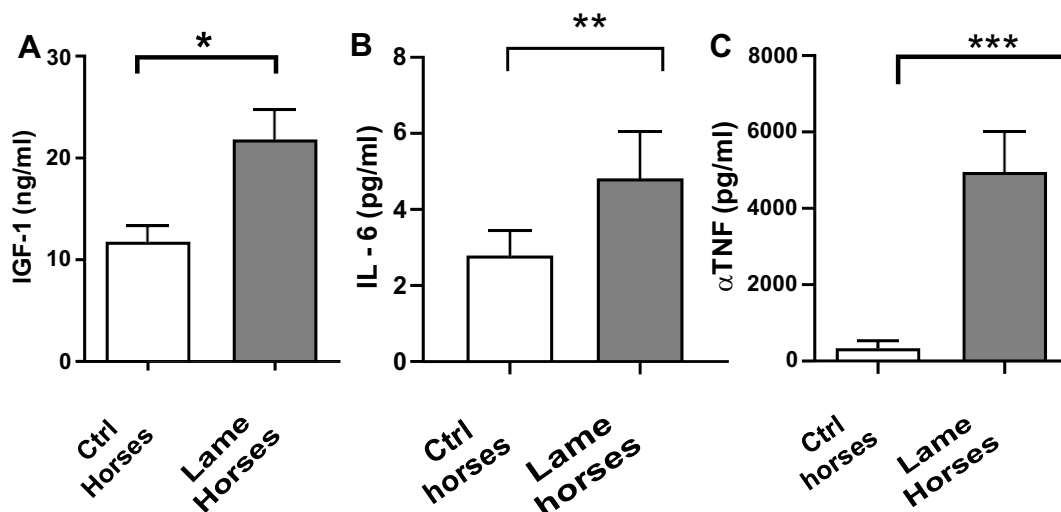
## IGF-1 concentration

All horses with joint associated pain, lameness, and less radiographic changes, demonstrated a significant increase of IGF-1 concentration ( $P<0.05$ ) (Figure 2). All samples were repeated by pairs and read three times in a 5, 10 and 15-min period with no difference between measurements (data not shown) and the values of linear regression and standard curve were:  $P<0.001$ ;  $r^2=0.9931$ .

## IL-6 and TNF $\alpha$ analysis

Concentrations of IL-6 between controls and lame horses, showed a significant difference as well ( $P<0.01$ ). TNF $\alpha$  concentrations between controls and lame horses showed even more significant differences in terms of concentration ( $P<0.001$ ), being higher on lame horses with more severe changes in the affected joints (Grade III). A Pearson's correlation analysis was performed demonstrating a positive correlation between total protein and IGF-1 concentrations ( $r= 1$ ), which was seen in grade I and II horses, whereas in grade III this correlation is negatively or inversely proportional. In other words, the worse changes a joint had (as seen in grade III horses), the less IGF-1 concentration in synovial fluid was observed.

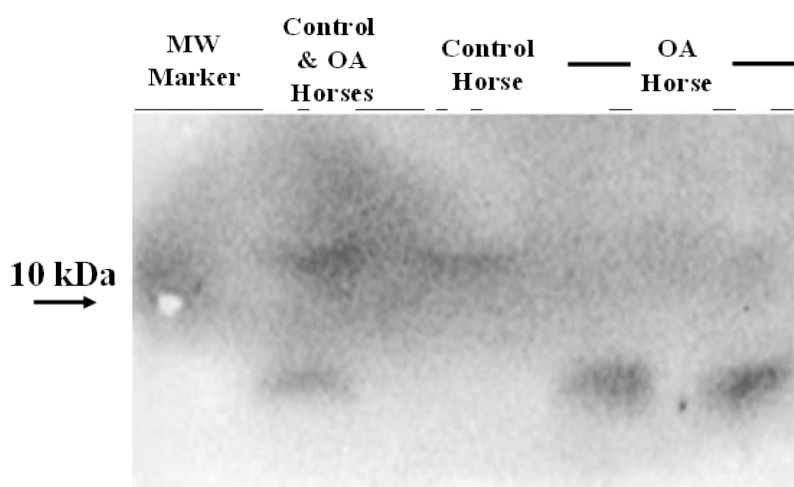
**Figure 2:** **A)** IGF-1 determination between control (sound) and lame horses, demonstrating a significant difference ( $P<0.05$ )\*. **B)** Concentrations of IL-6 between controls and lame horses, showed a significant difference as well ( $P<0.01$ )\*\*. **C)** TNF $\alpha$  concentrations between controls and lame horses showing significant differences in concentration ( $P<0.001$ )\*\*\*.



## Western blot analysis

Horses with less radiographic changes demonstrated a higher IGF-1 concentration concordantly with the ELISA results for IGF-1 (Grade I and II). Horses with more severe radiographic changes and a chronic state of the pathologic condition (Grade III), were the ones with the lowest IGF-1 concentrations in both ELISA and WB analysis. Interestingly, with this analysis we were able to identify in all samples, two different bands, one of ~12 kDa which was seen only in control (normal) horses with no joint pathology, and another of ~7.5 kDa seen in all lame horses (Figure 3).

**Figure 3:** Representative photograph of Western blot analysis for IGF-1, demonstrating a difference in molecular weight between synovial fluid samples indicating the existence of two different isoforms present in normal joints and during an inflammatory process.



1: Protein marker (marking 10 kDa); 2: Samples from a control horse and a horse with OA; 3: Control horse; 4 & 5: Two different samples from horses with OA.

## Discussion

Sport horses are exposed to excessive loads to their joints and soft tissue structures. The joint that can undergo traumatic OA depends on the discipline in which the horse performs. There's evidence regarding interventions such as joint injections on acute phases of the disease that can help modify its course and prevent further damage while the horse is still performing<sup>(12)</sup>. Impact loads due to exercise are responsible of damaging articular cartilage by first cracking the surface, and depending on the force applied and the time it is being applied, the depth and therefore the severity of the development of the disease (OA) are produced. Characterization of mechanical consequences of impact injuries to articular cartilage has been proven to develop damage, by continuously and directly stressing the joint structures<sup>(13)</sup>.

When inflammation occurs, chondrocytes migrate to the lesion site in an attempt to regenerate the defect by forming groups of cells or *clusters* with the ability to synthesize ECM *de novo*. Since the cellular component (chondrocytes) of the articular cartilage is only 1-2 % of the whole tissue, they are unable to repair the damaged area, because their ability to synthesize ECM is surpassed by the matrix metalloprotease (MMP) activity which degrades the already damaged ECM aggravating the condition by increasing necrosis and activating local inflammation by releasing intracellular components which act as damage associated molecular patterns (DAMPs) and proinflammatory cytokines such as prostaglandins (PGs), nitrous oxide (NO), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumoral necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and substance P. Particularly, TNF $\alpha$  inhibits IGF-1 expression by increasing ECM catabolism, and blocking AKT pathway via activating JNK pathway. If the cartilage defect reaches subchondral bone, the cartilage repairs forming a low-quality articular cartilage called fibrocartilage<sup>(2,4,7)</sup>.

Factors that contribute to the inflammation cascade other than cytokines, include extracellular vesicles, which play an important role on promoting joint inflammation and are also involved on apoptosis and ECM degradation. These vesicles are exosomes, microvesicles and apoptotic vesicles, which are all released to the articular cavity (into the synovial fluid), and have intimate relation with cell-cell communication during the inflammatory process<sup>(7,8,14)</sup>. The aim of this study was to compare IGF-1 concentration in synovial fluid from sound (control) horses and horses with different degrees of lameness and joint pathology (OA) in the MCPJ. We hypothesized that the more severe and chronic conditions of the joint, the highest IGF-1 levels in synovial fluid would be found, because of the joint's high demand for repairing the defect was higher than in horses with mild changes. The rationale behind our hypothesis was: to our knowledge, there is still no data available regarding IGF-1 concentrations and its correlation with a particular clinical condition in horses, so we conducted a pilot study, where a total of 13 synovial fluid samples were collected from different joints of different horses. All of these horses were high performance show jumpers



with a positive flexion test from the sampled joints (no radiographic evaluation was conducted on any of these horses). What we found was a significant increase of total protein, with a positive correlation (Pearson's correlation,  $P=0.0229$ ) on IGF-1 levels in synovial fluid when compared to control samples (synovial fluid obtained from sound horses). This gave us sufficient information to hypothesize that horses with more severe clinical signs and more chronic joint pathology would have higher IGF-1 levels when compared to control horses.

Interestingly, with the results obtained, this hypothesis was refuted. We encountered that the horses with more severe radiographic changes and thus, the more chronic inflammatory conditions within the joint, were the ones that demonstrated a decrease on IGF-1 concentrations, very similar to what control horses had.

Similar results were seen on studies in which experimentally induced lesions on articular cartilage in horses, make an acute peak of mRNA expression of *igf-1*, and at 4 weeks tend to decrease. When IGF-1 decreases, TGF- $\beta$  predominates and it is responsible of new bone formation and activation of quiescent lymphocytes to Th17<sup>(7)</sup>.

Equine Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) has been widely studied, there are several studies where its importance in cell proliferation, growth and survival, repair and extracellular matrix production is well documented, although there are not enough studies regarding the different isoforms and their functionality<sup>(15)</sup>. It is known that the mRNA undergoes post-transcriptional modifications (alternate splicing) which generates different isoforms along with post-translation modifications. IGF-1 propeptides are encoded by multiple alternately spliced transcripts including C-terminal extension peptides called E-peptides, and N-terminal signal peptides. When an immature protein has signal peptide, mature peptide and E peptide is called pre-proIGF-1, and when the signal peptide is eliminated leaving only the mature peptide and the E peptide, is called pro-IGF-1. These E-peptides control the bioavailability of mature IGF-1, by binding to the ECM due to their highly positive charge, preventing its systemic circulation and therefore, its local use. They also modulate mature IGF-1 re-entry to the cell in a murine muscle cell-line<sup>(1)</sup>.

In humans, three different IGF-1 isoforms have been identified (IGF-1Ea, IGF-1Eb and IGF-1Ec, also known as mechano-growth factor or MGF), and have been proposed to have various functions in muscle repair<sup>(16)</sup>.

Nixon, *et al*<sup>(17)</sup> described the *igf1* gene consisting of 5 exons with 4 intron sequences, which undergo both post-transcriptional and post-translational modifications, where the translated proteins resulting from alternate splicing of exon 4 form a smaller propeptide (105 aminoacids) transcript named Pre-proIGF-1A consisting of signal peptide (encoded by exons 1 and 2), mature peptide (encoded by exons 2 and 3), and a C-terminal E-peptide encoded by

exons 3 and 5); and when exon 4 is not alternately spliced, a larger transcript is translated forming Pre-proIGF1B (111 aminoacids)<sup>(17)</sup>. To our knowledge, this was the last research paper published regarding post-transcriptional and post-traslational modifications and alternate splicing of IGF-1 mRNA in horses. We conducted a bioinformatic analysis of *igfl* gene undergoing different types of alternate splicing, which according to Le, *et al*<sup>(18)</sup> are: exon skipping, intron retention, mutually exclusive exons and alternative 5' donor or 3' acceptor sites. This analysis revealed that IGF-1 mRNA consisted of not 5, but 4 exons and 3 introns, which transcripts form 4 isoforms: variant 1 (exons 1-3), variant 2 (exons 2 and 3), variant 3 (exons 1-3, a 93 pb intron retention, and exon 4) and variant 4 (exons 2-4)<sup>(18)</sup>.

The Western blot analysis demonstrated the presence of at least two different functional isoforms of IGF-1, where the one seen in all normal horses is heavier (~12 kDa) than the one seen in all horses with different degrees of OA (7.5 kDa). Probably the lighter one is the mature form of IGF-1, although aminoacid sequencing techniques must be carried out in order to confirm this statement. With this result, we presume that the expression of these two different functional isoforms depends on inflammation.

This could lead to a new line of research which can focus on determine by advanced sequencing techniques the exact isoforms of IGF-1 and to target overexpression of the isoform which is not present when there is an inflammatory process of the joint, and its role on repairing cartilage defects.

Articular cartilage does not regenerate by itself, since is the only connective tissue in mammals that does not have either blood and lymphatic vessels, or nerves<sup>(19)</sup>. Therefore, it is virtually impossible to regenerate after an injury, so it is repaired via substitution with fibrous tissue, which generates a low quality fibrous cartilage called fibrocartilage. There have been several treatments to improve cartilage regeneration, in humans, osteochondral allograft transplantation has proven to be effective in function improvement and overall repair with graft survivorship of up to 80 % of the patients who had undergone previous surgical treatment: Microfracture, cartilage debridement, forage, abrasion chondroplasty, osteochondral and periosteal grafts, cartilage flap reattachment, among others<sup>(7,17,20)</sup>.

Local anesthetics and steroids have been used widely by practitioners in the field, for diagnostic and therapeutic reasons respectively. However, excessive use of these components, have been proven to damage articular cartilage. Intraarticular injection using local anesthetics and steroids have make a growing concern about inducing potential toxicity to chondrocytes and synoviocytes. Sherman *et al*<sup>(21)</sup>, conducted an interesting comparisson of lidocaine, bupivacaine, betamethasone acetate, methylprednisolone acetate, and triamcinolone acetoneide in a canine model. They found that *in vitro*, 1 and 0.5 % lidocaine, 0.2 and 0.25 % bupivacaine, betamethasone acetate and methylprednisolone acetate were severely chondrotoxic and synoviotoxic when compared with 0.625 % bupivacaine and triamcinolone<sup>(21)</sup>.

## Conclusions and implications

For this reason, treatmentwise, the main goal is to have alternatives that could be used in the field by clinicians, that can provide an alternative other than steroids that can also enhance cartilage repair without the need of getting the horse under general anesthesia and still have an effect that lead to horses having a long lasting sport career. This paper provides important information that can serve as a base for further research regarding IGF-1 isoforms and their role in cartilage repair.

### Acknowledgements

The authors would like to thank all CEAR, SEDENA personnel, QFB Alberto Enrique Fernández Molina and MVZ Jorge Rodríguez Lezama. Fernando García Lacy is a doctoral student at Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México and received a scholarship from CONACYT. The work reported in this manuscript is part of his doctoral dissertation.

### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Cited literature :

1. Pfeffer LA, Brisson BK, Hanquin L, Barton ER. The Insulin-like Growth Factor (IGF-1) E-peptides modulate cell entry to mature IGF-1 protein. *Mol Biol Cel* 2009;20:3810-3817.
2. Choukair D, Hügel U, Sander A, Uhlmann L, Tönshoff B. Inhibition of IGF-1-related intracellular signaling pathways by proinflammatory cytokines in growth plate chondrocytes. *Ped Res* 2014;76(3):245-251.
3. Liu Q, Guan JZ, Sun Y, Le Z, Zhang P, Yu D, *et al.* Insulin-like growth factor 1 receptor-mediated cell survival in hypoxia depends on the promotion of autophagy via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep* 2017;15:2136-2142.
4. Tonkin J, Temmerman L, Sampson RD, Gallego-Colon E, Barberi L, Bilbao D, *et al.* Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 orchestrates murine skeletal muscle regeneration

- and modulates autocrine polarization. *Am Soc Gene Cell Ther* 2015;23(7):1189-1200.
5. García-Segura LM, Arévalo MA, Azcoitia I. Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signaling in the nervous system: New advances. *Prog Brain Res* 2010;181:251-272.
  - 6- García-Lacy F, Gutiérrez-Olvera L, Bernad M, Fortier L, Trigo-Tavera FJ, Gómez-Chavarín M, *et al.* Pharmacokinetic analysis of intraarticular injection of insulin and its effect on IGF-1 expression in synovial fluid of healthy horses. *Rev Mex Cienc Pecu* 2022;13(2):391-407.
  7. Fortier LA, Balkman CE, Sandell LJ, Ratcliffe A, Nixon A. Insulin-like growth factor-1 gene expression patterns during spontaneous repair of acute articular cartilage injury. *J Orth Res* 2001;19:720-728.
  8. Frisbie D. Future directions in treatment of joint disease in horses. *Vet Clin Equine* 2005;21:713-724.
  9. Aguilar IN, Trippel SB, Shuiliang S, Bonassar LJ. Comparison of efficacy of endogenous and exogenous IGF-I in stimulating matrix production and mature chondrocytes. *Cartilage* 2015;6(4):264-272.
  10. Moyer W, Schumacher J, Schumacher J. A guide to equine joint injection and regional anesthesia. Yardley, PA: Veterinary Learning Systems, USA. 2007.
  11. Verwilghen D, Busoni V, Gangl M, Franck T, Lejeune JP, Vanderheyden L, *et al.* Relationship between biochemical markers and radiographic scores in the evaluation of the osteoarticular status of Warmblood stallions. *Res Vet Sci* 2009;87(2):319-328.
  12. Chu CR, Beynon BD, Buckwalter JA, Garrett WE Jr, Katz JN, Rodeo SA. Closing the gap between bench and bedside research for early arthritis therapies (EARTH): report from the AOOSSM/NIH U-13 Post-joint injury osteoarthritis conference II. *Am J Sports Med* 2011;39(7):1569-1578.
  13. Bonnevie ED, Delco ML, Fortier LA, Alexander PG, Tuan RS, Bonassar LJ. Characterization of tissue response to impact loads delivered using a hand-held instrument for studying articular cartilage injury. *Cartilage* 2015;6(4):226-232.
  14. Buzas EI, Gyrgöry B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(6):3563-3564.
  15. [www.uniprot.com](http://www.uniprot.com) Database.
  16. Phillipou A, Papageorgiou E, Bogdanis G, Halapas A, Sourla A, Maridaki M, *et al.* Expression of IGF-1 isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: Characterization of the MGF E peptide actions *in vitro*. *In vivo* 2009;23:567-576.

17. Nixon AJ, Brower-Toland BD, Sandell LJ. Primary nucleotide structure of predominant and alternate splice forms of equine insulin-like growth factor I and their gene expression patterns in tissues. *AJVR* 1999;60(10):1234-1241.
18. Le, KQ, Prabhakar B, Hong, WJ. *et al.* Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 2015;36:1212–1218.
19. Geneser F. Tejido esquelético. Cap 12, Geneser F. *Histología*. 3rd ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2001.
20. Briggs DT, Sadr KN, Pulido PA, Bugbee WD. The use of osteochondral allograft transplantation for primary treatment of cartilage lesions in the knee. *Cartilage* 2015;6(4):203-207.
21. Sherman SL, Khazai RS, James CH, Stoker AM, Flood DL, Cook JL. *In vitro* toxicity of local anesthetics and corticosteroids on chondrocyte and synoviocyte viability and metabolism. *Cartilage* 2015;6(4):233-240.



## Pharmacokinetic analysis of intraarticular injection of insulin and its effect on IGF-1 expression in synovial fluid of healthy horses



Fernando García-Lacy <sup>a\*</sup>

Lilia Gutiérrez-Olvera <sup>b</sup>

María Bernad <sup>c</sup>

Lisa Fortier <sup>d</sup>

Francisco Trigo-Tavera <sup>e</sup>

Margarita Gómez-Chavarín <sup>f</sup>

Alejandro Rodríguez-Monterde <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Ciudad de México, México.

<sup>b</sup> UNAM. FMVZ, Departamento de Fisiología y Farmacología, Ciudad de México, México.

<sup>c</sup> UNAM. Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Ciudad de México, México.

<sup>d</sup> Cornell University. Ithaca, USA.

<sup>e</sup> UNAM. FMVZ, Departamento de Patología, Ciudad de México, México.

<sup>f</sup> UNAM. Depto. Fisiología, Facultad de Medicina, Ciudad de México, México.

<sup>g</sup> UNAM. FMVZ, Secretario de Medicina, Ciudad de México, México.

\*Corresponding author: [f\\_garcialacy@hotmail.com](mailto:f_garcialacy@hotmail.com)

### Abstract:

Insulin induces mitosis on equine chondrocytes *in vitro* and enhances production of type II collagen. Insulin, when administered intra-articularly, changes the composition of synovial fluid, including the concentrations of glucose, insulin and glycemia levels. The

concentration of insulin in the joint was measured by using high-performance liquid chromatography (HPLC), which provided pharmacokinetic values. Six mixed breed horses were administered three different doses of insulin into one antebrachio-carpal joint (10, 15 and 20 IU) and isotonic saline was administered into the contralateral joint. The blood glucose concentration significantly changed through time for all three doses ( $P < 0.0001$ ). No significant differences in protein concentration and cell count in synovial fluid were found between treated and control joints ( $P > 0.05$ ), no significant difference in synovial glucose concentrations was found between treated and control joints ( $P > 0.05$ ). Values obtained by HPLC analyzed with PkAnalyst program revealed that the pharmacokinetic values were dose dependent, there was no significant difference in concentration of blood glucose between the three different doses ( $P > 0.05$ ). ELISA for IGF-1 (insulin-like growth factor 1) revealed a significant difference between treated and control joints ( $P < 0.001$ ). Insulin used in this study proved to be innocuous to the equine joint, no more than 20 IU for a 350-400 kg horse should be administered.

