

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

DOTTORATO DI RICERCA IN  
ORTOPEDIA DEGLI ANIMALI DOMESTICI  
Ciclo XXII

OSTEOCONDROSI NELLA SPECIE EQUINA:  
NUOVE PROSPETTIVE DI STUDIO PER  
L'INDIVIDUAZIONE DI MARKERS PROTEICI  
NEL LIQUIDO SINOVIALE  
MEDIANTE ANALISI PROTEOMICA

Coordinatore  
Chiar.mo Prof. Maurizio Del Bue

Tutor  
Chiar.mo Prof. Franco Moriconi

Dottorando: Dr. Vincenzo Maria Masi

ANNI ACCADEMICI 2007-2009

*Dedico questo lavoro  
a mia  
Nonna Vita e alla mia Famiglia.  
Vincenzo Maria*

# INDICE

<b>SUMMARY</b>	<b>pg.1</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<b>CAPITOLO 1: OSTEOCONDROSI</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Processo di Ossificazione Endocondrale</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Canali vascolari cartilaginei</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Morfologia delle lesioni osteocondrotiche</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Eziopatogenesi</b>	<b>17</b>
- Ereditarietà	<b>18</b>
- Rapido accrescimento, alimentazioni e fattori ormonali	<b>19</b>
- Eventi traumatici ed esercizio	<b>23</b>
- Fattori ischemici	<b>25</b>
<b>1.5 Ricerca di markers molecolari riferibili ad Osteocondrosi</b>	<b>27</b>
<b>CAPITOLO 2: ANALISI PROTEOMICA</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Elettroforesi bidimensionale</b>	<b>34</b>
- Isoelettrofocalizzazione	<b>34</b>
- SDS - page	<b>36</b>
<b>2.2 Analisi densitometrica dei gel</b>	<b>36</b>
<b>2.3 Spettrometria di Massa</b>	<b>37</b>
<b>2.4 Analisi Proteomica applicata allo studio delle</b>	<b>38</b>

<b>CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI</b>	<b>43</b>
<b>Materiali</b>	<b>43</b>
<b>Metodi</b>	<b>43</b>
- Selezione dei pazienti e campionamento del liquido sinoviale	<b>45</b>
- Preparazione del campione	<b>45</b>
- Dosaggio delle proteine	<b>45</b>
- Precipitazione	<b>45</b>
- Prima dimensione – Focalizzazione Isoelettrica	<b>45</b>
- Equilibratura	<b>46</b>
- Seconda dimensione – SDS-page	<b>46</b>
- Analisi delle immagini	<b>46</b>
- Analisi statistica	<b>48</b>
- Analisi degli spot mediante Spettrometria di Massa	<b>48</b>
<b>CAPITOLO 4: RISULTATI</b>	<b>49</b>
<b>CAPITOLO 5: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI</b>	<b>59</b>
- Discussioni	<b>59</b>
- Conclusioni	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>77</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>89</b>

## SUMMARY

Osteochondrosis is a pathology of significant interest within equine medicine. Its significant incidence, its clinical manifestation in young horses, the potentially negative influence on the performance of equine athletes and the predisposing role with respect to the insurgence of osteoarthritis are all underlying reasons for the significant scientific attention provided to this disease in view of both animal welfare and economic implications.

Several clinical and experimental trials, both *in-vivo* and *in-vitro*, have been devoted to the understanding of the etiopathogenesis of osteochondrosis in order to indentify appropriate diagnostic paths, nutritional regimes, preventive management protocols as well as medical and surgical therapies. Despite all this, the achievement of some of these objectives, such as the definition of a diagnostic protocol and an approach for surgical treatment, offers a pragmatic compromise which only allows partial management of the disease.

Results so far obtained feature significant limitations as the pathology has not yet been approached in a comprehensive manner given the limited understanding of its etiology and pathogenesis. To date, osteochondrosis is defined as a focal defect in endochondral ossification with multifactoral etiology, despite the fact that a possible primary mechanism, while not yet understood, is not yet excluded.

The present research is aimed to explore osteochondrosis through the lens of proteomic analysis, following the identification of changes in the protein patterns of synovial fluid of affected horses. In human medicine, proteomic analysis is continuously extending its areas of application and significantly contributed to the

understanding of the molecular processes that regulate the physiology of many organs and tissues, the clarification of several pathogenetic mechanisms and the identifications of diagnostic and prognostic biomarkers. The usefulness of proteomic analysis in approaching joint pathologies is witnessed by several studies that aimed to the determination of total protein expression in healthy joints as well as those affected by either osteoarthritis or rheumatoid arthritis. The differential analysis of the samples from healthy and pathological synovial fluids highlighted modifications which were possibly related to metabolic alterations induced by the ossification process, the cartilaginous turn-over and the parallel presence of secondary inflammation.