**Key words:** Insulin, Intraarticular, Horse, IGF-1, HPLC.

Received: 15/02/2021

Accepted: 11/08/2021

## Introduction

Different therapeutic options have been used to treat horses for synovitis. The aims of intra-articular (IA) treatment to ameliorate signs of osteoarthritis are to decrease the inflammatory mediators and biochemical processes of inflammation, relieve pain, avoid destruction of the joint, and normalize function of the joint to allow the horse to resume its normal activities. Corticosteroids, polysulphated glycosaminoglycans, antibiotics, hyaluronic acid, DMSO (dimethylsulfoxide), and parasympatholytic drugs, such as atropine, have been used intra-articularly by clinicians for the purpose of reducing joint pain and inflammation. Intra-articular administration of corticosteroids has fallen into abuse because, when administered intra-articularly, corticosteroids offer a prompt analgesia and remarkable improvement in the performance of the horse. A corticosteroid can be detected in the joint fluid or synovium for at least 21 d after injection, and so, this treatment, if unaccompanied by an appropriate period of rest and physiotherapy, can result in damage to articular cartilage, fibrosis, and dystrophic calcification of soft tissues of the joint, particularly the synovium. Synoviocytes become replaced by fibrous tissue, resulting in impairment of production of the normal elements comprising synovial fluid, resulting in suboptimal functioning of the joint<sup>(1-3)</sup>.

There is *in vitro* evidence that insulin, in concentrations up to 50 ng/mL, in cell cultures (75 cm<sup>2</sup> monolayers) induces mitosis of chondrocytes and production of type II collagen<sup>(4)</sup>.

The doses of insulin instilled intraarticularly in this study were adapted from the surface of the cell culture plate to be applied *in vivo*. In addition, the total surface area of the articular cartilage of the antebrachiocarpal joint of a recently euthanized adult Warmblood gelding was measured to help determine the dose of insulin to be injected in this particular joint (92.642 cm<sup>2</sup>), by using Rhinoceros 4.0® software (Data not shown). Significant changes in synovial fluid composition of all measurable components or in serum glucose concentrations were determined. As far as it is known, pharmacokinetic studies of insulin instilled into the joints of human beings or animals have not been conducted. There is *in vivo* evidence that intra-articular IGF-1 and 2 increase mitosis of chondrocytes and production of type II collagen by chondrocytes<sup>(5)</sup>.

Anecdotally, 20 to 40 IU of insulin has been instilled into joints of 500 kg horses with osteoarthritis without evidence of adverse effects. Whether or not these doses are effective in stimulating mitosis of chondrocytes and production of type II collagen *in vitro* is not known.

There are no commercial, purified products of IGF-1 that can be instilled intraarticularly to treat horses for osteochondral defects. Though recombinant IGF-1, it is available only for *in vitro* use.

## Material and methods

Six mixed-breed horses (3 mares, 2 geldings and 1 stallion) with a mean age of 5.08 yr old, and a mean weight of 361.11 kg, were used in this study. All were in a moderate to good body condition<sup>(6)</sup>. The horses were divided randomly into Groups 1, 2, and 3, each group being composed of two horses.

Each horse was confined to an individual stall (4x4m) during the study, all were fed 7-8 kg of oat hay three times daily, and water was provided *ad libitum*. Lameness and radiographic (MinXray® HFX 90V, Illinois, USA) evaluations of the carpal region were performed for every horse. Each horse was evaluated for clinical signs of equine metabolic syndrome (EMS), such as obesity (body condition  $\geq 7/9$ ), abnormal fat deposits (cresty neck), preputial or mammary gland inflammation, and signs of laminitis, such as diverging growth rings on the hoof capsules.

To ensure that no horse suffered from insulin resistance, each horse underwent an oral sugar test<sup>(7)</sup>. To perform this test, horses were fasted for 12 h, after which the basal blood



glucose concentration was measured. Corn syrup (Karo® made for ACH Foods Mexico, S. De R. L. De C. V.) was then administered orally, using a 60 ml syringe, at a dose of 15 ml/100 kg (150 mg/kg). Blood glucose concentration was measured at 60, 75, and 90 min after oral administration of the corn syrup.

In order to determine the insulin concentration that is sufficient to induce mitosis in articular cartilage chondrocytes, we considered the area of cell culture plates (75 cm<sup>2</sup>) in which mitosis has been observed and then, extrapolated it to the whole joint surface<sup>(4)</sup>. This was determined by measuring the surface area of the cartilage of the antebrachio-carpal joint of a recently euthanized adult Warmblood gelding using Rhinoceros 7.0 software.

In this study, doses of 10, 15, and 20 IU of recombinant insulin [Humalog Lispro® (100 UI/ml), Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA] were instilled into the antebrachio-carpal joint. These three doses were calculated by considering the systemic dose of insulin used to treat horses for hypoglycemia, and the concentration needed to achieve mitosis in cell culture plates; also considering the normal synovial fluid volume of the antebrachio-carpal joint<sup>(8)</sup>. Sterile 0.9 % saline solution was added to the insulin to increase the volume injected to 1 ml.

The left antebrachio-carpal joint of each horse was treated with insulin, and at the same time, the right antebrachio-carpal joint was injected with 0.9 % saline solution as control. The volume injected in the control joint was identical to that injected into the treated joint (i.e., 1 ml). Synoviocentesis was performed aseptically using a dorsal approach as previously described<sup>(9)</sup>. All horses were walked in hand for 10 min twice daily, the day of injection and for the entire duration of the study.

The concentration of glucose in blood, obtained from the jugular vein with a 25-ga needle, was measured by using a portable glucometer (Accu-chek Performa®, Roche Laboratories, USA). Blood was collected at 10 and 30 min and then hourly until 8 h, and then, every 6 h until 74 h post intra-articular injection of the insulin and isotonic saline solution. The concentration of glucose in at least 1 mL of synovial fluid collected from the antebrachio-carpal joint at 2, 4, and 6 h post intra-articular injection of insulin was determined by using the same glucometer.

Synovial fluid was assessed for its color, appearance viscosity, protein concentration, quality of its mucin clot, and types of cells contained within it before intra-articular injection of insulin and isotonic saline solution and at 2, 4, and 6 h post injection. These samples were taken by using the naive pooled-data analysis<sup>(10)</sup>. Insulin concentration in the joint was determined by HPLC, on samples obtained at 30 min, 1, 2-, 4-, 6-, 8-, and 12-h post-injection. IGF-1 concentration in synovial fluid was determined by ELISA (Horse IGF-1 ELISA kit, #MBS017382, MyBio-Source®) on samples obtained at 2, 4, and 6 h post intra-articular injection of two different doses of insulin, 15 IU and 20 IU.

All samplings for the different evaluations made this a cross-over study of one factor (insulin) and three levels (dosages).

### **High-performance liquid chromatography (HPLC)**

Synovial fluid, at least 1 mL, obtained from the antebrachiocarpal joints at 30 min, 1, 2, 3, 4, and 6 h post intra-articular injection of insulin and saline solution or saline solution alone was examined using HPLC. Samples were stored in Eppendorf tubes and analyzed by following the HPLC technique previously described<sup>(11)</sup>. Using this technique, the samples were deproteinized with acetonitrile:propanol (1:1); the mobile phase was with water and acetonitrile (1:1) and 1% trifluoroacetic acid. A C18 (5 $\mu$ m 4.6 x 250 mm) column was used, providing a recovery of 98 % of the elution volume, with a variation coefficient of 5 %. The limit of detection of this analysis was 0.39  $\mu$ g/mL, and the limit of quantification was 0.39  $\mu$ g/mL. The elution time was 20 min.

The serum concentrations of insulin vs time relationships were analyzed using compartmental pharmacokinetics through the software from PKAnalyst (MicroMath. Scientific Software, Salt Lake City, Utah, USA, 1995). With the results from the PkAnalyst program, a chi square was made to establish if there was a significant difference between the following measurements: half-life ( $K_{AE\_half}$ ), time of maximum concentration ( $T_{Conc\_Max}$ ), and time of residence (*residence\_time*), for the three different dosages of insulin.

## **Results**

### **Clinical evaluations before injection of insulin**

None of the six horses used in this study had any clinical signs of equine metabolic syndrome (EMS) or insulin resistance, such as hoof deformities or abnormal adipose tissue deposits (Table 1).

**Table 1:** Physical characteristics of all horses. Hoof deformities, cresty neck and corporal condition were considered clinical signs of EMS.

	<b>Cresty neck scale<sup>1</sup></b>	<b>Corporal condition<sup>2</sup></b>	<b>Height (m)</b>	<b>Weight (kg)</b>	<b>Sex*</b>
		Group 1			
Horse 1	1/5	4/9	1.69	465	M
Horse 2	2/5	5/9	1.43	322.5	G
		Group 2			
Horse 3	2/5	6/9	1.43	323	G
Horse 4	2/5	6/9	1.46	351.2	M
		Group 3			
Horse 5	2/5	5/9	1.53	388.5	S
Horse 6	2/5	5/9	1.45	316.5	G
Average	1.83/5	5.1/9	1.49	361.11	

<sup>1</sup>Carter RA, *et al.* 2009, <sup>2</sup>Henneke DR, *et al.* 1983. S= Stallion; M= Mare; G= Gelding.

It was not observed signs of lameness in any horse during the evaluation, which was performed with the horses trotting in a straight line on a hard surface and in a circle on soft surface, no signs were observed off lameness after each carpus was flexed for 1 min.

No pathological abnormality was observed during radiographic evaluation of the carpi.

None of the six horses displayed any clinically evident reaction to intra-articular instillation of insulin or isotonic saline solution (Table 2).

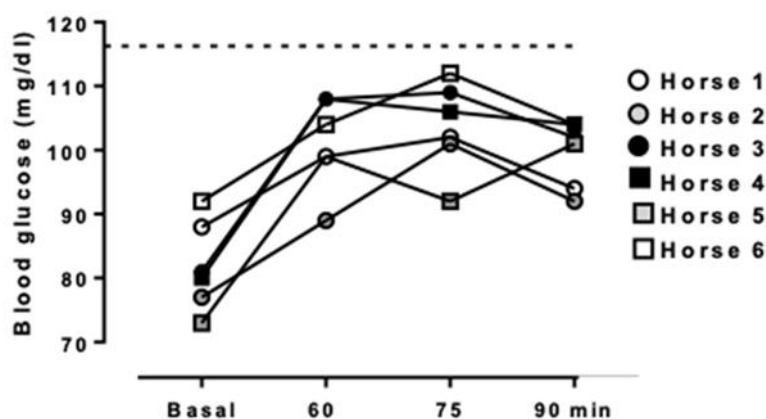
**Table 2:** Evaluation of circumference of the carpi of all 6 horses, 24-h post injection of insulin (cm)

<b>Horse</b>	<b>Basal joint perimeter</b>	<b>Joint perimeter</b>	<b>Basal joint perimeter</b>	<b>Joint perimeter</b>
	<b>Control</b>	<b>Control (24h)</b>	<b>Treated</b>	<b>Treated (24 h)</b>
1	34.5	34.5	34.5	34.5
2	28.0	28.0	28.0	28.0
3	28.5	28.5	28.5	28.5
4	28.5	28.5	28.5	28.5
5	30.0	30.0	30.0	30.0
6	28.0	28.0	28.0	28.0

The synovial fluid was evaluated for changes in color, appearance, cellularity, and protein concentration in both treated and control joints, with no visible changes between the different samples<sup>(12)</sup>.

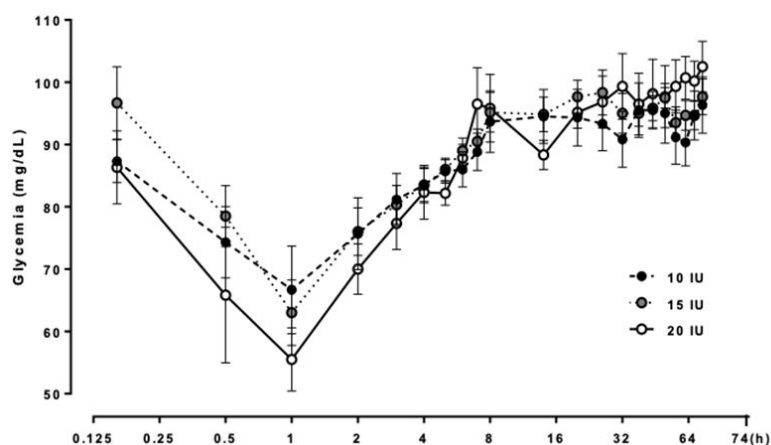
The oral sugar test revealed that none of the six horses had a concentration of glucose in the blood greater than 115 mg/dL (Figure 1). The concentration of glucose in the blood of all horses for all three doses, was significantly different ( $P<0.001$ ) from the pre-treatment concentration at 30 min and 1 h after intra-articular injection of insulin (Figure 2).

**Figure 1:** Oral sugar test results, showing glycemia concentration for all 6 horses



Blood samples were taken at 60, 75 and 90 minutes after oral administration of corn syrup.

**Figure 2:** Average concentration of blood glucose of all 6 horses after each horse was administered



A) 10 IU black circles; B) 15 IU gray circles; C) 20 IU white circles of insulin into the antebrachioacarpal joint.

A post hoc (Holm-Sidak, Tukey) test was used to determine if the difference was significant for all three doses in all blood samples taken from the 1-h sample, because the lowest blood concentration was seen at that sampling time in all three groups. The oral

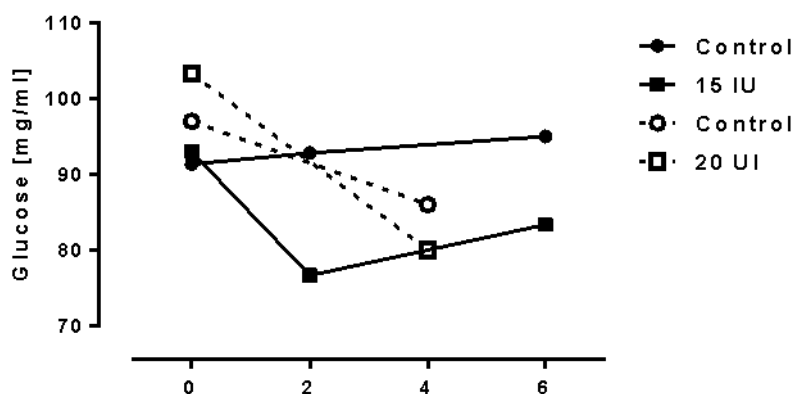
sugar test revealed that none of the six horses had a concentration of glucose in the blood greater than 115 mg/dL<sup>(7)</sup>.

There was no significant association between the changes seen in the concentration of blood glucose and the dose of insulin administered into the antebrachiocarpal joint, not when compared between all three different doses, 10 vs 15 vs 20 IU ( $P=0.372$ ) and nor when compared between different (paired) doses, 10 vs 15 IU ( $P=0.369$ ) and 15 vs 20 IU ( $P=0.318$ ).

### Synovial glucose

The concentration of glucose within the antebrachiocarpal joint dropped at 2 and 6 h' post-injection after 15 IU of insulin was administered into that joint, whereas the concentration of glucose within the antebrachiocarpal joint failed to drop at 2 and 6 h after isotonic saline solution was administered into that joint (Figure 3).

**Figure 3:** Concentration of glucose in the synovial fluid harvested from joints treated with 15 IU and 20 IU of insulin and joints treated with isotonic saline solution



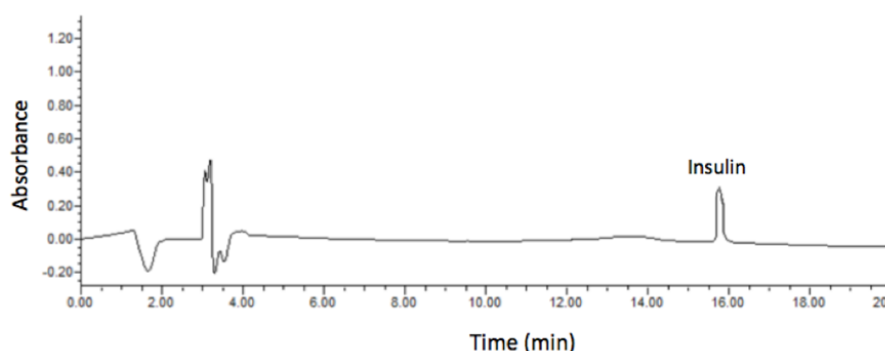
The concentration of glucose within the antebrachiocarpal joint dropped at 4 h' post-injection after 20 IU of insulin was administered into that joint, whereas the concentration of glucose within the antebrachiocarpal joint failed to drop at 4 hours after isotonic saline solution was administered into that joint (Figure 3).

The differences in concentration of glucose in the treated antebrachiocarpal joint did not differ significantly from that in the control antebrachiocarpal joint, however, when the dose of insulin injected into the treatment joint was 15 IU ( $P=0.5945$ ) or 20 IU ( $P=0.235$ ).

## High performance liquid chromatography (HPLC)

Insulin could not be detected in the synovial fluid in the treated joints at 8 and 12 h' post-injection. Insulin in synovial fluid obtained at 2 and 6 h post injection from the antebrachioacarpal joint of all six horses treated with 15 IU of insulin and insulin in synovial fluid obtained at 1 and 4 h post injection with 20 IU of insulin taken at 30 min, showed a detection peak at  $16 \pm 0.5$  min (Figure 4).

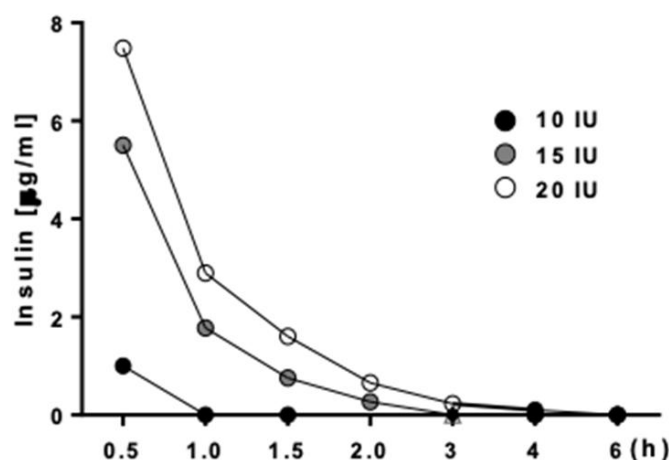
**Figure 4:** Chromatogram of an absorbance peak of insulin at 16 min in every sample where insulin was detected



To establish a proper elimination curve, the synovial fluid sampling was set to obtain for 3 doses of insulin (10, 15 and 20 IU) from 7 samples in a 6-hour period, with a timeline of 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, and 6 h.

Insulin concentration within the treated joint varied through time and was dose dependent (Figure 5).

**Figure 5:** Concentrations of insulin in the synovial fluid of all horses, determined by HPLC, after injecting 10, 15, or 20 IU of insulin into the antebrachioacarpal joint



## Pharmacokinetic analyses

The results obtained by HPLC were analyzed by using the program *Micromath PkAnalyst*®, using the program option for model: #5 one compartment, and first order kinetics.

This model provides the withdrawal, or absorption, constants, which in this case were the same, and the relationship between volume/dose found in the different sampling of concentration within the compartment (joint). It also provides the area under the curve (AUC) the half-life of elimination ( $T_{1/2\beta}$ ), the time of maximum concentration ( $T_{Conc\_Max}$ ), and the residence time (*Residence\_Time*).

The mean values of the pharmacokinetic variables of the synovial fluid concentrations of insulin from the three groups (10, 15, and 20 UI), were compared using a non-parametric Kruskal–Wallis analysis, through the software package JMP (JMP Statistic Mode Visual 1989–1995 SAS Institute). As the data showed a non-normal distribution, individual pharmacokinetic values were compared using Dunn tests, after a Kruskal–Wallis analysis. The 10 IU group could not be compared pharmacokinetically since only had a one point of concentration and immediately it was found below the quantifiable limits. The group was considered statistically different from the other two groups. The independent variable was time, and the dependent variable was insulin concentration. The values were volume, dose, and the withdrawal constant  $K_{AE}$ . The differences in these variables between the 15 and 20 IU doses were slight (Table 3).

**Table 3:** Calculated kinetic values for the 15 and 20 IU dose of insulin

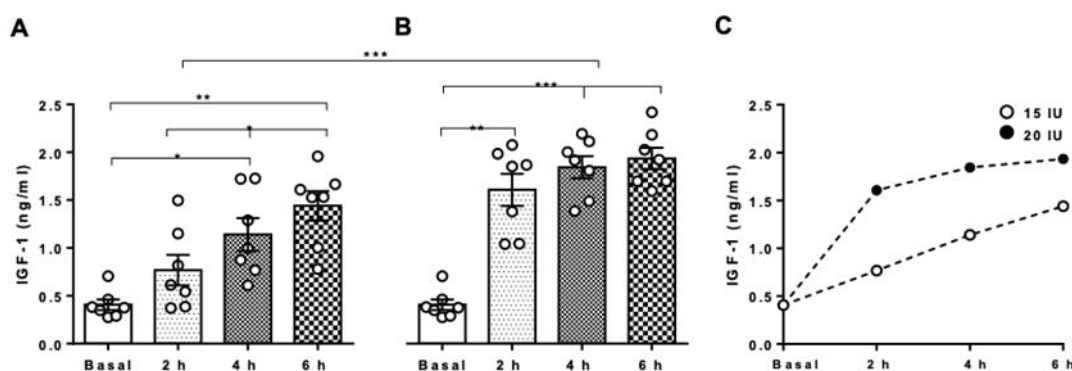
Variable	15 UI Insulin		20 UI Insulin	
	Result	Time (min)	Result	Time (min)
Withdrawal half-life ( $K_{AE\_half}$ )	0.199927931*	11.99	0.232681513*	13.8
Maximum concentration time ( $T_{Conc\_Max}$ )	0.288435035*	17.30	0.335688466*	19.8
Area under the curve (AUC)	5.15211030	NA**	7.37122310	NA**
Resident time	0.576870070*	34.61	0.671376931*	40.2

A chi square test revealed, however, that there was no significant difference between the half-life of withdrawal or absorption ( $K_{AE\_half}$ ), the time of maximum concentration ( $T_{Conc\_Max}$ ), and the residence time (*Residence\_Time*) for the 15 and 20 IU doses ( $P=0.9851$ ).

## Synovial fluid analyses for IGF-1 concentration

To determine if there was correlation between the synovial concentration of exogenous insulin and synovial concentration IGF-1, it was measured IGF-1 concentration at 2, 4, and 6 h post intra-articular injection of insulin. It was evaluated only the groups of horses treated with 15 and 20 IU of insulin and observed significant differences between the basal concentrations of IGF-1 at the different sampling times ( $P<0.001$ ); the 10 IU group was not considered for this analysis because the concentration parameters for this dose were too low to be measured by HPLC (Figure 6).

**Figure 6:** IGF-1 concentration in synovial fluid of horses treated intra-articularly with A) 15 IU and B) 20 IU of IGF-1 concentration in synovial fluid of horses treated intraarticularly. C) Positive correlation of the 2 distinct groups, between IGF-1 concentration and time of synovial fluid sampling



Filled circles represent horses treated intra-articularly with 20 IU and blank circles represent horses treated intra-articularly with 15 IU of insulin. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ .

## Discussion

### Previous clinical evaluation

A basic clinical evaluation suggested that none of the six horses displayed clinical signs of Equine Metabolic Syndrome (EMS) or Insulin Resistance (IR), each had a body condition score below that established to be a risk factor for these conditions, and none had a cresty neck scale greater than 2 (a score greater 3 being a risk factor for EMS)<sup>(6,7,13)</sup>. An oral sugar test provided objective evidence that none of the horses had EMS or IR. No horse used in this study had a concentration of glucose in the blood greater than 115 mg/dL, the maximum concentration of normality as previously described<sup>(7)</sup>.



Clinical examination and the oral sugar test were both necessary to eliminate a metabolic abnormality that could alter glucose metabolism and, therefore, alter the degree of glycemia, caused by injecting insulin into a joint. The concentration of glucose in the blood sugar may have been altered had the horse been insulin resistant. It was not conducted more specific examinations for EMS or IR, such as determining the concentration of cortisol and/or ACTH in the blood, the intravenous glucose tolerance test, and the glucose insulin response test, and nor it did tested for pituitary pars intermedia dysfunction (PPID), because the aim of this paper was to determine the pharmacokinetic values of insulin instilled into the horse's joint, its systemic and local effects, such as the analysis of variations of IGF-1 concentration on synovial fluid. The results obtained from the oral sugar test, along with the absence of clinical signs that could suggest risk factors to IR or EMS, were considered, by the authors, to be sufficient to include these horses in the study.

## **Lameness exam (clinical and radiographic)**

### **Post treatment clinical exam**

The circumference of the carpus at the level of the antebrachio-carpal joint did not differ between the control and treated carpi, though this measurement was made with a measuring tape scaled in centimeters rather than millimeters. Based on the failure to detect a difference in circumference of treated and control carpi and failure of the horse to become lame on the treated limb, it was concluded that insulin injected into the antebrachio-carpal joints caused no clinical signs of inflammation.

### **Synovial analyses (Physical/Chemical)**

Abnormal changes were seen in the synovial fluid obtained from treated and control joints, but the synovial fluid of the treated joints did not differ in color, appearance, protein concentration, and number of cells from that of the control joints. Changes seen in the treatment and control joints included a reddish discoloration, which was attributed to hemarthrosis caused by trauma to the synovium inflicted during arthrocentesis<sup>(12)</sup>.

The incidence of develop septic synovitis post intra-synovial injection is quite high (34.1 %), however, if a proper aseptic technique is used, this is low. In a retrospective study of 192 horses admitted for treatment for septic arthritis or tenosynovitis, 22 % of infections were caused by synovial injection. In another retrospective study of 13 horses treated for tarsocrural joint infection, infection of 9 occurred after arthrocentesis of that joint. Because the concentration of protein in each treated joint was < 25 g/L and because

only a small number of inflammatory cells (no bacteria) were observed during cytological examination of fluid harvested from the joint, it was concluded that instilling insulin to the joint causes no adverse reaction<sup>(14,15,16)</sup>.

In general, horses with septic arthritis have a cell count from 30-90 or  $100 \times 10^9/L$ , and a protein concentration of more than 25 g/L, even until 60 g/L. The protein values are associated with the pathologic condition that the joint goes by, it could be secondary to trauma or infection, where the values could be from 20-40 and >40 g/L respectively<sup>(17)</sup>. None of the samples obtained in this study were near to the ones that are referred, which is why there was no infection or adverse reaction to insulin injected intra-articularly.

### **Statistical analyses**

The amount of insulin instilled into the antebrachio-carpal joint significantly affected the concentration of blood glucose. For each of the three doses of insulin administered, the concentration of blood glucose was lowest at 1 h. It was found no association between the dose of insulin instilled into the joint and the concentration of glucose in the blood. The concentration of glucose in the synovial fluid did not differ significantly between treated and control joints when 15 or 20 IU of insulin was instilled into the treated joint. A power study to determine how many samples of joint fluid showed that at least 30 samples would have to be tested to produce more reliable results.

### **High performance liquid chromatography (HPLC)**

With an initial assay for the synovial fluid sampling by HPLC, it was not possible to analyze these results with the pkAnalyst program, because the elimination curve of the insulin instilled in the joint, could not be calculated, probably because the concentration of insulin was less than that, that could be detected by the equipment. Consequently, we had to modify the synovial fluid samplings to 30 min, 1 hour, 1.5, 2, 3, 4, and 6 h post intra-articular injection of all three doses of insulin for all horses.

The pharmacokinetics for the 15- and 20-IU doses were linear, but it was unable to establish a pharmacokinetic curve for the 10-IU dose, because the analytical technique was not sensitive enough to detect the concentration of insulin in the synovial fluid at 1 h. The curves for the 15- and 20-IU doses appeared similar, but was found slight differences in the pharmacokinetic values. For instance, for the 15-IU dose, the residence time of insulin, the maximum concentration time, and the area under the curve were slightly, but not significantly different from that of the 20-IU dose. For both doses (15 and 20-IU), the maximum concentration time was between 17-20 min, which correlates

with the drop-in concentration of glucose in the blood seen at 30 min post intra-articular injection.

Studies are needed to evaluate the direct effect of insulin on chondrocytes, because the blood glucose concentration in treated joints did not differ significantly from that in the control joints, suggesting that the insulin does bind to its receptor causing the concentration of glucose in the synovial fluid to drop. Studies are needed to determine when the synovial concentration of glucose returns to normal.

The time of action of the insulin in the joint or its pharmacokinetic effects could vary from the ones observed in this study, if a similar study was performed using a larger number of horses (e.g.,  $n > 30$ ), but this study provides data for comparison for future studies.

Based on the results of this study, it suggests that the horse should be observed for one hour after injecting insulin intra-articularly, to ensure that drop in concentration of blood glucose does not cause clinical signs of hypoglycemia.

The chromatograms obtained with HPLC were like the ones previously observed after instilling insulin to a joint, observed an insulin peak at 15.8 min<sup>(11)</sup>. In this study these peaks were observed at  $16 \pm 0.5$  min. Because the residence time, half-life time, and maximum concentration time were higher with the highest dose of insulin (20 IU), it suggests using this dose when treating a horse for osteoarthritis by instilling insulin intra-articularly, because at this dosage, the insulin's effect in the joint was more durable than were the lower doses.

Growth factors are a group of proteins, that play an important role in tissue repair by enhancing cellular proliferation, survival, division, growth, and differentiation. IGF-1 is the most important and powerful growth factor for cartilage repair<sup>(18)</sup>.

Insulin and IGF-1 have a very similar structure; they share a homologous sequence, they have a similar three-dimensional structure, and they have weakly overlapping biological activity<sup>(19)</sup>. IGF-1 folds into two thermodynamically stable disulfur isomers (via disulfur bond swipe), whereas insulin folds into one unique stable tertiary structure. This is due to post translation processing, that can achieve two different structures with the same aminoacidic sequence. The disulfur bond swipe of IGF-1 allows the protein to change its affinity for receptor bonding. It appears to be able to bond insulin and its own receptor<sup>(19)</sup>.

It hypothesizes that insulin can alter this affinity and in some cases bond to the IGF-1 receptor, activating its signaling pathway, since this growth factor has autocrine, paracrine and endocrine functions, it serves as its own positive feedback for activating MAPK/AKT signaling pathways. Instilling insulin into a joint, as a treatment for osteoarthritis of that joint, may be an option for horses suffering from osteoarthritis, because IGF-1 is not available commercially for use in joints of horses<sup>(18,20)</sup>.

## Conclusions and implications

It was unable to detect any adverse local or systemic reaction to insulin instilled intra-articularly. The residence time of the insulin within the antebrachio-carpal joint was relatively short and proportional to the dose. None of the three doses used in this study [i.e., a low dose (10 IU), a medium dose (15 IU), and a high dose (20 IU)], significantly altered the concentration of glucose in the synovial fluid and blood. Intra-articular administration of exogenous insulin enhanced IGF-1 expression in synovial fluid, and this expression seemed to be dose and time dependent. Studies are needed to clarify the mechanism by which this expression of IGF-1 is enhanced in the equine joint. As far as it is known, there are no studies of insulin used intra-articularly in human or veterinary medicine, therefore this is the first *in vivo* study. This is a descriptive study, and believe it to be the first *in vivo* study demonstrating that insulin can be injected safely into a joint. This study could be a base for other studies examining the efficacy of insulin in ameliorating the clinical signs of osteoarthritis in horses.

### Literature cited:

1. Celeste C, Ionescu M, Poole RA. Repeated intra-articular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid. *J Orthop Res* 2005;(23):602-610. doi: 10.1016/j.orthres.2004.10.003.
2. Gotoh S, Onaya J, Abe M, Miyazaki K, Hamai A, Horie K, Tokuyasu K. Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. *Ann Rheum Dis* 1993;(52):817-822. doi: 10.1136/ard.52.11.817.
3. Henson FMD, Davenport C, Butler L, Moran I, Shingleton WD, Jeffcott LB, Schofield PN. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Eq Vet J* 1997;(29):441-447. doi: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb03156.x.
4. Schumacher HR. Aspiration and injection therapies for joints. *Arthritis Rheumatol* 2003;(49):413-420. doi: 10.1002/art.11056.
5. Davenport C, Boston R, Richardson DW. Effects of insulin-like growth factor-II on the mitogenic and metabolic activities of equine articular cartilage with and without interleukin 1- $\beta$ . *Am Vet Res* 2004;(65):238-244. doi: 10.2460/ajvr.2004.65.238.
6. Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Eq Vet J* 1983;15,371-372. doi: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x

7. Frank N. Equine metabolic syndrome. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011;(27):73-92. doi: 10.1016/j.cveq.2010.12.004.
8. Smith JS, Ratzlaff MH, Grant BD, Frank FL. The synovial fluid volume of the radiocarpal, intercarpal and tibiotarsal joints of a horse. *J Eq Med Surg* 1979;(3):479-483.
9. Moyer W, Schumacher J. *A guide to equine joint and regional anesthesia*. 4<sup>th</sup> ed . USA: Academic Veterinary Solutions, LLC; 2007.
10. Mahmood I. Naive pooled-data approach for pharmacokinetic studies in pediatrics with a very small sample size. *Am J Ther* 2014;(21):269-74. doi:10.1097/MJT.0b013e31824ddee3.
11. Hafiz Mohd MJ, Affandi MMR, Ah K, Sepria L. A simple and sensitive method for the determination of insulin in rat plasma and its application in pharmacokinetic study. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013;(5):133-137.
12. Meyer DJ, Harvey JW. Evaluations of fluids: Effusions, synovial fluid, cerebrospinal fluid. In *Veterinary laboratory medicine interpretation and diagnosis*. 3rd ed. Saunders, USA. 2004;245-250.
13. Carter RA, Geor RJ, Burton SW, Cubbit TA, Harris PA. Apparent adiposity assessed by standardized scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Vet J* 2009;(179):204-210. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.02.029.
14. Bertone AL, Cohen JM. Infectious arthritis and fungal infections arthritis. In: Ross MW, Dyson SJ. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. 2nd ed. USA: Saunders; 2011;677-687.
15. Olds AM, Stewart AA, Freeman DE, Schaeffer DJ. Evaluation of the rate of development of septic arthritis after elective arthroscopy in horses: 7 cases. *J Am Vet Med Ass* 2006;(229):1949-1954. doi: 10.2460/javma.229.12.1949.
16. Adams SB. How to avoid complications following joint injections I: Site preparation and selection of needles. *AAEP Proc.* 2012;58.
17. Taylor FG, Hillyer MH. Enfermedades musculoesqueléticas. In: Taylor FG, Hillyer MH. *Técnicas diagnósticas en medicina equina*. Aribia, España. 1997;245-284.
18. Fortier LA, Strauss EJ, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2011;(469):2706-2715. doi: 10.1007/s11999-011-1857-3.
19. Yun CH, Tang YH, Feng YM, An XM, Chang WR, Liang DC. 1.42 Å crystal structure of mini-IGF-1(2): an analysis of the disulfide isomerization property and receptor binding property of IGF-1 based on the three-dimensional structure. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;(326):52-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.203

20. National Center for Biotechnology information database. 2020.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> .



# Differential Infection Patterns and Recent Evolutionary Origins of Equine Hepaciviruses in Donkeys

Stephanie Walter,<sup>a</sup> Andrea Rasche,<sup>b,c</sup> Andrés Moreira-Soto,<sup>b</sup> Stephanie Pfaender,<sup>a</sup> Magda Bletsa,<sup>d</sup> Victor Max Corman,<sup>b,c</sup> Alvaro Aguilar-Setien,<sup>e</sup> Fernando García-Lacy,<sup>f</sup> Aymeric Hans,<sup>g</sup> Daniel Todt,<sup>a</sup> Gerhard Schuler,<sup>h</sup> Anat Shnaiderman-Torban,<sup>i</sup> Amir Steinman,<sup>j</sup> Cristina Roncoroni,<sup>j</sup> Vincenzo Veneziano,<sup>k</sup> Nikolina Rusenova,<sup>l</sup> Nikolay Sandev,<sup>l</sup> Anton Rusenov,<sup>m</sup> Dimitrinka Zapryanova,<sup>n</sup> Ignacio García-Bocanegra,<sup>o</sup> Joerg Jores,<sup>p,q</sup> Augusto Carluccio,<sup>r</sup> Maria Cristina Veronesi,<sup>s</sup> Jessika M. V. Cavalleri,<sup>t</sup> Christian Drosten,<sup>b,c</sup> Philippe Lemey,<sup>d</sup> Eike Steinmann,<sup>a</sup> Jan Felix Drexler<sup>b,c</sup>

Institute of Experimental Virology, TWINCORE, Center for Experimental and Clinical Infection Research Hannover, Hannover, Germany<sup>a</sup>; Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn, Germany<sup>b</sup>; German Centre for Infection Research (DZIF), Bonn-Cologne, Germany<sup>c</sup>; Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute, KU Leuven–University of Leuven, Leuven, Belgium<sup>d</sup>; Medical Immunology Research Unit, National Medical Center Siglo XXL, Mexican Social Security Institute (IMSS), Mexico City, Mexico<sup>e</sup>; Equine Medicine and Surgery Department FMVZ-UNAM, Mexico City, Mexico<sup>f</sup>; ANSES, Laboratory for Equine Diseases, Goustranville, France<sup>g</sup>; Clinic for Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals, Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen, Germany<sup>h</sup>; Koret School of Veterinary Medicine, Rehovot, Israel<sup>i</sup>; Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Rome, Italy<sup>j</sup>; Department of Veterinary Medicine and Animal Productions, University of Naples Federico II, Naples, Italy<sup>k</sup>; Trakia University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Stara Zagora, Bulgaria<sup>l</sup>; Trakia University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Diseases, Stara Zagora, Bulgaria<sup>m</sup>; Trakia University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology, Veterinary Physiology, and Physiological Chemistry, Stara Zagora, Bulgaria<sup>n</sup>; Department of Animal Health, University of Córdoba, Córdoba, Spain<sup>o</sup>; International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya<sup>p</sup>; Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, Bern, Switzerland<sup>q</sup>; Faculty of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italy<sup>r</sup>; Department of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy<sup>s</sup>; Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany<sup>t</sup>

**ABSTRACT** The hepatitis C virus (HCV) is a major human pathogen. Genetically related viruses in animals suggest a zoonotic origin of HCV. The closest relative of HCV is found in horses (termed equine hepacivirus [EqHV]). However, low EqHV genetic diversity implies relatively recent acquisition of EqHV by horses, making a derivation of HCV from EqHV unlikely. To unravel the EqHV evolutionary history within equid sister species, we analyzed 829 donkeys and 53 mules sampled in nine European, Asian, African, and American countries by molecular and serologic tools for EqHV infection. Antibodies were found in 278 animals (31.5%), and viral RNA was found in 3 animals (0.3%), all of which were simultaneously seropositive. A low RNA prevalence in spite of high seroprevalence suggests a predominance of acute infection, a possible difference from the mostly chronic hepacivirus infection pattern seen in horses and humans. Limitation of transmission due to short courses of infection may explain the existence of entirely seronegative groups of animals. Donkey and horse EqHV strains were paraphyletic and 97.5 to 98.2% identical in their translated polyprotein sequences, making virus/host cospeciation unlikely. Evolutionary reconstructions supported host switches of EqHV between horses and donkeys without the involvement of adaptive evolution. Global admixture of donkey and horse hepaciviruses was compatible with anthropogenic alterations of EqHV ecology. In summary, our findings do not support EqHV as the origin of the significantly more diversified HCV. Identification of a host system with predominantly

Received 26 August 2016 Accepted 13 October 2016

Accepted manuscript posted online 19 October 2016

**Citation** Walter S, Rasche A, Moreira-Soto A, Pfaender S, Bletsa M, Corman VM, Aguilar-Setien A, García-Lacy F, Hans A, Todt D, Schuler G, Shnaiderman-Torban A, Steinman A, Roncoroni C, Veneziano V, Rusenova N, Sandev N, Rusenov A, Zapryanova D, García-Bocanegra I, Jores J, Carluccio A, Veronesi MC, Cavalleri JM, Drosten C, Lemey P, Steinmann E, Drexler JF. 2017. Differential infection patterns and recent evolutionary origins of equine hepaciviruses in donkeys. *J Virol* 91:e01711-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01711-16>.

**Editor** J.-H. James Ou, University of Southern California

**Copyright** © 2016 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Eike Steinmann, [Eike.Steinmann@twincore.de](mailto:Eike.Steinmann@twincore.de), or Jan Felix Drexler, [drexler@virology-bonn.de](mailto:drexler@virology-bonn.de).