In conclusion, it is possible to state, on the basis of both the results here obtained and the current state of the art, that the complexity of the etiopathogenesis of osteochondrosis is difficult to explore. However, the combination of clinical trials with new laboratory methodologies could possibly offer a more comprehensive picture of the mechanisms at play in the course of the pathology, generate useful data for the identification of early diagnostic markers and advance the understanding of the etiopathogenesis of the disease. The pursuit of these ambitious objectives could possibly lead to approaching the disease with more systematic and effective preventive and therapeutic protocols.

## **RIASSUNTO**

L'Osteocondrosi è un patologia di rilevante interesse nella medicina veterinaria ippiatrica. La sua elevata incidenza, la sua manifestazione clinica in animali giovani, il potenziale ruolo invalidante nei confronti della carriera agonistica dei soggetti atleti e l'azione predisponente all'insorgenza di osteoartrite rappresentano i presupposti delle attenzioni scientifiche rivolte alla patologia con interesse sia per la salute dell'animale sia per l'ambito economico.

Molti studi di tipo clinico e sperimentale, in vivo e in vitro, sono stati dedicati alla comprensione dell'eziopatogenesi dell'Osteocondrosi ai fini di istituire iter diagnostici, regimi nutrizionali e di management preventivi e approcci terapeutici medici e chirurgici; tuttavia, il parziale raggiungimento di alcuni di questi obiettivi, come l'istituzione del protocollo diagnostico e per trattamento chirurgico, rappresenta un compromesso pragmatico, in grado di garantire una gestione parziale dell'entità patologica. Nei risultati ottenuti vanno identificati dei limiti, infatti, la patologia non è stata ancora approcciata in maniera completa a causa della parziale conoscenza dei fattori eziologici e dell'evoluzione patogenetica. Ad oggi l'Osteocondrosi viene definita come un difetto focale dell'ossificazione endocondrale ad eziologica multifattoriale; seppur non venga esclusa l'esistenza di un meccanismo primario, ancora non noto.

Questo studio è volto ad approcciare l'Osteocondrosi mediante l'analisi proteomica, secondo l'indagine delle modificazioni del pattern proteico nel liquido sinoviale di cavalli affetti dalla patologia.

Nella medicina umana l'analisi proteomica ha permesso di comprendere i processi molecolari alla base della fisiologia di tessuti organi così come la patogenesi di diverse malattie fino alla candidatura di alcune molecole come marker diagnostici e prognostici. Nello studio delle patologie articolari, l'approccio proteomico ha prodotto la descrizione del pattern proteico espresso in maniera differenziale in articolazioni affette da osteoartrite ed artrite reumatoide.

Nella ricerca condotta, l'analisi differenziale dei gel provenienti da liquidi sinoviali sani e patologici ha evidenziato modificazioni riferibili ad alterazioni metaboliche associate ai processi di ossificazione, al turnover del tessuto cartilagineo e alla concomitanza di un processo flogistico secondario.

Infine è possibile affermare che la complessità del processo eziopatogenetico alla base dell'Osteocondrosi rappresenta una materia di difficile investigazione; tuttavia, la coordinazione di studi clinici con nuove tecniche di indagine di laboratorio potrebbe fornire un quadro più completo circa i meccanismi in atto nel corso della patologia, generando dati utili per la candidatura di marker diagnostici precoci e per la comprensione dell'eziopatogenesi dell'Osteocondrosi, così da poter approcciare la malattia in maniera sistematica sia con protocolli preventivi che terapeutici.

## **INTRODUZIONE**

L'Osteocondrosi è una delle patologie ortopediche più comuni nel cavallo e riveste un ruolo rilevante nella clinica equina. Colpendo con elevata incidenza le articolazioni diartroidali, dal 10% al 25% secondo distinzioni di razza (Henson, 1997), causa una riduzione della performance atletica, risultando talvolta limitante per la carriera agonistica (Ytrehus, 2007) e motivando i numerosi studi condotti sulla specie equina.

Il primo caso di Osteocondrosi riportato in questa specie risale al 1947, descritto a livello dell'articolazione della grassella (Nilsson, 1947); nel 1991, Jeffcott ha presentato in un lavoro bibliografico l'esistenza di 150 report della patologia nella specie in esame. Fin dall'inizio, nel percorso scientifico seguito per lo studio della patologia, molti lavori sono stati prodotti circa l'approccio diagnostico e terapeutico condotto nei suoi confronti (Hoppe, 1984; Laws, 1993; Dik, 1999; van Grevenhof, 2009); da un paio di decenni l'attenzione è stata rivolta verso l'identificazione dei fattori eziologici e dei meccanismi fisiopatogenetici alla base della turba dell'ossificazione. Ad oggi, resta tuttavia da chiarire un'ampia varietà di aspetti in questo ambito, al fine di istituire protocolli profilattici standardizzati per la riduzione della sua incidenza ed approcciare la patologia in maniera determinata con utili riscontri per il mercato equestre.