S.W. and A.R. contributed equally to this article.

acute hepatitis C virus infection may enable new insights into the chronic infection pattern associated with HCV.

**IMPORTANCE** The evolutionary origins of the human hepatitis C virus (HCV) are unclear. The closest animal-associated relative of HCV occurs in horses (equine hepatitis C virus [EqHV]). The low EqHV genetic diversity implies a relatively recent acquisition of EqHV by horses, limiting the time span for potential horse-to-human infections in the past. Horses are genetically related to donkeys, and EqHV may have cospeciated with these host species. Here, we investigated a large panel of donkeys from various countries using serologic and molecular tools. We found EqHV to be globally widespread in donkeys and identify potential differences in EqHV infection patterns, with donkeys potentially showing enhanced EqHV clearance compared to horses. We provide strong evidence against EqHV cospeciation and for its capability to switch hosts among equines. Differential hepatitis C virus infection patterns in horses and donkeys may enable new insights into the chronic infection pattern associated with HCV.

**KEYWORDS** equine hepatitis C virus, hepatitis C virus, donkey, evolution, pathogenesis

Hepatitis C virus (HCV) is a major human pathogen infecting approximately 140 million people worldwide (1). HCV belongs to the genus *Hepacivirus* that comprises seven geographically distinct genotypes which likely evolved over considerable time spans (2–6). The evolutionary origins of HCV have remained obscure (6). Recent studies identified numerous hepatitis C viruses (HCVs) in bats, rodents, monkeys, and peridomestic animals (7, 8). Considering the absence of HCV-related viruses in higher primates (9), as well as the existence of genetically diversified nonprimate HCVs, mammals other than primates may have shaped primordial HCV evolution (10). The lack of cosegregation of HCVs with mutually related animal hosts, as well as the detection of potential recombination events between some HCV lineages, suggest low barriers against cross-host transmission (10–13). However, whether any of the animal species known to carry HCVs represents a direct reservoir for HCV is unclear (14).

The equine HCV (EqHV; originally described as canine HCV and subsequently as nonprimate HCV) (7, 8), constitutes the closest animal-associated relative of HCV among the HCVs known so far (7, 13). Sporadic infections of dogs (15–17) support a broad host range of EqHV that may have enabled infection of humans with EqHV in the past. Transmission may have been aided by close contact of humans and horses since the domestication of horses about 5,500 years ago (18). However, the strikingly low genetic variation of EqHV in horses suggests a rather short evolutionary history (6), with limited opportunity for horse-human transition.

The genus *Equus* comprising all contemporary horses, donkeys, and zebras likely originated about 4.5 million years ago (19). Detection of EqHV homologues in equine sister species may aid elucidating the evolutionary history of this HCV. The globally most widespread equine beyond domestic horses (*Equus ferus caballus*, ca. 59 million heads) is the domesticated donkey (*E. asinus asinus*, ca. 44 million heads, according to the Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], FAOSTAT 2014 database). Donkeys have been tested for HCV in limited numbers, such as 116 donkeys from the United Kingdom (17, 20), 30 mules and 5 donkeys from Brazil (21), and 8 mules and 6 donkeys from China (22), as well as a commercially available donkey serum from the United States (23), all with negative results. Here we investigated a considerably larger panel of donkey sera from various countries using serologic and molecular tools. We found EqHV to be globally widespread in donkeys and able to switch hosts among equines.

## RESULTS

**Wide-reaching exposure of donkeys to EqHV.** Donkey sera ( $n = 829$ ) were collected in five European countries (Germany, Spain, Italy, Bulgaria, and France), as well as in Asia (Israel), Africa (Kenya), and Latin America (Costa Rica and Mexico),



**TABLE 1** Sample characteristics

Country	Sampling period (yr)	n	Ab+ (%)	No. of animals/total no. of animals (%)									
				Gender		Age in yrs					Unknown		
				Jack	Jenny	0-5	6-10	11-15	16-20	21-30	Unknown		
France	1974/1979	2	1 (50.0)	0/10 (0)	6/46 (13.0)	1/2 (50.0)	4/14 (28.6)	0/5 (0)	0/4 (0)	0/2 (0)	1/2 (50.0)		
Germany	2007/2008/2015	56	6 (10.7)	3/38 (7.9)	4/44 (9.1)	0/4 (0)	3/27 (11.1)	1/11 (9.1)	0/10 (0)	0/2 (0)	2/23 (8.7)		
Spain	2011	86	7 (8.1)	14/52 (26.9)	125/286 (43.7)	1/12 (8.3)	48/108 (44.4)	21/48 (43.8)	20/38 (52.6)	1/2 (50.0)	0/4 (0)		
Italy	2004-2015	350	140 (40.0)	69/113 (61.1)	45/88 (51.1)	0/12 (0)	23/36 (63.9)	33/58 (56.9)	23/46 (50.0)	9/16 (56.3)	3/10 (30.0)		
Bulgaria	2015	201	114 (56.7)	0/29 (0)	0/15 (0)	0/11 (0)	0/9 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	29/39 (74.4)	0/26 (0)		
Israel	2014	44	0 (0)	0/17 (0)	0/6 (0)	0/11 (0)	4/33 (12.1)	2/17 (11.8)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/34 (0)		
Kenya	2015	34	0 (0)	4/53 (7.5)	6/41 (14.6)	0/8 (0)	0/6 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/34 (0)		
Mexico	2016	94	10 (10.6)	0/9 (0)	0/6 (0)	0/8 (0)	82/233 (35.2)	57/142 (40.1)	43/102 (42.2)	39/60 (65.0)	6/99 (6.1)		
Costa Rica	2016	15	0 (0)	90/321 (28.0)	186/532 (35.0)	2/29 (6.9)	51/246 (20.7)	82/233 (35.2)	43/102 (42.2)	39/60 (65.0)	6/99 (6.1)		
Total		882	278 (31.5)	90/321 (28.0)	186/532 (35.0)	2/29 (6.9)	51/246 (20.7)	82/233 (35.2)	43/102 (42.2)	39/60 (65.0)	6/99 (6.1)		

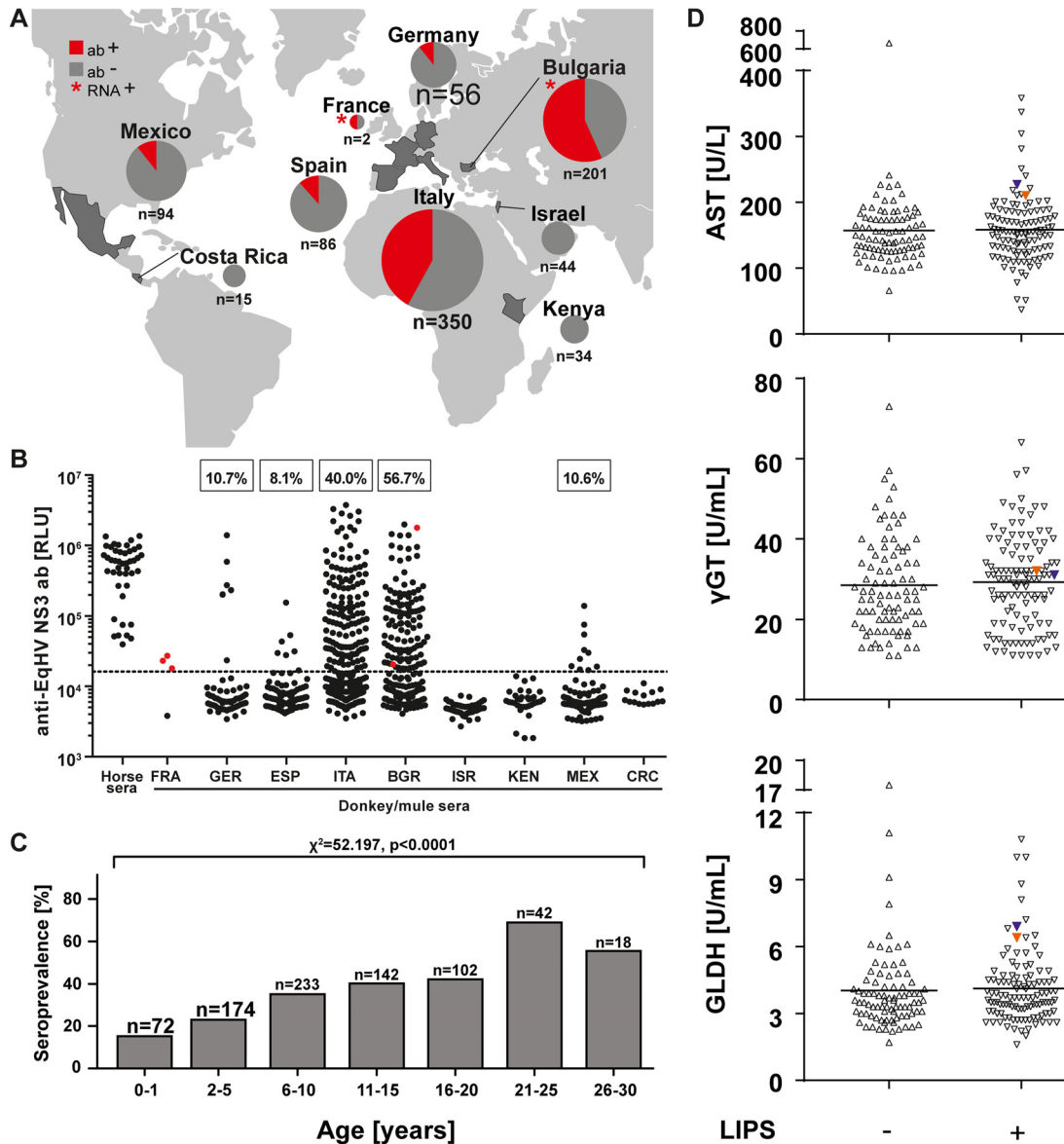
**TABLE 2** Annual donkey sample characteristics for France, Germany and Italy

Country	Sampling period (yr)	n	Ab <sup>+</sup> (%)	No. of animals/total no. of animals (%)								
				Gender			Age range in yrs					
				Jack	Jenny	Unknown	0–5	6–10	11–15	16–20	21–30	Unknown
France	1974	1	0 (0)			0/1 (0)						0/1 (0)
	1979	1	1 (100.0)			1/1 (100.0)						1/1 (100.0)
Germany	2007	39	5 (12.8)	0/9 (0)	5/30 (16.7)		0/7 (0)	4/13 (30.8)	0/5 (0)	0/3 (0)	0/2 (0)	1/9 (11.1)
	2008	3	0 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)		0/1 (0)	0/1 (0)		0/1 (0)		
	2015	14	1 (7.1)		1/14 (7.1)							1/14 (7.1)
Italy	2004–2009	38	5 (13.2)	0/13 (0)	4/13 (30.8)	1/12 (8.3)	1/15 (6.7)	3/12 (25.0)	0/7 (0)	1/4 (25.0)		
	2013	294	117 (39.8)	11/36 (30.6)	106/258 (41.1)		36/120 (30.0)	45/96 (46.9)	10/30 (33.3)	18/33 (54.5)	8/15 (53.3)	
	2015	18	18 (100.0)	3/3 (100.0)	15/15 (100.0)		5/5 (100.0)		11/11 (100.0)	1/1 (100.0)	1/1 (100.0)	

between 1974 and 2016 (Table 1). For three countries (France, Germany, and Italy), sampling was conducted in multiple years, and details of the annual sample characteristics in these countries are displayed in Table 2. In addition, 53 mule sera were sampled in Bulgaria in 2015. All 882 donkey and mule sera were analyzed for the presence of antibodies against the viral NS3 domain by a luciferase immunoprecipitation system (LIPS) (24, 25). Three sampling sites (Israel, Kenya, and Costa Rica) showed no serologic evidence for EqHV infection, whereas all other countries yielded positive test results (Fig. 1A). As shown in Table 1 and Fig. 1B, seroprevalence rates ranged between 8.1 and 10.7% in Germany, Spain, and Mexico. Seroprevalence rates in Italy and Bulgaria were significantly higher at 40.0 to 56.7% (corrected  $\chi^2 = 62.8$  and  $\chi^2 = 109.1$  [ $P < 0.0001$ ] for Italy and Bulgaria compared to all other countries, respectively). Furthermore, within a specific country the seroprevalence rates varied between sampling years and hinted at the occurrence of focal EqHV epidemics, e.g., leading to 100% of EqHV-seropositive animals in Italy in 2015 (Table 2). However, the underlying factors responsible for the variations in seroprevalence are unknown. LIPS signal intensities from seropositive donkeys were comparable to those from seropositive horses, suggesting validity of the assay used for testing (Fig. 1B). Female donkeys were significantly more likely to be seropositive than male donkeys (35.0 versus 28.0%; corrected  $\chi^2 = 4.1$  [ $P = 0.044$ ]; risk ratio, 1.25 [lower and upper bounds, 1.01 to 1.54]; Table 1). Seroprevalence increased significantly with animal age from 20.7% in young animals (0 to 5 years of age) to 55.5% in older animals (25 to 30 years) (Fig. 1C).

**Molecular detection of EqHV in donkeys.** To allow sensitive molecular detection of EqHV genetic variants in donkeys, all samples were tested using two different nested reverse transcription-PCR (RT-PCR) assays. The first assay targeted specifically the EqHV 5'-untranslated region (5' UTR) commonly used for HV detection (26) and a second assay targeted the NS3 domain that is more conserved among diverse HVs than the 5' UTR (11). One donkey from France (sampled in 1979, age and gender unknown), one donkey from Bulgaria (sampled in 2015, a 10-year-old male), and one mule from Bulgaria (sampled in 2015, a 16-year-old female) tested positive for EqHV RNA using the 5'-UTR-based assay (0.3% of all 882 donkey and mule sera). No additional specimens tested positive for HVs using the NS3-based assay, arguing against infection of donkeys with diverse HVs beyond EqHV.

**Comparison of EqHV infection patterns between equine species.** Our data enabled comparisons of EqHV infection patterns between donkeys and horses. First, viral loads, which are a quantitative marker of virus replication, were similar between equine host species infected with EqHV. Viral loads in the RNA-positive specimens from this study ranged from  $8.4 \times 10^5$  to  $3.7 \times 10^7$  genome copies/ml of serum, as determined by strain-specific real-time RT-PCR assays. These viral loads were similar to viral loads observed in horses (20, 23, 25), suggesting similar infection intensities in both equine species. Furthermore, the detection of viral RNA at comparable loads in the French sera sampled in 1979 and Bulgarian sera sampled in 2015 implicated suitability of the non-recently sampled specimens for viral RNA detection.



**FIG 1** EqHV infection patterns. (A) Anti-EqHV antibody (ab) detection depicted in pie charts (red = positive). Asterisks, origin of the EqHV-RNA positive animals. (B) LIPS ratios of control sera from horses and donkeys; Bulgaria includes as well 53 sera from mules. EHV-RNA positive donkey and mule sera are indicated in red. All three positive sera from France originate from one animal; no seroprevalence rate for this country is indicated due to the low sample size. Dotted line, cutoff (16,249.2 RLU). (C) Seroprevalence rates in different age groups. (D) Aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ GGT), and glutamate dehydrogenase (GLDH) levels were determined in the sera of Bulgarian donkeys. Sera are shown according to their LIPS status, and RNA-positive samples are given in orange and blue.

Viral clearance is typically delayed in HV infection, including infection with EHV in horses (7). In our study, three serial individual specimens taken at different time points over 2 weeks (May–June 1979) were available from the RNA-positive donkey sampled in France. All three specimens, as well as both individual specimens from Bulgaria, tested positive both for EHV antibodies (indicated as red dots in Fig. 1B) and RNA, providing evidence against immediate antibody-mediated EHV clearance in donkeys. However, the co-occurrence of viremia and antibodies as a sign of delayed clearance was apparently much lower in donkeys at 1.1% (3 of 278 antibody-positive animals) than in horses at 2 to 30% (17, 20, 24, 25, 27, 28).

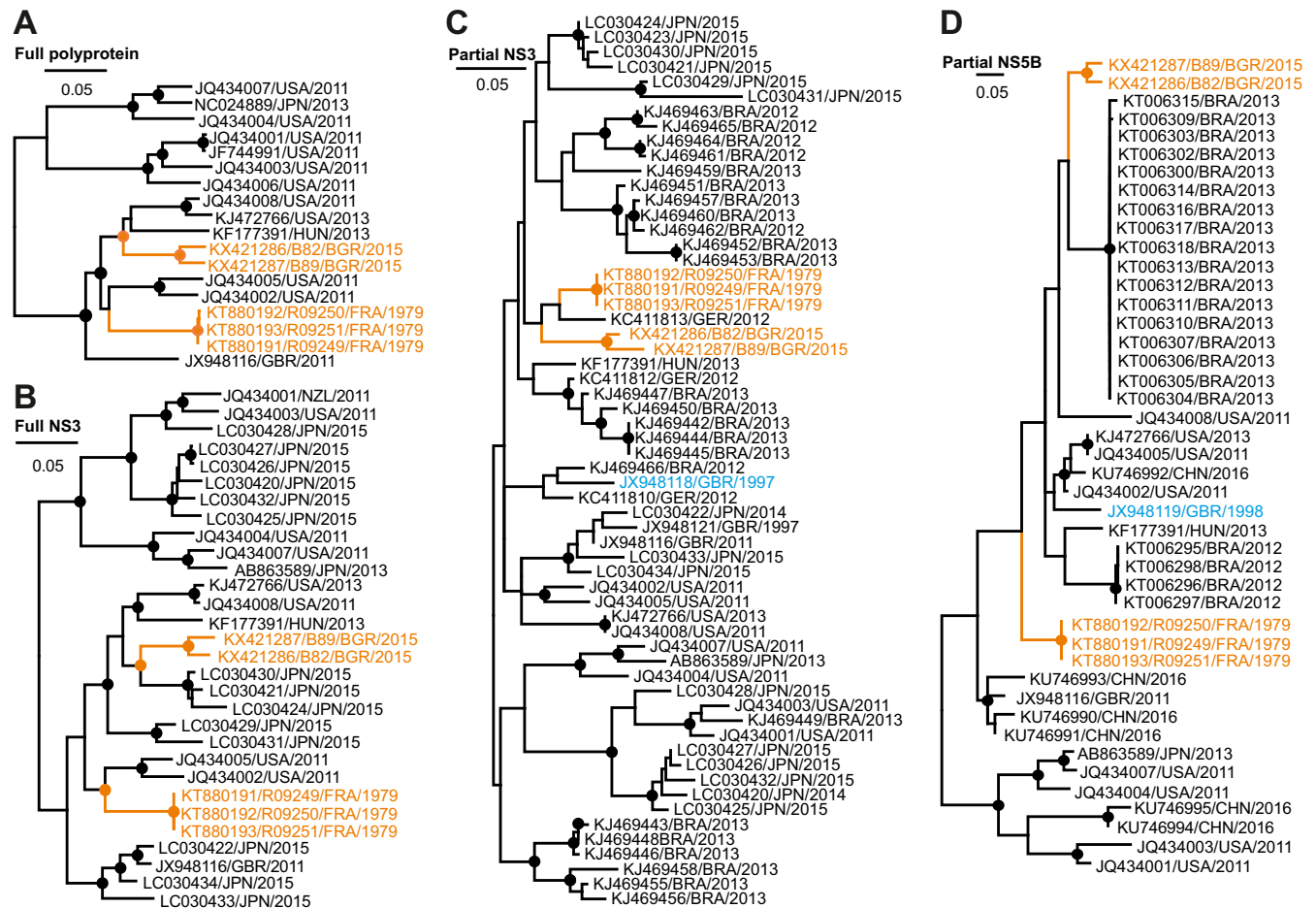
Predominantly acute resolving infections were compatible with a generally lower RNA detection rate in donkeys than in horses. Combining all available data from previous studies on horses (17, 20–25, 27, 28), 148 of 2,172 horses tested positive for

EqHV RNA (6.8% [range, 0.9 to 35.5%]) compared to only 3 of 1,047 donkeys or mules when combining the data from this study with previous studies (17, 20–22) (0.3%; corrected  $\chi^2 = 65.9$ ,  $P < 0.00001$ ). The low number of RNA-positive donkeys could not be explained by a putatively low exposure of donkeys to EqHV, since seroprevalence in donkeys was high at 28.3% (278 of 982 donkeys combining this and the only previous serological study [17]), although still significantly lower than in horses at 34.9% (469 of 1,343 horses from all previous studies performing serological analyses; corrected  $\chi^2 = 11.1$ ,  $P < 0.0009$ ). The EqHV seroprevalence increased with the age of donkeys, which was comparable to a study on EqHV in German horses (25) but in contrast to another study on EqHV in Japanese horses (28). Finally, female donkeys were more likely to be seropositive for EqHV than male donkeys. A similar distribution was not observed for horses in two previous studies, one showing no gender-associated differences and another one showing a higher EqHV burden in male horses (25, 28).

Next, we investigated the clinical relevance of EqHV infection in donkeys by determination of aspartate aminotransferase (AST; reference value  $<536$  U/liter), gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ GGT;  $<69$  U/liter), and glutamate dehydrogenase (GLDH;  $<8.2$  U/liter) levels in serum of all Bulgarian donkeys ( $n = 201$ ) as markers of liver damage. As depicted in Fig. 1D, liver enzymes concentrations were mainly within the reference range (29) and were comparable between the seropositive and seronegative groups, including the RNA-positive animals (indicated in color in Fig. 1D), which is in line with the reported subclinical course of infection in horses.

**Cross-species transmission of EqHV.** The full viral polyprotein genes were determined for all donkey EqHV strains, including those from the three serial bleedings from the French donkeys and those from the Bulgarian donkey and mule. The polyprotein genes encompassed 8,832 nucleotides from the French donkey EqHV strain, as well as 8,835 and 8,841 nucleotides from the Bulgarian donkey and mule, respectively. Polyprotein length and organization was identical in all cases to that observed before in EqHV from horses with the presence of all typical domains in the order C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A/NS4B-NS5A/NS5B. Maximum-likelihood (ML) phylogenetic reconstructions based on the complete polyprotein gene were highly robust, as suggested by high bootstrap support for clusters based on 1,000 replicates. In these ML phylogenetic reconstructions, the novel donkey HVs from France and Bulgaria formed two distinct viral lineages that were not monophyletic. In addition, these donkey HV lineages were interspersed between EqHV from horses and did not cluster in sister relationships to EqHV strains from horses (Fig. 2A). The close phylogenetic relationship between EqHV strains from horses and from donkeys or mules was compatible, with a narrow genetic distance of only 1.8 to 2.5% of the translated polyprotein genes of these strains. Of note, even upon inclusion of the novel donkey viruses, the EqHV patristic distance was only 6.2% on amino acid level in the translated polyprotein gene compared to 33.1% within HCV (calculated using 189 genotype 1 to 7 reference sequences from the Los Alamos National Laboratory [<http://hcv.lanl.gov>]). However, most of the previous studies on EqHV in horses characterized only short regions of the viral genome. Therefore, we repeated ML reconstructions using different data sets aiming at inclusion of the complete available EqHV genetic diversity without losing too much genetic information. As expected, statistical support for grouping of basal and intermediate nodes was low for the partial NS3 (*helicase/protease*) and NS5B (*RNA-dependent RNA polymerase*) domains commonly analyzed in EqHV studies. However, these reconstructions resulted in similar phylogenies, as shown for the complete polyprotein sequences with regard to the phylogenetic relationships between EqHV strains from donkeys and horses (Fig. 2B to D).

To investigate whether potential cross-species transmission was associated with molecular adaptation, we tested for differential selection among horse and donkey EqHV lineages using codon substitution models that allow for various nonsynonymous/synonymous substitution rate ratios ( $dN/dS$ ) among branches (30). Branches leading to the two common ancestors of donkey EqHV strains showed a lower  $dN/dS$  ratio (0.02)

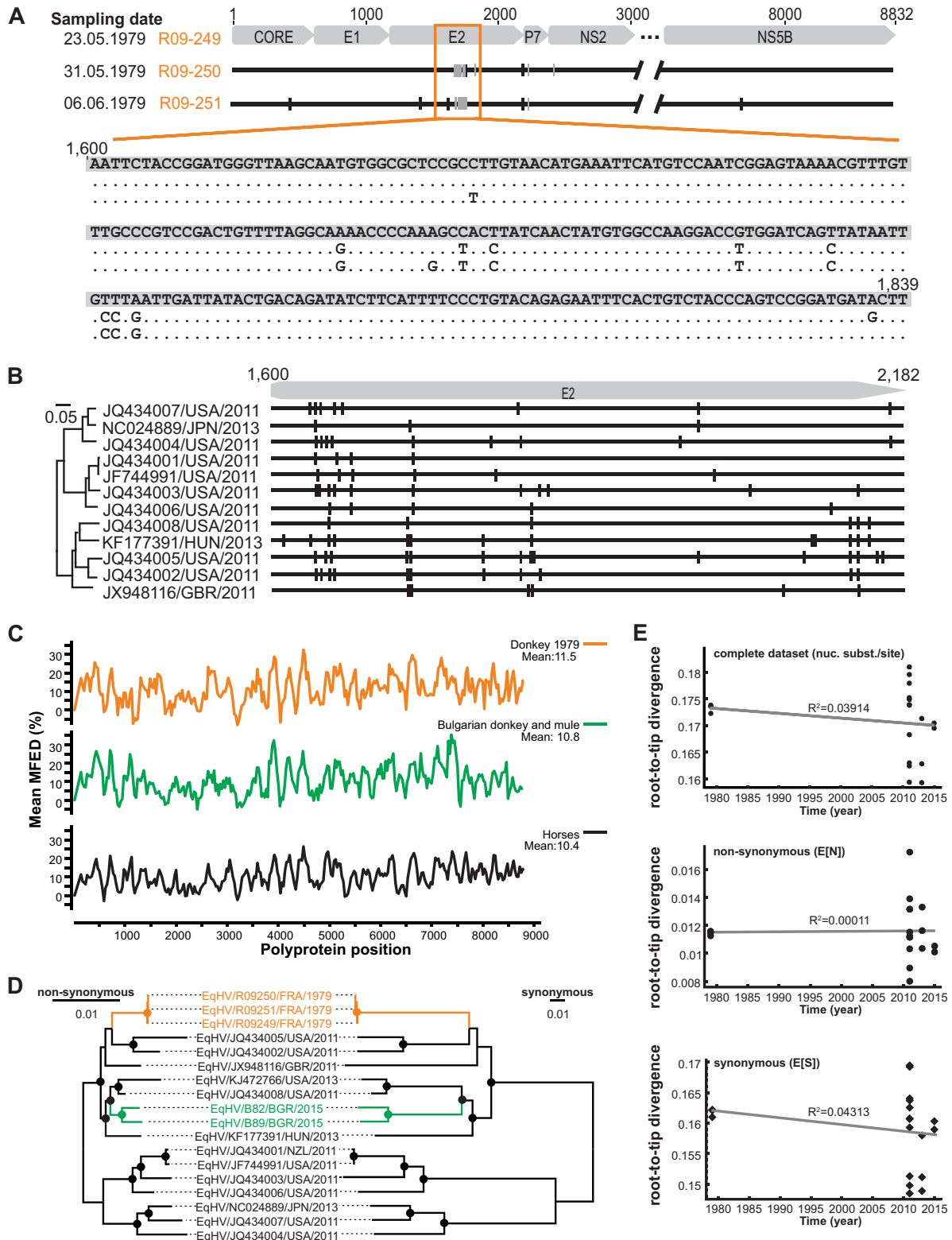


**FIG 2** Phylogenetic relationships of EHV, including the novel donkey hepaciviruses. (A) Maximum-likelihood (ML) phylogeny based on the nucleotide sequences encoding for the complete EHV polyprotein, including the newly described donkey EHV strains (orange). Bootstrap values larger than 75% are depicted as filled circles. Taxon designations indicate GenBank accession numbers, country and year of sampling. (B to D) ML phylogenies based on the complete NS3 (1,872 nucleotides), partial NS3 (293 nucleotides), and partial NS5B (261 nucleotides), respectively. Cyan, noncontemporary strains from two horses. Partial NS3 sequences for which fewer than 200 nucleotides were characterized were not included in the analysis shown in panel C to avoid further loss of genomic information and robustness of phylogenetic reconstruction.

compared to the *dN/dS* ratio among all other branches in the complete genome data set (0.04), indicating no detectable episodic adaptive signal underlying the transmission of EHV strains from horses to donkeys. Identical results were obtained for the data set encompassing the full NS3, for which a larger number of horse EHV sequences were available (Fig. 2B), with a *dN/dS* ratio of 0.0036 in branches leading to donkey EHV strains compared to 0.0128 among other branches. An analysis using BUSTED confirmed the absence of any signal of gene-wide episodic diversifying selection along the branches leading to the two donkey clades. A FUBAR analysis to identify site-specific selection only indicated two positively selected sites in the complete polyprotein evolutionary history, which do not appear to be related to equine-to-donkey adaptation because the donkey viruses do not share a particular amino acid residue on those positions. In conclusion, the *dN/dS* ratios suggested that no host adaptation is needed for the mutual infection of horses and donkeys with EHV.

**Intra- and interhost EHV evolution.** In order to determine EHV intrahost evolutionary patterns, the complete polyprotein gene sequences of the three serial bleedings available from the French donkey were analyzed. Intrahost variability within this viral gene spanning 8,832 nucleotides was 0.17% (15 substitutions) over 2 weeks (between 23 May and 6 June 1979; Fig. 3A). Similar to HCV, most mutations and in particular the majority of nonsynonymous mutations occurred in the antigenic E2 envelope protein (31), consistent with immune pressure influencing EHV evolution in

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on March 21, 2017 by UNIVERSITAETS-UND



**FIG 3** EqHV evolutionary patterns. (A) Analysis of EHV polyprotein sequences from three consecutive samples of one EHV RNA-positive donkey sampled in France. Gray bars, synonymous substitutions; black bars, nonsynonymous substitutions. (B) On the right are the locations of nonsynonymous mutations in the E2 genes of EHV strains infecting horses. On the left is indicated the ML phylogeny of the translated sequences as before. (C) Mean folding energy differences (MFED) for complete polyprotein sequences of EHV strains representing both donkey EHV lineages and all available EHV polyprotein sequences shown in Fig. 2A. (D) Complete polyprotein ML phylogenies with branch lengths reestimated using either nonsynonymous or synonymous substitutions. Bootstrap values larger than 75% are depicted as filled circles. (E) Root-to-tip divergence plots based on ML trees shown in panel C and Fig. 2A.

the infected animal. However, the majority of the observed mutations did not map to the N-terminal hypervariable E2 region described for HCV (31) but accumulated in the C-terminal region of the E2 gene. To investigate whether indeed EqHV generally differs from HCV in the distribution of nonsynonymous mutations in the E2 gene, the homologous domains of 12 EqHV strains infecting horses were analyzed. As shown in Fig. 3B, EqHV strains infecting horses were similar to HCV in that 72 nonsynonymous mutations accumulated in the N-terminal region of E2, compared to only 28 nonsynonymous mutations in the C-terminal region. The different pattern observed in the EqHV-infected donkey is thus likely due to the small data set available, but potential differences of genomic variability among EqHV hosts cannot be excluded at this point. Finally, reversion of two mutations was detected across the serial bleedings (in the viral E2 and NS2 domains, Fig. 3A), which again is similar to intrahost evolution patterns observed in HCV (32). The predicted similarities in EqHV and HCV evolutionary patterns in combination with the low EqHV patristic distance suggested a limited time of EqHV evolution in equines compared to HCV in humans.

However, viral evolution may be limited by noncoding constraints such as genome-scale ordered RNA structures (GORS). Albeit the level of predicted mean folding energy differences (MFEDs; a measure of GORS) across the polyprotein-coding region was slightly higher in donkey EqHV strains than the mean MFEDs within horse EqHV strains, the overall EqHV MFED patterns showed similarities between both equine species in terms of the presence and the extent of predicted stem-loops (Fig. 3C). The overall levels of MFEDs ranging up to 11.5% in our analyses were comparable to previous analyses of EqHV (15, 24) and higher than the 8.5% described before for human HCV (33), which may imply a stronger impact of GORS on EqHV than on HCV evolution (6). However, it seems unlikely that GORS alone can account for the drastic differences between EqHV and HCV genetic diversity.

**Lack of temporal signal in EqHV.** The donkey HVs sequences from 1979 represent the oldest EqHV strains described so far. In order to investigate whether these sequences could serve to calibrate the molecular clock of EqHV evolution, root-to-tip distances were analyzed as a function of sampling time. To further investigate whether the temporal signal in EqHV was potentially influenced by evolutionary pressure, root-to-tip distances were compared for complete polyprotein gene trees comprising only nonsynonymous (NS) or synonymous (S) substitutions (Fig. 3D). The complete polyprotein-based tree, as well as the trees with branch lengths reestimated in either NS or S substitutions lacked a molecular clock signal, as visualized by plotting root-to-tip divergence against year of sampling (Fig. 3E). Of note, a lack of temporal signal upon inclusion of the 1979 donkey EqHV strains was consistent with the apical phylogenetic position of two EqHV strains sampled from horses in 1997 and 1998 (20) (shown in cyan in Fig. 2C and D). Unfortunately, only a partial NS3 sequence is available for the 1997 EqHV and only a partial NS5B sequence for the 1998 EqHV strain, preventing their inclusion in our temporal analyses.

## DISCUSSION

In this study, we describe wide-reaching infection of donkey populations with EqHV and analyze two divergent donkey EqHV lineages from contemporary and noncontemporary samples.

If EqHV existed with donkeys for prolonged time spans, one could expect that donkeys globally would show signs of infection. However, although infection with EqHV was widespread and frequent according to our data, three populations in Kenya, Israel, and Costa Rica were entirely seronegative. Although this may be linked to the relatively smaller sample sizes ( $n = 15$  to 44), some seropositive animals could be expected in these populations given the 8.1 to 56.7% seroprevalence in other donkey populations. The absence of EqHV infection in these three populations is consistent with the absence of serological signs of EqHV infection in 100 English donkeys (17). The most parsimonious explanation is that EqHV was neither present in the founders of these populations, nor introduced subsequently. Alternative explanations include the

extinction of EqHV in these populations together with their hosts. However, the subclinical course of infection of EqHV suggested by the high seroprevalence rates in animals of all ages, the comparable biochemical profiles of seropositive and seronegative donkeys, and the limited clinical impact of EqHV on experimentally infected horses (25) do not support the high health costs of EqHV infection in donkeys.

Although the transmission routes of EqHV remain unclear, parenteral transmission is the most likely route based on *in vivo* infection experiments and comparisons to HCV (25, 34). Our data support frequent horizontal transmission in EqHV-infected populations, potentially aided by human interference, e.g., vaccination or transfusion by veterinarians (28). The higher seroprevalence we found in female donkeys may be compatible with a relevant occurrence of sexual transmission in EqHV. This would be different from HCV, for which sexual transmission is very infrequent (35), and for which detection rates and viral loads are much lower in semen than in blood (summarized in reference 36). Hypothetically, the absence of higher EqHV seroprevalence in female horses than in male horses (25, 28) may be obscured by anthropogenic intervention. Another factor aiding higher seroprevalence in female donkeys may be putatively larger groups held together, compared to more solitary male donkeys. This hypothesis would be consistent with recently described herd-specific EqHV strains from horses in Germany, suggesting focal horizontal and vertical transmission (37). Experimental infections, comparative testing of horse and donkey semen, and additional epidemiological data from both equine species will be necessary to elucidate how EqHV and HCV transmission modes may differ. Furthermore, the reason for the high variability of RNA-positive EqHV infections in horses (17, 20, 24, 25, 27, 28) is not clear yet. The only factors, which have been noticed so far are horse racing and attendance at equestrian sports (21, 22, 25, 28).

The genetic relatedness of donkeys and horses likely facilitated the cross-species transmission events suggested by our data (38). Hypothetically, the similarities in the time of domestication of horses and donkeys 5,000 to 6,000 years ago (18, 39) would have facilitated host shifts between the two equine species. However, the geographically most relevant area for the domestication of horses was likely the Eurasian steppe (18), compared to northeastern Africa for donkeys (40), narrowing the time span of frequent co-occurrence of these two species to more recent times. It would thus be interesting to analyze ancient donkey species for evidence of ancestral EqHV strains, including the wild African ass (*E. africanus*), which is an evolutionary old species that likely contributed to the development of the widespread domestic donkey (41). However, only few individuals exist nowadays within this species classified as "critically endangered" by the International Union for the Conservation of Nature.

Our phylogenetic analyses provide clear evidence against a potential coevolutionary relationship between EqHV and different equine hosts, which diverged millions of years ago (18, 19). The recent evolutionary history of EqHV thus narrows the time window for putative equine-to-human transmission in the past as an explanation for the origins of HCV (10). Of note, absence of past EqHV infections of humans is consistent with absence of signs of present EqHV infection in different human cohorts (17, 42, 43). A short evolutionary association between equine hosts and EqHV is also consistent with the highly diverse HV lineages found in the genetically related hosts belonging to the order Artiodactyla (cattle). The perissodactylan and artiodactylan lineages clearly did not cospeciate with their hosts (12), and whether both of them are the result of independent cross-species HV transmission events or whether unique host associations can be found for either the perissodactylan or the artiodactylan lineage remains to be determined. Immediate experimental approaches include testing of related host species, e.g., zebras for the Perissodactyla and livestock species like sheep or goats for the Artiodactyla.

Lack of deep-branching monophyletic clusters of EqHV strains from different regions compared to the existence of geographically distinct HCV genotypes (2) are compatible with global virus admixture through human interference, i.e., transport of infected animals or animal products over wide geographic distances. The observation of viral



admixture in equids is paralleled by the occurrence of closely related HVs in cattle in Ghana and Germany (12, 44). Probably, the distribution of cattle has undergone anthropogenic change in an extent similar to that of equids. An unrestricted exchange of EqHV strains among horses and donkeys suggested by our phylogenetic data is consistent with the inability to calibrate a molecular clock using EqHV strains sampled in 1979. Of note, our results do not exclude that a clock-like signal may have existed in EqHV ancestors that evolved prior to the viruses analyzed in this study. Similarly, a 40-year interval may be generally insufficient to analyze the EqHV molecular clock. Interestingly, although investigations of the HCV molecular clock have met considerable difficulties (31), a recent study was able to reconcile phylogeny and sampling dates of archived HCV strains from 1953 (45). An interval spanning several decades is thus not generally unsuitable for HV molecular clock analyses. Although we cannot exclude the existence of potentially more diverse EqHV lineages in donkeys, our large sample reached almost half of that of the combined previous studies into horses and extended all of the latter in geographic extent, suggesting the robustness of our evolutionary reconstructions. Limitations of our study that can be circumvented in future prospective studies include inhomogeneous sampling across sites, lack of knowledge on medical treatment and health status of donkeys, as well as their contact to horses.

Finally, EqHV infection patterns in horses and donkeys may differ in the potentially higher ability of donkeys to clear EqHV infection. The first hints at possible explanations originate from strikingly different EqHV RNA and antibody detection rates between different horse breeds. More frequent EqHV infection may be linked to the frequency of veterinary examinations, since valuable race horses and thoroughbreds seem to be particularly often infected by EqHV (21, 25, 28). Alternatively, differences in immune responses influencing viral clearance may occur between different horse breeds, although a generally higher susceptibility to viral infections in thoroughbreds is not supported by data on equine influenza (46). However, our data permit hypotheses on differential immune control of EqHV by different equine species, since donkeys may differ in their immune capacity from horses more than horse breeds from each other (47). Again, alternative explanations that remain to be explored include less intense veterinary handling of donkeys than in more valuable horse species. Beyond investigations of EqHV ecology, our data suggest a unique opportunity to comparatively investigate hepaciviral pathogenesis in a natural host. Here, infection courses can be directly compared by experimentally infecting horses and donkeys with identical EqHV strains, without the need to conduct highly restricted experimental infections of chimpanzees with HCV lacking the simultaneous infection of the human counterpart (48).

In conclusion, our study highlights the impact of evolutionarily guided investigations into viral ecology and offers new possibilities to elucidate factors involved in the development of chronic HV infections.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample collection.** Donkey sera were collected based on availability in France, Germany, Spain, Italy, Bulgaria, Israel, Kenya, Mexico, and Costa Rica from 1974 to 2016. Animal sera were stored at  $-20$  or  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. In addition, 53 mule samples were collected in Bulgaria in 2015. Samples were either collected as part of routine examinations (Germany, Italy, Costa Rica, and France) or under permits issued by the responsible authorities. The permit numbers were as follows: Mexico, SICUAE FMVZ-UNAM F. García-Lacy 12042013; Kenya, IACUC 2015.8; Spain, BOJA55-20/2012; Israel, KSVM-VTH/5\_2013; Italy, protocol 45/2013/CEISA/COM; and Bulgaria, FVM 15/15. Host designations were assessed for all EqHV RNA-positive specimens from France from 1979 by characterization of the mitochondrial COI gene as described before (49).