Recentemente l'integrazione di diverse tecniche di indagine biochimica, quali ELISA ed immunoistochimica, con tecniche laboratoristiche in vivo e in vitro applicate su campioni di cartilagine sana ed affetta da Osteocondrosi ha permesso l'identificazione di numerosi meccanismi potenzialmente effettori delle alterazioni

morfo-funzionali associate alla patologia. Tali meccanismi sono risultati riconducibili all'intervento di fattori di crescita, a processi degradativi mediati da enzimi litici e ad alterazioni della composizione della matrice extracellulare e del processo di maturazione condrocitaria.

Il recente sviluppo dell'analisi proteomica per lo studio delle patologie nella medicina umana ha permesso, rispetto ad una classica indagine biochimica caratterizzante le singole proteine, la descrizione di complessi sistemi proteici, dinamici ed interattivi, consentendo l'esecuzione di un esame globale e non più specifico e selettivo.

Questa peculiarità risulta particolarmente importante in studi che si propongono di identificare proteine, i cui livelli di espressione sono alterati in matrici patologiche, per l'individuazione di nuovi marcatori diagnostici o bersagli terapeutici. E' ormai acquisito che molte patologie sono di origine poligenica, pertanto la predittività di protocolli diagnostici basati sul dosaggio di un singolo marker risultano inadeguati soprattutto per una diagnosi precoce.

Queste potenzialità, l'utilizzo di metodiche sempre più sensibili e specifiche e l'evoluzione della bioinformatica hanno favorito l'enorme sviluppo che la proteomica ha registrato nell'ultimo decennio. In medicina umana, in particolare, le sue applicazioni sono in continua crescita ed hanno contribuito all'identificazione di biomarkers diagnostici e prognostici, alcuni dei quali sono ormai utilizzati nella routine clinica.

In virtù delle molteplici applicazioni che questa metodica offre al medico veterinario, questo lavoro di tesi nasce con l'intento di studiare l'Osteocondrosi mediante applicazione dell'analisi proteomica su campioni di liquido sinoviale da

articolazioni di cavalli affetti dalla patologia, al fine di identificarne i pattern proteici. Nella specie umana, l'applicazione della proteomica alle patologie osteoarticolari, come l'osteoartrite ha messo in evidenza rilevanti modificazioni quali-quantitative dei profili proteici dei tessuti articolari.

L'impiego di queste metodiche potrebbe perciò risultare di particolare utilità per la caratterizzazione delle proteine espresse nel liquido sinoviale di articolazioni affette da Osteocondrosi, allo scopo di definire i processi molecolari che potrebbero concorrere alla sua eziopatogenesi ed individuare eventuali marker proteici diagnostici e prognostici.

# CAPITOLO 1

## OSTEOCONDROSI

L'Osteocondrosi è definita come disturbo focale dell'ossificazione endocondrale ad eziologia multifattoriale (genetica, nutrizionale, endocrina e traumatica) che affligge numerose specie animali a livello della cartilagine di accrescimento del complesso epifisario-articolare e della fisi delle ossa lunghe.

Nel 1887, König utilizzò il termine "Osteocondrite Dissecante" per descrivere la patologia determinante la presenza di frammenti osteocondrali liberi o semi-liberi in articolazioni della specie umana con potenziali fattori eziologici di natura traumatica e degenerativo-necrotica catalogati in tre categorie (van Weeren, 2004).

Olsson nel 1978 suggerì il termine "Discondroplasia" per descrivere il difetto dell'ossificazione in discussione ormai noto come Osteocondrite, nel tentativo di migliorare la sua definizione ed elidere il prefisso osteo-, non condiviso trattandosi di una patologia coinvolgente le cartilagini di accrescimento e solo secondariamente il tessuto osseo (Jeffcott, 1991).

Nel corso degli anni sono stati proposti ed usati diversi sinonimi in medicina veterinaria (Osteocondrosi, Osteocondrite, Discondroplasia) ed umana, nel caso di quest'ultima anche in virtù delle diverse localizzazioni (Malattia di Freiberg, di Schuermann e Osgood-Schlatter) (Ekman, 1998).

Ad oggi, sembra ormai validato l'uso del termine Osteocondrosi per definire la turba dell'ossificazione in sé, morfologicamente caratterizzata dalla ritenzione di cartilagine patologica (necrotica o ipertrofica), e del termine Osteocondrite

Dissecante per definire la forma clinicamente manifesta a livello delle diartrosi, caratterizzata da lesioni cartilaginee con fessurazioni della superficie articolare e flap e/o frammentazioni osteocondrali, esprimendo la concomitanza di un processo primario con un processo flogistico articolare secondario.