**Luciferase immunoprecipitation system.** All samples were analyzed for the presence of anti-NS3 antibodies by the previously described LIPS (24). Briefly, sera were diluted 1:10 in buffer A and incubated for 1 h on a rotary shaker. Renilla-NS3 fusion proteins were expressed in Cos1 cells, and  $10^7$  relative light units (RLU) were added per well to the diluted sera in a 96-well plate. After incubation for 1 h on a rotary shaker, antibody-antigen complexes were immunoprecipitated by A/G beads and the RLU were determined. Each sample was measured in duplicate wells. The cutoff was calculated by the mean values of wells containing only buffer A, the Renilla-NS3 fusion protein and A/G beads plus three standard deviations as described previously (24). A positive control containing anti-EqHV antibody-positive horse serum was included in each run.

**Detection of EqHV RNA.** For the detection of hepaciviral RNA a hemi-nested RT-PCR assay targeting the 5' UTR was developed based on all available EqHV 5'-UTR sequences. The primer sequences were as follows: HCV-F150, GSWSCYYCYAGGICMCCCC; HCV-R371, CTCRTGIISYAIGGTCTACRAGRCC; and HCV-R342, GGIGCITCGCAAGCRYGCCYATCA (I = inosine, S = C/G, W = A/T, Y = C/T, M = A/C, and R = A/G). The limits of detection were determined as the number in probit analyses conducted with SPSS V23 (IBM, Ehningen, Germany) using eight replicates per RNA concentration as described previously (26). The 95% lower limit of detection of the EqHV 5'-UTR assay was  $5.7 \times 10^2$  RNA copies per reaction (range,  $3.8 \times 10^2$  to  $1.2 \times 10^3$ ), which was well below the commonly observed viral loads in EqHV-infected horses (25). The HV NS3-based assay was described previously (11). Cross-tables were calculated using EpiInfo V7 (<http://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>) and an online tool (<http://quantpsy.org/chisq/chisq.htm>). Sequencing of the complete EqHV polyprotein genes was performed by amplifying genome-spanning islets with degenerate broadly reactive oligonucleotides as described previously (11). Viral loads were determined by strain-specific quantitative real-time RT-PCR (oligonucleotide sequences available upon request) with photometrically quantified *in vitro* cRNA transcripts used for calculation of the standard curve as described previously (11).

**In silico analyses.** Statistical analyses were done using SPSS V23 (IBM). Sequences were aligned with MAFFT (Geneious 6.1.8). Maximum-likelihood phylogenetic analyses were calculated in MEGA6 (50) and RAxML (51) using a general time reversible model with a discrete gamma distribution and a proportion of invariable sites and 1,000 bootstrap replicates. To estimate branch lengths in synonymous and nonsynonymous substitutions per site, a codon substitution model was applied in HypHy (52) that allows for branch-specific synonymous and nonsynonymous substitution rates (53). PAML (54) was used to fit a codon substitution model that allowed for a different nonsynonymous/synonymous substitution rate ratio ( $\omega$ ) on the branches leading to the two donkey HV common ancestors compared to the  $\omega$  on the remaining branches (30). In addition, we used BUSTED (55) to search for gene-wide evidence of episodic positive selection along the branches leading to the donkey virus clades, and FUBAR (56) to identify site-specific selection patterns, both implemented in HypHy. Root-to-tip divergence was plotted against sampling time using TempEst (57). Mean folding energy differences were calculated using SSE V1.2 as described previously (12).

**Accession number(s).** All polyprotein gene sequences generated in this study were submitted to GenBank under accession numbers KT880191 to KT880193 and KX421286 to KX421287.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Monika Eschbach-Bludau, Sebastian Brünink, and Tobias Bleicker (University of Bonn Medical Centre, Bonn, Germany), Michael Engelmann (Twincore, Hannover, Germany), and Rocio Gonzales Barrientos and Gabriela Hernandez Mora (SENASA Costa Rica) for assistance. We are grateful to Peter D. Burbelo (NIH, Bethesda, MD) for providing the Renilla-luciferase-NS3 fusion plasmid.

S.W. was supported by the Hannover Biomedical Research School and the Centre for Infection Biology (ZIB). E.S. was supported by an intramural young investigator award from the Helmholtz Centre for Infection Research. A.M.S. was supported by a personal scholarship from the German Academic Exchange Service (DAAD). This study was funded by German Research Foundation (DFG) grants STE 1954/1-1 to E.S. and 810/1-1 to J.F.D. and an intramural grant from the University of Bonn (BONFOR) to J.F.D. TWINCORE is a joint venture between the Hannover Medical School (MHH) and the Helmholtz Centre for Infection Research (HZI). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## REFERENCES

1. Global Burden of Disease Study. 2015. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 386: 743–800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4).
2. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. 2014. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59:318–327. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>.
3. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. 2015. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 61:77–87. <https://doi.org/10.1002/hep.27259>.
4. Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, Allain JP, Hatzakis A. 2009. The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med* 6:e1000198. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000198>.
5. Markov PV, Pepin J, Frost E, Deslandes S, Labbe AC, Pybus OG. 2009. Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa. *J Gen Virol* 90:2086–2096. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011569-0>.
6. Simmonds P. 2013. The origin of hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 369:1–15.
7. Scheel TK, Simmonds P, Kapoor A. 2015. Surveying the global virome: identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. *Antiviral Res* 115:83–93. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.014>.
8. Pfaender S, Brown RJ, Pietschmann T, Steinmann E. 2014. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerg Microbes Infect* 3:e21. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.19>.
9. Makuwa M, Souquiere S, Telfer P, Leroy E, Bourry O, Rouquet P, Clifford S, Wickings EJ, Roques P, Simon F. 2003. Occurrence of hepatitis viruses in wild-born non-human primates: a 3 year (1998-2001) epidemiological survey in Gabon. *J Med Primatol* 32:307–314. <https://doi.org/10.1046/j.1600-0684.2003.00042.x>.

10. Pybus OG, Theze J. 2016. Hepacivirus cross-species transmission and the origins of the hepatitis C virus. *Curr Opin Virol* 16:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.002>.
11. Drexler JF, Corman VM, Muller MA, Lukashev AN, Gmyl A, Coutard B, Adam A, Ritz D, Leijten LM, van Riel D, Kallies R, Klose SM, Gloza-Rausch F, Binger T, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Bourgarel M, Rupp D, Hoffmann B, Schlegel M, Kummerer BM, Kruger DH, Schmidt-Chanasit J, Setien AA, Cottontail VM, Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Osterrieder K, Bartenschlager R, Matthee S, Beer M, Kuiken T, Reusken C, Leroy EM, Ulrich RG, Drosten C. 2013. Evidence for novel hepaciviruses in rodents. *PLoS Pathog* 9:e1003438. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003438>.
12. Corman VM, Grundhoff A, Baechlein C, Fischer N, Gmyl A, Wollny R, Dei D, Ritz D, Binger T, Adankwah E, Marfo KS, Annison L, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Becher P, Drosten C, Drexler JF. 2015. Highly divergent hepaciviruses from African cattle. *J Virol* 89:5876–5882. <https://doi.org/10.1128/JVI.00393-15>.
13. Theze J, Lowes S, Parker J, Pybus OG. 2015. Evolutionary and phylogenetic analysis of the hepaciviruses and pegiviruses. *Genome Biol Evol* 7:2996–3008. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv202>.
14. Pybus OG, Gray RR. 2013. Virology: the virus whose family expanded. *Nature* 498:310–311. <https://doi.org/10.1038/498310a>.
15. Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, Firth C, Hirschberg DL, Rice CM, Shields S, Lipkin WI. 2011. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11608–11613. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101794108>.
16. El-Attar LM, Mitchell JA, Brooks Brownlie H, Priestnall SL, Brownlie J. 2015. Detection of non-primate hepaciviruses in UK dogs. *Virology* 484:93–102. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.005>.
17. Lyons S, Kapoor A, Schneider BS, Wolfe ND, Culshaw G, Corcoran B, Durham AE, Burden F, McGorum BC, Simmonds P. 2014. Viraemic frequencies and seroprevalence of non-primate hepacivirus and equine pegiviruses in horses and other mammalian species. *J Gen Virol* 95:1701–1711. <https://doi.org/10.1099/vir.0.065094-0>.
18. Outram AK, Stear NA, Bendrey R, Olsen S, Kasparov A, Zaibert V, Thorpe N, Evershed RP. 2009. The earliest horse harnessing and milking. *Science* 323:1332–1335. <https://doi.org/10.1126/science.1168594>.
19. Orlando L, Ginolhac A, Zhang G, Froese D, Albrechtsen A, Stiller M, Schubert M, Cappellini E, Petersen B, Moltke I, Johnson PL, Fumagalli M, Vilstrup JT, Raghavan M, Korneliusen T, Malaspina AS, Vogt J, Szklarczyk D, Kelstrup CD, Vinther J, Dolocan A, Stenderup J, Velazquez AM, Cahill J, Rasmussen M, Wang X, Min J, Zazula GD, Seguin-Orlando A, Mortensen C, Magnussen K, Thompson JF, Weinstock J, Gregersen K, Røed KH, Eisenmann V, Rubin CJ, Miller DC, Antczak DF, Bertelsen MF, Brunak S, Al-Rasheid KA, Ryder O, Andersson L, Mundy J, Krogh A, Gilbert MT, Kjaer K, Sicheritz-Ponten T, Jensen LJ, Olsen JV, Hofreiter M, Nielsen R, Shapiro B, Wang J, Willerslev E. 2013. Recalibrating *Equus* evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499:74–78. <https://doi.org/10.1038/nature12323>.
20. Lyons S, Kapoor A, Sharp C, Schneider BS, Wolfe ND, Culshaw G, Corcoran B, McGorum BC, Simmonds P. 2012. Nonprimate hepaciviruses in domestic horses, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 18:1976–1982. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120498>.
21. Gemaque BS, Junior Souza de Souza A, do Carmo Pereira Soares M, Malheiros AP, Silva AL, Alves MM, Gomes-Gouveia MS, Pinho JR, Ferreira de Figueiredo H, Ribeiro DB, Souza da Silva J, Moraes LA, Ribeiro AS, Pereira WL. 2014. Hepacivirus infection in domestic horses, Brazil, 2011–2013. *Emerg Infect Dis* 20:2180–2182.
22. Lu G, Sun L, Xu T, He D, Wang Z, Ou S, Jia K, Yuan L, Li S. 2016. First description of hepacivirus and pegivirus infection in domestic horses in China: a study in Guangdong Province, Heilongjiang Province, and Hong Kong District. *PLoS One* 11:e0155662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155662>.
23. Scheel TK, Kapoor A, Nishiuchi E, Brock KV, Yu Y, Andrus L, Gu M, Renshaw RW, Dubovi EJ, McDonough SP, Van de Walle GR, Lipkin WI, Divers TJ, Tennant BC, Rice CM. 2015. Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:2192–2197. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500265112>.
24. Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henriquez JA, Mishra N, Wagner J, Tokarz R, Cullen JM, Iadarola MJ, Rice CM, Lipkin WI, Kapoor A. 2012. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J Virol* 86:6171–6178. <https://doi.org/10.1128/JVI.00250-12>.
25. Pfaender S, Cavalleri JM, Walter S, Doerrbecker J, Campana B, Brown RJ, Burbelo PD, Postel A, Hahn K, Anggakusuma Riebesehl N, Baumgartner W, Becher P, Heim MH, Pietschmann T, Feige K, Steinmann E. 2015. Clinical course of infection and viral tissue tropism of hepatitis C virus-like nonprimate hepaciviruses in horses. *Hepatology* 61:447–459. <https://doi.org/10.1002/hep.27440>.
26. Drexler JF, Kupfer B, Petersen N, Grotto RM, Rodrigues SM, Grywna K, Panning M, Annan A, Silva GF, Douglas J, Koay ES, Smuts H, Netto EM, Simmonds P, Pardini MI, Roth WK, Drosten C. 2009. A novel diagnostic target in the hepatitis C virus genome. *PLoS Med* 6:e31.
27. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K. 2014. Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J Virol* 88:13352–13366. <https://doi.org/10.1128/JVI.02280-14>.
28. Matsu A, Hobo S, Ando K, Sanekata T, Sato F, Endo Y, Amaya T, Osaki T, Horie M, Masatani T, Ozawa M, Tsukiyama-Kohara K. 2015. Genetic and serological surveillance for non-primate hepacivirus in horses in Japan. *Vet Microbiol* 179:219–227. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.028>.
29. Burden FA, Hazell-Smith E, Mulugeta G, Patrick V, Trawford R, Brooks-Brownlie HW. 2016. Reference intervals for biochemical and haematological parameters in mature domestic donkeys (*Equus asinus*) in the UK. *Equine Vet Educ* 28:134–139. <https://doi.org/10.1111/eve.12512>.
30. Yang Z. 1998. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Mol Biol Evol* 15:568–573. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025957>.
31. Gray RR, Parker J, Lemey P, Salemi M, Katzourakis A, Pybus OG. 2011. The mode and tempo of hepatitis C virus evolution within and among hosts. *BMC Evol Biol* 11:131. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-131>.
32. Pfaender S, Gaudieri S, Ulsenheimer A, James I, Heeg M, Nolan D, John M, Rauch A, Mallal S, Lucas A, Klenerman P, Diepolder HM, Lucas M. 2011. Constrained pattern of viral evolution in acute and early HCV infection limits viral plasticity. *PLoS One* 6:e16797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016797>.
33. Simmonds P, Tuplin A, Evans DJ. 2004. Detection of genome-scale ordered RNA structure (GORS) in genomes of positive-stranded RNA viruses: implications for virus evolution and host persistence. *RNA* 10:1337–1351. <https://doi.org/10.1261/rna.7640104>.
34. Ramsay JD, Evanoff R, Wilkinson TE, Jr, Divers TJ, Knowles DP, Mealey RH. 2015. Experimental transmission of equine hepacivirus in horses as a model for hepatitis C virus. *Hepatology* 61:1533–1546. <https://doi.org/10.1002/hep.27689>.
35. Thomas DL. 2013. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat Med* 19:850–858. <https://doi.org/10.1038/nm.3184>.
36. Turner SS, Gianella S, Yip MJ-S, van Seggelen WO, Gillies RD, Foster AL, Barbati ZR, Smith DM, Fierer DS. 2016. Shedding of hepatitis C virus in semen of human immunodeficiency virus-infected men. *Open Forum Infect Dis* 3:ofw057. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw057>.
37. Gather T, Walter S, Todt D, Pfaender S, Brown RJ, Postel A, Becher P, Moritz A, Hansmann F, Baumgaertner W, Feige K, Steinmann E, Cavalleri JV. 2016. Vertical transmission of hepatitis C virus-like nonprimate hepacivirus in horses. *J Gen Virol* 97:e1–12.
38. Longdon B, Brockhurst MA, Russell CA, Welch JJ, Jiggins FM. 2014. The evolution and genetics of virus host shifts. *PLoS Pathog* 10:e1004395. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004395>.
39. Rossel S, Marshall F, Peters J, Pilgram T, Adams MD, O'Connor D. 2008. Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3715–3720. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709692105>.
40. Beja-Pereira A, England PR, Ferrand N, Jordan S, Bakhiet AO, Abdalla MA, Mashkour M, Jordana J, Taberlet P, Luikart G. 2004. African origins of the domestic donkey. *Science* 304:1781. <https://doi.org/10.1126/science.1096008>.
41. Kimura B, Marshall FB, Chen S, Rosenbom S, Moehlman PD, Tuross N, Sabin RC, Peters J, Barich B, Yohannes H, Kebede F, Teclai R, Beja-Pereira A, Mulligan CJ. 2011. Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:50–57. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0708>.
42. Pfaender S, Walter S, Todt D, Behrendt P, Doerrbecker J, Wolk B, Engelmann M, Gravemann U, Seltsam A, Steinmann J, Burbelo PD, Klawonn F, Feige K, Pietschmann T, Cavalleri JM, Steinmann E. 2015. Assessment of cross-species transmission of hepatitis C virus-related non-primate hepacivirus in a population of humans at high risk of exposure. *J Gen Virol* 96:2636–2642. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000208>.

43. Levi JE, Cabral SP, Nishiya A, Ferreira S, Romano CM, Polite MB, Pereira RA, Mota MA, Kutner JM. 2014. Absence of nonprimate hepacivirus-related genomes in blood donors seroreactive for hepatitis C virus displaying indeterminate blot patterns. *J Viral Hepat* 21:e164–166. <https://doi.org/10.1111/jvh.12252>.
44. Baechlein C, Fischer N, Grundhoff A, Alawi M, Indenbirken D, Postel A, Baron AL, Offinger J, Becker K, Beineke A, Rehage J, Becher P. 2015. Identification of a novel hepacivirus in domestic cattle from Germany. *J Virol* 89:7007–7015. <https://doi.org/10.1128/JVI.00534-15>.
45. Gray RR, Tanaka Y, Takebe Y, Magiorkinis G, Buskell Z, Seeff L, Alter HJ, Pybus OG. 2013. Evolutionary analysis of hepatitis C virus gene sequences from 1953. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20130168. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0168>.
46. Nyaga PN, Wiggins AD, Priester WA. 1980. Special Issue on animal and human influenzas epidemiology of equine influenza, risk by age, breed and sex. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 3:67–73. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(80\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0147-9571(80)90040-5).
47. Huang J, Zhao Y, Bai D, Shiraigol W, Li B, Yang L, Wu J, Bao W, Ren X, Jin B, Zhao Q, Li A, Bao S, Bao W, Xing Z, An A, Gao Y, Wei R, Bao Y, Bao T, Han H, Bai H, Bao Y, Zhang Y, Daidiikhuu D, Zhao W, Liu S, Ding J, Ye W, Ding F, Sun Z, Shi Y, Zhang Y, Meng H, Dugarjaviin M. 2015. Donkey genome and insight into the imprinting of fast karyotype evolution. *Sci Rep* 5:14106. <https://doi.org/10.1038/srep14106>.
48. Bukh J. 2012. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology* 142:1279–1287. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.016>.
49. Alcaide M, Rico C, Ruiz S, Soriguer R, Munoz J, Figuerola J. 2009. Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. *PLoS One* 4:e7092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007092>.
50. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
51. Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
52. Pond SL, Frost SD, Muse SV. 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21:676–679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti079>.
53. Lemey P, Kosakovsky Pond SL, Drummond AJ, Pybus OG, Shapiro B, Barroso H, Taveira N, Rambaut A. 2007. Synonymous substitution rates predict HIV disease progression as a result of underlying replication dynamics. *PLoS Comput Biol* 3:e29. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030029>.
54. Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 13:555–556.
55. Murrell B, Weaver S, Smith MD, Wertheim JO, Murrell S, Aylward A, Eren K, Pollner T, Martin DP, Smith DM, Scheffler K, Kosakovsky-Pond SL. 2015. Gene-wide identification of episodic selection. *Mol Biol Evol* 32:1365–1371. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv035>.
56. Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL, Scheffler K. 2013. FUBAR: a fast, unconstrained Bayesian approximation for inferring selection. *Mol Biol Evol* 30:1196–1205. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst030>.
57. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol* 2:e1–e7.

## CASE REPORT

Horses and other equids

# Multicentric T-cell lymphoma in a 21-year-old Tennessee walking horse mare

Fernando García-Lacy<sup>1</sup>  | Linden Craig<sup>2</sup>  | Francisco José Trigo-Tavera<sup>3</sup>  |  
 Jim Schumacher<sup>4</sup>  | Alejandro Rodríguez-Monterde<sup>5</sup> 

<sup>1</sup>National Autonomous University of Mexico, College of Veterinary Medicine (FMVZ-UNAM), Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Department of Biomedical and Diagnostic Sciences, University of Tennessee College of Veterinary Medicine, Knoxville, Tennessee, USA

<sup>3</sup>Pathology Department, National Autonomous University of Mexico, College of Veterinary Medicine, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Large Animal Clinical Sciences Department, University of Tennessee College of Veterinary Medicine, Knoxville, Tennessee, USA

<sup>5</sup>Equine Department, National Autonomous University of Mexico, College of Veterinary Medicine and Zootechnics (FMVZ-UNAM), Mexico City, Mexico

## Correspondence

Fernando García-Lacy, National Autonomous University of Mexico, College of Veterinary Medicine (FMVZ-UNAM), Mexico City, Mexico. Email: [f\\_garcialacy@hotmail.com](mailto:f_garcialacy@hotmail.com)

## Abstract

We report a 21-year-old Tennessee walking horse mare afflicted with a multicentric T-cell lymphoma. A T-cell-rich, B-cell lymphoma had been removed from the mare's left upper eyelid 4 years earlier. The owner reported that the mare had a poor appetite, difficulty swallowing and difficulty breathing while eating. Initial physical examination revealed no abnormalities. Complete blood count and serum biochemical analyses revealed lymphopenia, anaemia and elevated serum globulins. A mass arising from the base of the tongue was found and determined to be a T-cell lymphoma by histologic and immunohistochemical examination. The mare was anorexic during hospitalisation, showed signs of kidney failure, suffered severe weight loss and was consequently euthanased. During postmortem examination, a second mass, confirmed by immunohistochemical examination to be also a T-cell lymphoma, was found arising from the abdominal surface of the diaphragm. Early diagnosis of T-cell lymphoma is difficult, because affected horses display a wide variety of clinical signs.

## BACKGROUND

A 21-year-old, 463-kg Tennessee walking horse mare was admitted to the University of Tennessee's Veterinary Medical Center 1 week after it developed dysphagia and dyspnoea while eating. A T-cell-rich, B-cell lymphoma had been excised from the mare's upper eyelid 4 years previously. All procedures performed on this mare were performed according to the University of Tennessee's clinical ethical guidelines for the use of animals in research and patients and with the consent of the owner.

## Physical exam

No abnormalities were observed during physical examination, but during examination of results of complete blood count (CBC) and serum biochemical analyses, the mare was found to be lymphopenic ( $1.24 \times 10^6/\mu\text{l}$ ; reference range:  $1.5\text{--}4.3 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) and anaemic ( $5.06 \text{ RBCs}/\mu\text{l}$ ; reference range:  $6.3\text{--}9.5 \text{ RBCs}/\mu\text{l}$ ) and to have elevated serum globulins ( $5.2 \text{ g/dl}$ ; reference range:  $2.5\text{--}4.6 \text{ g/dl}$ ) and mildly elevated total serum proteins ( $7.8 \text{ g/dl}$ ; reference range:  $5.7\text{--}7.5 \text{ g/dl}$ )

(Table 1). A Coggins test, performed because the horse was anaemic, was negative.

The epiglottis was found to be deviated dorsally and rotated clockwise in a sagittal plane during endoscopic examination of the nasopharynx and larynx, and only its tip and right margin were visible (Figure 1). The epiglottis and soft palate obstructed the rima glottidis. A subepiglottic mass was observed during radiographic examination of the head (Figure 2). A large mass on the base of the tongue was identified during palpation of the epiglottis, performed with the horse sedated and its mouth opened with a full-mouth oral speculum, confirming endoscopic and radiographic findings. A sample of the mass was harvested through a ventral laryngotomy, with the horse anaesthetised and in dorsal recumbency, for histologic identification. The horse received phenylbutazone ( $2.2 \text{ mg/kg}$ , orally, every 12 hours) and trimethoprim-sulfa ( $30 \text{ mg/kg}$ , orally, every 12 hours before surgery and for 3 days after surgery).

The mare remained anorexic and developed haematuria, the cause of which was thought to be cystitis or nephritis. No tests, other than a CBC and serum biochemical analyses were performed to determine if the horse was experiencing renal failure. The results of serum biochemical analyses

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Veterinary Record Case Reports* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Veterinary Association.

showed abnormally low aspartate aminotransferase (AST: 164 U/L; reference range: 172–359 U/L), high blood urea nitrogen (BUN: 26 mg/dl; reference range: 14–24 mg/dl) and high total bilirubin (2.7 mg/dl; reference range: 0.6–1.8 mg/dl); but creatinine was normal (1 mg/dl; reference range: 0.9–1.7 mg/dl). Urinalysis indicated that the patient had haemoglobinuria and proteinuria, in addition to haematuria. The specific gravity of the urine was high (1.045; reference range: 1.012–1.035). Bloody fluid was seen exiting the left ureter during cystoscopic examination. Administration of trimethoprim-sulfa and phenylbutazone was suspended to avoid further renal damage. No abnormalities were noted during ultrasonographic examination of the kidneys.

The subepiglottic mass was a lymphoma composed of large pleomorphic lymphocytes with a background population of small lymphocytes (Figure 3). The mare had lost almost 100 kg of bodyweight by the sixth day of hospitalisation and was euthanased on the seventh day because of its deteriorating condition and poor prognosis for survival.

## Postmortem evaluation

### Macroscopic and microscopic findings

Gross findings included ascites and pleural effusion. Copious purulent exudate caused by dentoalveolar disease was within the left paranasal sinuses. A large (4 × 5 × 9 cm) cavitated mass was on the right side of the base of the tongue, causing the epiglottis to become rotated clockwise in a sagittal plane (Figure 4). A 3-cm diameter ulcer was on the left aryepiglottic fold, apparently caused by contact between the fold and the caudal edge of the soft palate.

A second mass (10 × 7 × 4 cm) was adhered to the diaphragm at the craniodorsal aspect of the abdominal cavity. Immunohistochemical examination of both masses using polyclonal antibodies (CD3 for T lymphocytes and CD79 for B lymphocytes) revealed each mass to be a T-cell lymphoma, with a background of small B lymphocytes (Figure 5a–f). The left kidney was found, during histological examination, to be affected by acute tubular necrosis, which was likely exacerbated by anorexia and dehydration and was thought to be not directly related to the lymphoma.

## CASE PRESENTATION

A T-cell-rich, B-cell lymphoma had been excised from the mare's upper eyelid 4 years previously. Owner reported that the mare had a poor appetite, difficulty swallowing and difficulty breathing while eating. Initial physical examination revealed no abnormalities. The results of CBC and serum biochemical analyses revealed lymphopenia, anaemia, and elevated serum globulins.

## INVESTIGATIONS

The epiglottis was found to be deviated dorsally and rotated clockwise in a sagittal plane during endoscopic examination of the nasopharynx and larynx, and only its tip and right margin were visible. The epiglottis and soft palate obstructed the rima glottidis. A subepiglottic mass was observed during radio-

## LEARNING POINTS/TAKE-HOME MESSAGES

- Lymphoma has no predisposition for age, breed or sex.
- Early diagnosis is crucial for successful treatment because most horses afflicted with lymphoma have a poor-to-fair prognosis for survival.
- The clinical signs of lymphoma vary and are dictated by the location of the neoplasm.
- Lymphoma can affect any organ.

graphic examination of the head. A large mass on the base of the tongue was identified during palpation of the epiglottis, performed with the horse sedated and its mouth opened with a full-mouth oral speculum, confirming endoscopic and radiographic findings. A sample of the mass was harvested through a ventral laryngotomy, with the horse anaesthetised and in dorsal recumbency, for histologic identification.

## DIFFERENTIAL DIAGNOSIS

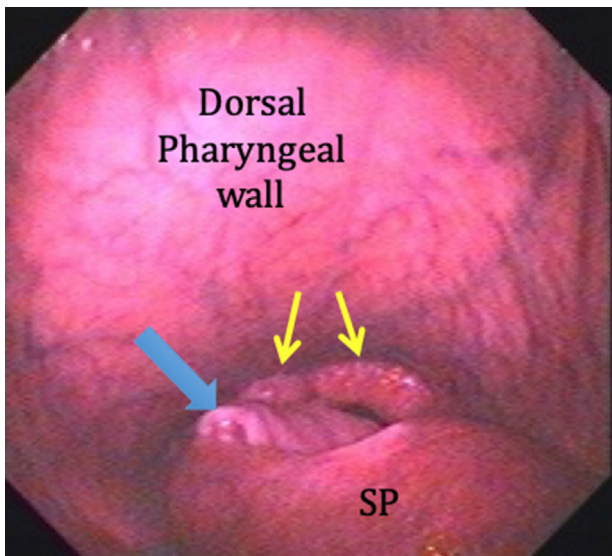
T-cell-rich, B-cell lymphoma regression on the mare's oropharynx. Laryngeal hemiplegia, abscess and/or foreign body initially. Possible renal failure after the results of CBC and serum biochemical analyses.

## TREATMENT

The horse received phenylbutazone (2.2 mg/kg, orally, every 12 hours) and trimethoprim-sulfa (30 mg/kg, orally, every 12 hours) before surgery and for 3 days after surgery. The mare developed haematuria, and the source of haemorrhage was found during cystoscopic examination to be the left kidney. Consequently, administration of phenylbutazone and trimethoprim-sulfa was suspended to avoid further renal damage.

**TABLE 1** Initial complete blood count (CBC) and blood chemistry showing macrocytic anaemia, lymphopenia and a mild elevation in total serum proteins due to an elevation of globulin concentration

Analyte	Result	Reference range	Units
Red blood cells (RBC)	5.06	6.3–9.5	cells/ $\mu$ l
Haemoglobin (Hg)	9.7	10.2–16	g/dl
Mean corpuscular volume (MCV)	55.5	42–54	fl
Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC)	34.7	35.1–37.5	g/dl
Total serum proteins	7.8	5.7–7.5	g/dl
Lymphocytes	1.24	1.5–4.3	$\times 10^6$ / $\mu$ l
Albumin	2.6	2.7–3.7	g/dl
Globulins	5.2	2.5–4.6	g/dl



**FIGURE 1** Initial endoscopic examination of the nasopharynx and larynx showing elevation of the soft palate (SP) and elevation and clockwise rotation of the epiglottis in a sagittal plane. The right margin of the epiglottis (blue arrow) is seen caudal to the caudal margin of the soft palate. The rima glottidis is hidden from view in this picture by the soft palate and the elevated epiglottis. The yellow arrows point to the corniculate processes of the arytenoid cartilage

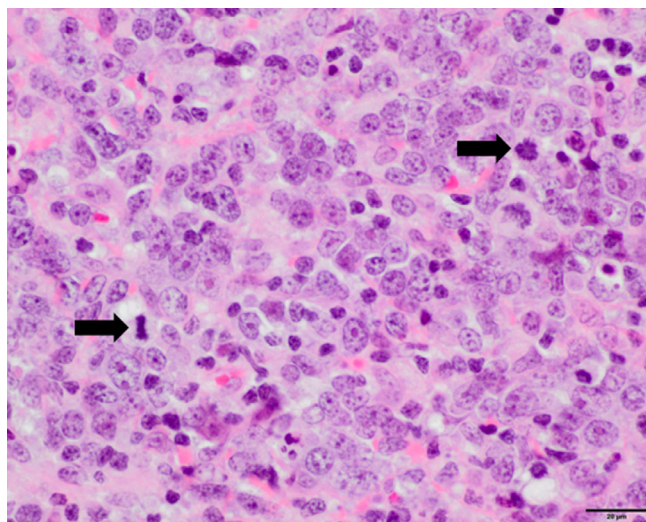


**FIGURE 2** Lateral radiograph of the skull, with the head and neck extended. Arrows show a radiopaque mass containing radiolucent areas beneath the epiglottis. Abbreviations: GP, guttural pouch; T, trachea

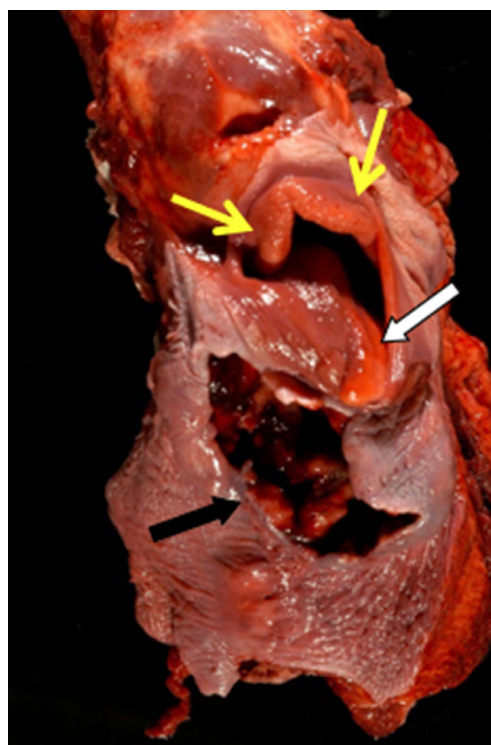
**OUTCOME AND FOLLOW-UP**

The mare remained anorexic and developed haematuria. The results of CBC and serum biochemical analyses showed abnormally low AST (164 U/L; reference range: 172–359 U/L), high BUN (26 mg/dl; reference range: 14–24 mg/dl), high total bilirubin (2.7 mg/dl; reference range: 0.6–1.8 mg/dl) and normal creatinine (1.6 mg/dl; reference range: 0.9–1.7 mg/dl). Urinalysis indicated that the patient had haemoglobinuria and proteinuria. The specific gravity of the urine was high (1.045; reference range: 1.012–1.035). Bloody fluid was seen exiting the left ureter during cystoscopic examination. No abnormalities were noted during ultrasonographic examination of the kidneys.

The mare was administered phenylbutazone and trimethoprim-sulfa before and after surgery, but when

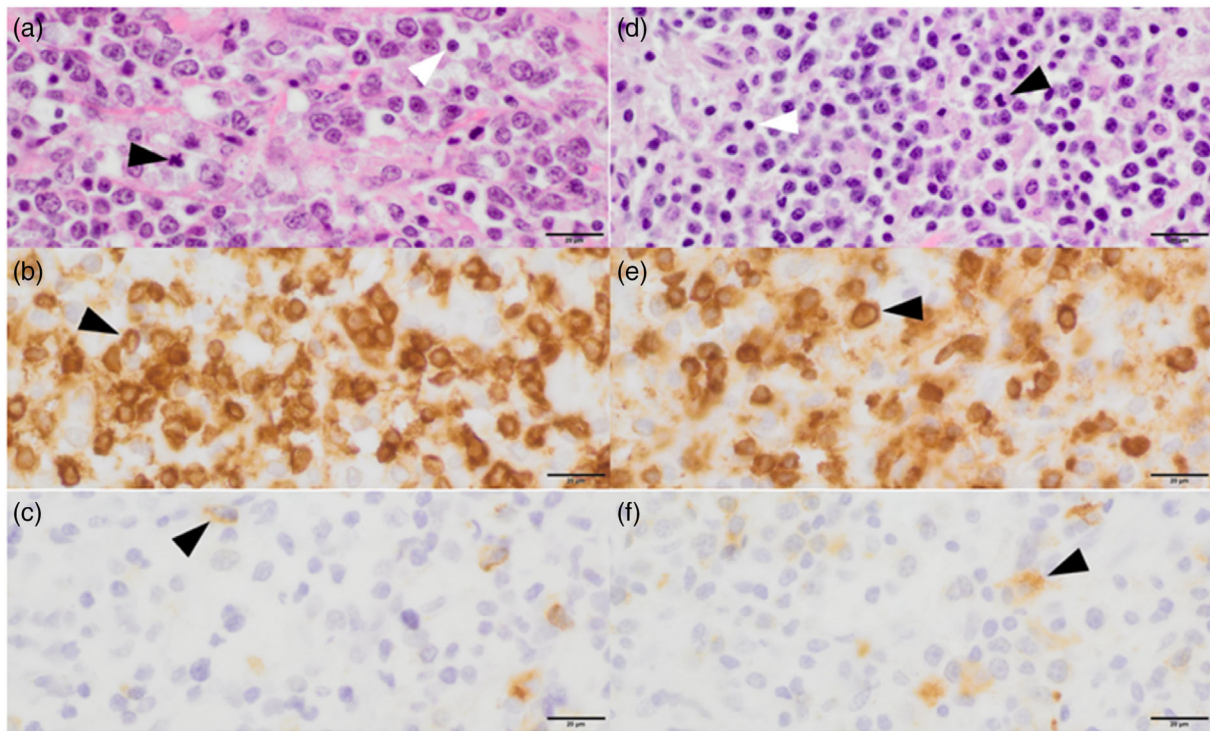


**FIGURE 3** Photomicrograph of a surgically obtained biopsy of the subepiglottic mass in which most of the lymphocytes have features of malignancy, such as anisokaryosis, multiple nucleoli and frequent mitotic figures (arrows). There is also a population of small lymphocytes in the background (haematoxylin and eosin, 600×)



**FIGURE 4** Dorsal view (postmortem) of a large multinodular, firm, cavitated mass (black arrow) on the base of the tongue beneath the epiglottis (white arrow); the corniculate processes of the arytenoid cartilages are normal in appearance (yellow arrows)

the mare developed haematuria, administration of both drugs was suspended. The cause of haematuria was thought to be renal damage, but no tests were performed to confirm or exclude the diagnosis of kidney failure. Such tests could have included determination of fractional excretion of electrolytes, serial determination of specific gravity of urine while the mare received fluid therapy, and determination of the albumin-creatinine ratio of the urine. Azotaemia was most likely pre-renal because the serum concentration of creatinine was normal during examination of the last biochemical analyses.



**FIGURE 5** Sections of the mass from the epiglottis (a–c: better preserved) and diaphragm (d–f: more autolysed). Haematoxylin and eosin-stained sections (a and d) show that the majority of round cells have features of malignancy (black arrowhead), with a background of small lymphocytes (white arrowhead). Immunohistochemistry for CD3 (b and e) and CD79 (c and f) show that the majority of the cells are T lymphocytes (black arrowhead) and that the smaller background cells are B lymphocytes (white arrowhead)

Acute tubular necrosis was diagnosed during postmortem examination.

The subepiglottic mass was found to be a lymphoma during histologic examination of the tissue that was removed from the mass. The mare had lost almost 100 kg of bodyweight by the sixth day of hospitalisation and was euthanased on the seventh day because of its deteriorating condition and poor prognosis for survival.

## DISCUSSION

Lymphoma, often also referred to as lymphosarcoma or malignant lymphoma, is the most common type of haemolymphatic neoplasm of the horse and is the neoplasm most likely to metastasise.<sup>1</sup> The correct term for this neoplasm is lymphoma, rather than lymphosarcoma, because this neoplasm has no benign form.<sup>2</sup> Lymphoma can occur in horses of any age, but horses between 5 and 10 years old are most commonly affected.<sup>1,3</sup> It has been found in a fetus and in horses 25 years old or older. Lymphoma has no sex or breed predilection.<sup>4</sup> The incidence of lymphoma in horses remains unknown, but the prevalence of lymphoma is 2%–5%.<sup>5</sup> Lymphoblastic neoplasms of animals are among the most aggressive of all neoplasms, and the survival time of affected animals ranges from weeks to months after diagnosis.<sup>6</sup>

Lymphomas of human beings have been associated with viral (herpesvirus and retrovirus) or bacterial infection (e.g., *Corynebacterium* spp.), but lymphomas have not been induced experimentally by infecting horses with these pathogens.<sup>6–8</sup> One case report described the presence of viral-like lesions on an enlarged abdominal lymph node of a dead, newborn foal affected with primary hepatic lymphoma,<sup>7</sup> and

another described the presence of EHV-5 on T-cell-rich, B-cell lymphomas found in the submandibular lymph nodes of a mare.<sup>8</sup>

## Classification

The classification of lymphomas in humans is complex and has been based on biological behaviour or morphologic, immunophenotypic, molecular or clinical features.<sup>9</sup> Van den Hoven and Franklen divided lymphoma found in horses into five forms: multicentric (the form displayed by the mare we report), cutaneous, mediastinal, gastrointestinal and miscellaneous.<sup>10</sup> Taintor and Schleis reported a similar basic classification that included the following five types of lymphoma: multicentric, cutaneous, mediastinal, alimentary (intestinal) and solitary.<sup>11</sup> Aburto provided a more complete classification of lymphoma in animals (see Figure 6).<sup>12</sup>

## Clinical signs

The clinical signs of lymphoma vary and are dictated by the location of the neoplasm. The most common clinical signs displayed by affected horses, irrespective of the location of the lesion, are chronic weight loss, subcutaneous oedema at the ventral aspect of the abdomen and regional lymphadenomegaly.<sup>13</sup>

Horses with the multicentric form of lymphoma have lesions in various organs, such as the ovary, muscle, bladder and spinal cord. Clinical signs displayed by affected horses are related to the organ or organs in which the lymphoma resides.<sup>14</sup>



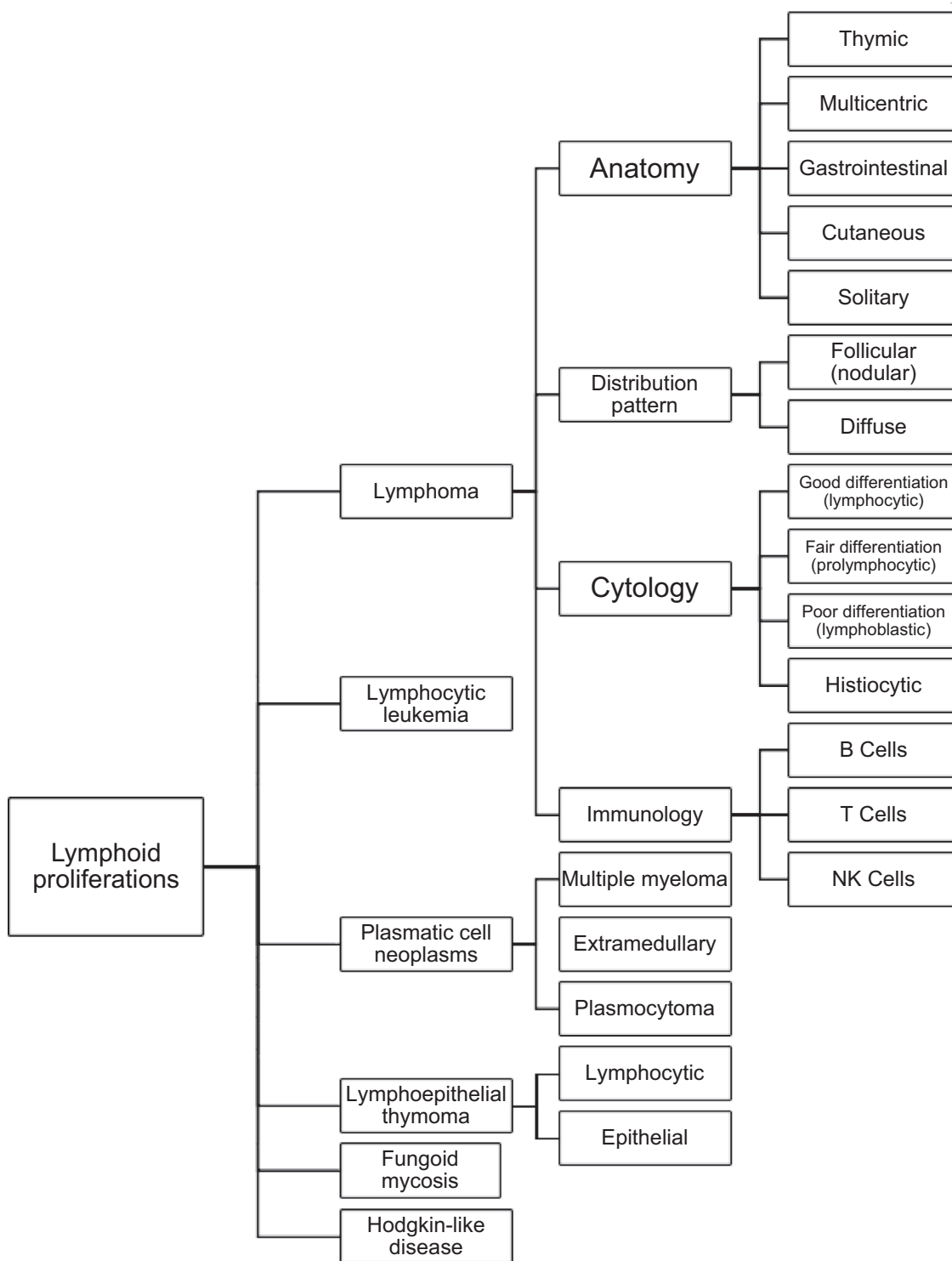


FIGURE 6 Veterinary classification of lymphoid proliferations (Aburto 2002)

Horses affected with the gastrointestinal form of lymphoma often develop diarrhoea, frequently experience rapid weight loss and display signs of colic. The results of carbohydrate absorption tests often show poor absorption of glucose or xylose, suggesting that the mucosal surface available for absorption of carbohydrates is reduced. The small intestine, which is the most commonly affected part of the gastrointestinal tract, develops villous atrophy and extensive mucosal or transmural infiltration of the neoplasm, resulting in weight loss and hypoproteinaemia.<sup>15</sup> An enlarged

spleen and abdominal masses can be palpated per rectum or seen during transabdominal or transrectal ultrasonographic examination of the abdomen. Neoplastic lymphocytes are often found during cytologic evaluation of peritoneal fluid.<sup>13</sup>

Cutaneous lymphoma appears in two forms: an epitheliotropic form, also known as mycosis fungoides, and a non-epitheliotropic form. The epitheliotropic form is characterised by infiltration of T cells into the epithelium, resulting in multifocal exfoliative dermatitis, alopecia, cutaneous ulcers

and scabs and varying degrees of pruritus. Horses with the epitheliotropic form of cutaneous lymphoma have a poor prognosis for survival. Non-epitheliotropic lymphomas are generally T-cell rich, giant B-cell lymphomas, which are also known as pseudolymphomas.<sup>16</sup> Horses having a non-epitheliotropic lymphoma usually have a good prognosis for survival when treated appropriately.

Multiple subcutaneous nodular lesions are often seen with the cutaneous form of lymphoma.<sup>16</sup> These nodules grow slowly, and occasionally, spontaneously reduce in size or even disappear permanently.

Progesterone receptors were found on the surface of lymphocytes of metastatic, cutaneous T-cell-rich, B-cell lymphomas of a mare that had a granulosa-theca cell tumour on an ovary.<sup>16</sup> The mare's cutaneous lesions diminished in size when both ovaries were removed, suggesting that the rate of growth of some cutaneous lymphomas may be hormonally influenced.

The most common clinical signs of disease displayed by horses with pharyngeal or laryngeal lymphoma are abnormal nasal discharge, coughing while eating and dysphagia.<sup>13</sup> The most common clinical signs of disease displayed by horses with ocular lymphoma are uveitis and the presence of a mass on the palpebral conjunctiva or corneoscleral junction. A retrobulbar lesion may cause the eye to protrude.

## Laboratory findings

The most common haematological and biochemical abnormalities associated with the presence of a lymphoma are changes associated with chronic inflammation, such as leukocytosis with neutrophilia, regenerative anaemia and high concentrations of albumin and fibrinogen in the serum. Some affected horses develop leukaemia, with circulating immature lymphocytes comprising 30%–50% of the total white blood cells.<sup>17,18</sup> Affected horses, especially those with the gastrointestinal form of lymphoma, have a low concentration of total protein in the serum and a low albumin–globulin ratio. A slight elevation of hepatic enzymes may be seen if the liver is affected.<sup>19</sup> Para-neoplastic signs associated with lymphoma include hypercalcaemia, pseudohyperparathyroidism, polyuria, polydipsia and multifocal eosinophilic epitheliotropic disease.<sup>20,21</sup> Many of the biochemical and haematological abnormalities observed in the patients in this report, such as high BUN, haemoglobinuria and proteinuria, were likely the result of co-morbidities, such as renal disease (acute tubular necrosis). Chronic dental disease was a postmortem examination finding and was unlikely to be responsible for the clinical signs displayed by the mare while the mare was hospitalised.

Horses having an immunodeficiency, such as selective deficiency of immunoglobulin M (IgM), seen primarily in Arabian horses and American quarter horses, may develop lymphoma, in which case the immunodeficiency is said to be a leukoproliferative, disease-associated immunodeficiency.<sup>22</sup> Horses with IgM deficiency may display one of two arrays of clinical signs. Horses affected with one form of IgM deficiency are 2–8 months old and develop severe pneumonia, arthritis and enteritis, with or without septicaemia. Horses with the other form are 2 and 5 years old and are more

prone to develop lymphoma. IgM deficiency is presumed to be a secondary immunodeficiency. These horses often develop external and/or internal lymphadenopathy.<sup>22</sup>

## Diagnosis

The diagnosis of lymphoma is based primarily on the histologic examination of lesions. When a tumour is difficult to biopsy, as in this case due to its anatomic position, antemortem diagnosis is challenging. Diagnostic imaging of the thorax and abdomen and cytological evaluation of pleural or peritoneal fluid may be helpful in the diagnosis of lymphoma.<sup>13,23,24</sup> Siegers et al. reported a Belgian mare suffering from lethargy, anorexia, ptialism, weight loss and ventral oedema caused by multicentric lymphoma. An accumulation of pleural fluid and a large abdominal mass were found during ultrasonographic examination of the thorax and abdomen, and neoplastic cells were found during cytological examination of pleural fluid obtained by centesis.<sup>24</sup> The mare that we report here, however, displayed no clinical signs to justify diagnostic imaging of the thorax and abdomen or cytological examination of pleural or peritoneal fluid. The diagnosis of lymphoma is confirmed at postmortem examination when an antemortem biopsy for histologic or cytologic evaluation cannot be obtained.<sup>25</sup>

A horse having a history of being treated successfully for lymphoma, as did the mare of this report, should be examined carefully for evidence of recrudescence of lymphoma.

## Treatment

The most effective treatment of horses suffering from lymphoma is excision of lesions, but horses with lesions difficult to access for excision can sometimes be successfully treated medically. Treating this mare chemotherapeutically was not possible due to financial constraints imposed by the owner of the mare, but clinicians should be aware of the various chemotherapeutic therapies and the outcome of horses that have received these therapies.

A 12-year-old American quarter horse mare with T-cell-rich, B-cell lymphomas, infiltrated with the EHV-5 virus found in the submandibular lymph nodes, was treated by excision of the submandibular lymph nodes and administration of chemotherapy.<sup>8</sup> The chemotherapeutic regimen consisted of the following drugs: cyclophosphamide (200 mg/m<sup>2</sup>, intravenous [IV]) administered twice, at a 21-day interval; vincristine (0.5 mg/m<sup>2</sup>, IV) administered thrice, the first two doses at a 7-day interval, and the third at 14 days after the second dose; dexamethasone (0.04 mg/kg, orally, on Day 1 and 0.02 mg/kg, orally, from Day 2 and until Day 30, when chemotherapy was discontinued). Although the mass was in remission at the end of therapy and appeared healthy, lymphoma was discovered 1 month after cessation of chemotherapy during cytological examination of an aspirate of the submandibular region. Seven months after that examination, when masses in the submandibular area were found to have increased in size, antiviral therapy with acyclovir (20 mg/kg, orally, every 8 hours) was initiated and administered for 4 months. One month after treatment with acyclovir was completed, no neoplastic cells were found during

cytological examination of an aspirate of the submandibular area, even though the size of the masses remained unchanged. The mare was healthy and in foal 1 year later, although the size of the submandibular lymph nodes remained unchanged.

A 4-year-old Oldenburg mare with solitary thoracic lymphoma was successfully treated by administering cytarabine (170 mg/m<sup>2</sup>, intramuscular [IM]) twice, with a 14-day interval between administrations, followed by administration of cyclophosphamide (142 mg/m<sup>2</sup>, IV) twice, with a 14-day interval between administrations, followed by administration of prednisolone (86 mg/m<sup>2</sup>, orally, every 48 hours) for the rest of the mare's life.<sup>26</sup> At the time of follow-up examination, 8 months after discharge, the mare had complete remission of clinical signs of disease and had returned to its previous athletic activity.

The authors of a retrospective evaluation of the clinical outcome of 15 horses administered a five-, four-, three-, two- or one-drug chemotherapeutic protocol for lymphoma reported that five horses experienced complete remission of clinical signs, nine had partial response and one achieved stable disease.<sup>27</sup> The chemotherapeutic drugs administered included doxorubicin (35–70 mg/m<sup>2</sup>, IV), vincristine (0.55–0.7 mg/m<sup>2</sup>, IV), L-asparaginase (10,000 U/m<sup>2</sup>, subcutaneously), cyclophosphamide (150–800 mg/m<sup>2</sup>, IV), cytosine arabinoside (175–250 mg/m<sup>2</sup>, IV) and lomustine (65 mg/m<sup>2</sup>, intragastrically). Intervals between administration of the chemotherapeutic drugs were influenced by the drugs administered and ranged from 7 to 30 days. Twelve of the 15 horses also received corticosteroids. All 12 patients received prednisolone (0.5 mg/kg, orally, every 12–24 hours), and two also received dexamethasone (0.05–0.1 mg/kg, IV or orally, every 12 hours). The influence of corticosteroid treatment on outcome could not be determined.

Another regimen used successfully to treat a horse for the cutaneous form of lymphoma (type unspecified), with multifocal skin lesions, was administration of megestrol acetate (0.2 mg/kg, orally, once daily) for 8 days, coupled with excision of one of two large lesions and a single intralesional injection of betamethasone (20 mg) into the other large lesion.<sup>28</sup> The cutaneous masses were reduced in size and softened while the horse received this treatment. The horse had no cutaneous lesions when it returned to its previous level of work 6 weeks after treatment. The horse was euthanased because it developed exercise-related epistaxis 4.5 months after treatment; the cause of epistaxis was not investigated.<sup>28</sup>

The most common side effects of chemotherapy used to treat horses for neoplasia are anorexia, lethargy, colic, laminitis, nephrotoxicity and thrombosis at the site of intravenous administration, damage to bone marrow, immunosuppression and allergic reaction.<sup>26,29</sup> Other, less common, adverse side effects of chemotherapy include alopecia, lethargy, oedema of the limbs and neurotoxicity. Luethy et al. found, in a retrospective study, that four out of seven horses that received doxorubicin for treatment of lymphoma developed adverse reactions, including tachycardia (>70 beats per minute), fever (>38.6°C), increased plasma concentration of cardiac troponin I (0.81 ng/ml; reference range: 0.00–0.07 ng/ml) and hypersensitivity reactions.<sup>27</sup> One horse developed tachycardia (80 beats per minute) and fever (39.3°C) 2 hours after being administered doxorubicin and died 18 hours after administration from pulmonary oedema.<sup>27</sup>

## Prognosis

Most horses afflicted with lymphoma have a poor-to-fair prognosis for survival.<sup>29</sup> Outcome is largely dependent on the location of the lesion and early detection of the disease. Lymphoma often metastasises by the time the disease is recognised, and most horses with lymphoma die within 6 months of the onset of clinical signs.<sup>13,29</sup>

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare they have no conflicts of interest.

## FUNDING INFORMATION

All funding was provided by the University of Tennessee College of Veterinary Medicine, Large Animal Clinical Sciences Department and Department of Biomedical and Diagnostic Sciences.

## ETHICS STATEMENT

All procedures performed on this particular mare were done according to the University of Tennessee's clinical ethical guidelines for the use of animals in research and with the consent of the owner.


## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Fernando García-Lacy: manuscript writing, clinical assessment (treatments), postmortem examination and literature analysis. Linden Craig: pathology (postmortem examination, histopathologic and immunohistochemical analysis) and manuscript preparation. Francisco José Trigo-Tavera: pathology assessment and manuscript preparation. Jim Schumacher: surgical and clinical assessment and manuscript preparation. Alejandro Rodríguez-Monterde: clinical, surgical and pathology assessment and manuscript preparation.

## ORCID

Fernando García-Lacy  <https://orcid.org/0000-0003-3787-736X>

Linden Craig  <https://orcid.org/0000-0003-0013-7544>

Francisco José Trigo-Tavera  <https://orcid.org/0000-0003-1855-2252>

Jim Schumacher  <https://orcid.org/0000-0002-0073-5897>

Alejandro Rodríguez-Monterde  <https://orcid.org/0000-0001-9409-528X>

## REFERENCES

- Rhind SM, Dixon PM. T-cell/rich B-cell lymphosarcoma (LSA) in the tongue of a horse. *Vet Rec.* 1999;145:554–5.
- East LM, Savage DJ. Abdominal neoplasia (excluding urogenital tract). *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1998;14:475–93.
- Meyer J, DeLay J, Bienzle D. Clinical, laboratory and histopathologic features of equine lymphoma. *Vet Pathol.* 1998;43:914–24.
- Haley PJ, Spraker T. Lymphosarcoma in an aborted equine fetus. *Vet Pathol.* 1983;20:647–9.
- Baker J, Ellis C. A survey of postmortem findings in 480 horses, 1958–1980. *Equine Vet J.* 1985;13:43–6.
- Jacobs RM, Messick JB, Valli VE. Tumors of the hemolymphatic system. In: Meuten DJ, editor. *Tumors in domestic animals.* 5th ed. Iowa: Iowa State Press; 2017.
- Tomlinson MJ, Doster AR, Wright ER. Lymphosarcoma with virus-like particles in a neonatal foal. *Vet Pathol.* 1979;16:629–31.
- Van der Werf K, Davis E. Disease remission in a horse with EHV-5-associated lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2013;27:387–9.
- Mihm MC, Magro CM, Crowson AN. Introduction of the classification of lymphoma. In: Magro CM, Crowson AN, Mihm MC,

- editors. The cutaneous lymphoid proliferations. A comprehensive text-book of lymphocytic infiltrates of the skin. 2nd ed. New Jersey, USA: Wiley-Blackwell; 2016.
10. Van den Hoven R, Franklen P. Clinical aspects of lymphosarcoma in the horse: a clinical report of 16 cases. *Equine Vet J*. 1983;15:49–53.
  11. Taintor J, Schleis S. Equine lymphoma. *Equine Vet Educ*. 2011;23:205–13.
  12. Aburto EM. Sistema hemolinfático. In: Trigo FJ, editor. *Patología sistémica veterinaria*. 3rd ed. Mexico City: McGraw-Hill Interamericana; 1998.
  13. Sellon DC. Disorders of the hematopoietic system. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, editors. *Equine internal medicine*. 2nd ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier; 2004.
  14. Haley PJ, Spraker T. Lymphosarcoma in an aborted fetus. *Vet Pathol*. 1983;20(5):657–9.
  15. Elce YA. Neoplastic disease of the gastrointestinal tract. In: Robinson NE, Sprayberry KA, editors. *Current therapy in equine medicine*. 6th ed. St. Louis Missouri, USA: Saunders Elsevier; 2009.
  16. Henson KL, Alleman AR, Cutler TJ, Ginn PE, Kelley LC. Regression of subcutaneous lymphoma following removal of an ovarian granulosa cell tumor in a horse. *J Am Vet Med Assoc*. 1998;212:1419–22.
  17. Madewell BR, Carlson GP, MacLachlan NJ, Feldman BF. Lymphosarcoma with leukemia in a horse. *Am L Vet Res*. 1982;43:807–12.
  18. Raidal SL, Clark P, Raidal SR. Angiotrophic T-cell lymphoma as a cause of regenerative anemia in a horse. *J Vet Intern Med*. 2006;20:1009–13.
  19. Jacobs RM, Kociba GJ, Ruoff WW. Monoclonal gammopathy in a horse with defective hemostasis. *Vet Pathol*. 1983;20:643–7.
  20. Marr CM, Love S, Pirie HM. Clinical ultrasonographic and pathological findings in a horse with splenic lymphosarcoma and pseudohyperparathyroidism. *Equine Vet J*. 1989;21:221–6.
  21. Duckett WM, Matthews HK. Hypereosinophilia in a horse with intestinal lymphosarcoma. *Can Vet J*. 1997;38:719–20.
  22. Lunn P, Horohov DW. The equine immune system. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, editors. *Equine internal medicine*. 2nd ed. St. Louis Missouri, USA: Saunders-Elsevier; 2004.
  23. Mair TS, Lane JG, Laucke VM. Clinicopathological features of lymphosarcoma involving the thoracic cavity in the horse. *Equine Vet J*. 1985;17:428–33.
  24. Siegers EW, Oosterbaan MM, van den Wollenberg L, Jansen S, Teske E, Ankring N, et al. Advanced multicentric lymphoma in a Belgian Draft Horse mare. *Pferdeheilkunde*. 2017;33:30–6.
  25. Mackey VS, Wheat JD. Reflections on the diagnostic approach to multicentric lymphosarcoma in an aged Arabian mare. *Equine Vet J*. 1985;17:467–9.
  26. Saulez MN, Schlipf JW, Cebra CK, McDonough SP, Bird KE. Use of chemotherapy for treatment of a mixed-cell thoracic lymphoma in a horse. *J Am Vet Med Assoc*. 2004;224:733–8.
  27. Luethy D, Frimberger AE, Bedenice D, Byrne BS, Groover ES, Gardner RB, et al. Retrospective evaluation of clinical outcome after chemotherapy for lymphoma in 15 equids (1991–2017). *J Vet Intern Med*. 2019;33:953–60.
  28. Littlewood JD, Whitwell KE, Day M. Equine cutaneous lymphoma: a case report. *Vet Dermatol*. 1995;6:105–11.
  29. Aleman M, Watson JL. Lymphoma in horses. In: Smith BP, editor. *Large animal internal medicine*. 5th ed. Maryland Heights Missouri, USA: Mosby; 2002.

**How to cite this article:** García-Lacy F, Craig L, Trigo-Tavera FJ, Schumacher J, Rodríguez-Monterde A. Multicentric T-cell lymphoma in a 21-year-old Tennessee walking horse mare. *Vet Rec Case Rep*. 2022;e441. <https://doi.org/10.1002/vrc2.441>