Tale terminologia, tributaria di un uso comune e di una tradizione decennale, caratterizza la stesura del presente lavoro, sebbene recentemente Ytreus (2007) abbia proposto una nomenclatura più compatibile con la classificazione della malattia secondo il suo decorso fisiopatologico ed in grado di escludere la desinenza -ite, caratterizzante i comuni processi flogistici, secondari e non intrinseci della turba dell'ossificazione in esame.

### **1.1 Processo di ossificazione endocondrale**

Nei mammiferi, lo scheletro primordiale è rappresentato da un modello cartilagineo che, nel corso delle prime fasi dello sviluppo, è caratterizzato dalla simultanea crescita e modificazione in tessuto osseo. La cartilagine costituente la struttura scheletrica fetale, a differenza del tessuto cartilagineo maturo, è altamente vascolarizzata da struttura vasali che decorrono all'interno di canali nello spessore cartilagineo.

Nel corso della vita fetale a livello delle diafisi il processo di ossificazione esordisce con centri primari e al momento della nascita esse risultano completamente ossificate. Una dinamica diversa segue a livello delle epifisi delle ossa lunghe soggette a centri di ossificazioni secondari che, al momento della

nascita, non avendo dato luogo ad una completa ossificazione, generano la permanenza di strutture cartilaginee destinate all'accrescimento, il disco fisario o fisi e il complesso cartilagineo epifisario-articolare (Yttrhus, 2007; van Weeren, 2004).

La cartilagine di entrambe le strutture di accrescimento è caratterizzata da uno spessore organizzato in quattro distinte zone: quiescente, proliferativa, ipertrofica e calcificata. La zona della cartilagine in quiescenza rappresenta lo stato germinativo in grado di fornire i precursori condrocitari, successivamente soggetti a proliferazione e caratterizzanti la seconda zona. Secondo alcuni studi sul processo di proliferazione dei condrociti sembra intervenire un complesso meccanismo di feedback locale, dimostrato a livello della cartilagine fisiaria ed esercitato da tre molecole segnale sintetizzate dai condrociti stessi: il peptide correlato all'ormone paratiroideo (PTHrP), l'Indian Hedgehog (IHH) e il fattore di crescita trasformante – TGF $\beta$ . Questo meccanismo sarebbe in grado di regolare la velocità con cui i condrociti abbandonano la zona di proliferazione per essere definitivamente commissionati alla differenziazione ipertrofica.

Il successivo processo di ipertrofia e la conseguente apoptosi genera un tessuto acellulare costituito esclusivamente dalla matrice extracellulare precedentemente deposta. La calcificazione della struttura cartilaginea si verifica a livello della matrice extracellulare previa invasione da parte delle strutture vascolari provenienti dal fronte di ossificazione metafisario o epifisario; in questo processo di avanzamento il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) precedentemente secreto dai condrociti ipertrofici sembrerebbe rivestire un ruolo fondamentale (Yttrhus, 2007). Alcuni studi hanno dimostrato la presenza di vescicole

extracellulari nella zona della cartilagine ipertrofica. Le elevate concentrazioni di fosfatasi alcalina contenute all'interno di tali vescicole indicherebbero un ruolo intermediario di questi organelli extracellulari nel processo di mineralizzazione della matrice della zona ipertrofica e la permanenza di un'attività metaboliche dei condrociti al suo interno fino al momento della calcificazione propriamente detta (Jeffcott, 1998).

La cartilagine così calcificata rappresenta un'impalcatura la cui superficie è, successivamente, soggetta alla deposizione di osteoide da parte delle cellule osteoprogenitrici. Il rimodellamento di questo osso spongioso primario, secondo stimoli biomeccanici impressi nel corso della crescita del soggetto, genera il tessuto osseo maturo continuamente sottostante al processo dinamico che ne caratterizza l'omeostasi e ne garantisce l'adattamento agli stimoli meccanici nel soggetto adulto (van Weeren, 2004; Ytrehus, 2007). Studi sperimentali hanno indagato il coinvolgimento delle due principali categorie di enzimi degradativi della matrice extracellulare: le metalloproteasi (MMPs) e le catepsine. La presenza di queste enzimi sembra essere correlata alle distinte zone all'interno della cartilagine di accrescimento, suggerendo ruoli differenziali nel meccanismo di ossificazione endocondrale. Gli enzimi degradativi del collagene, MMP-1 ed MMP-13, rilevati all'interno della cartilagine in accrescimento appartenente alla specie equina presuppongono un attivo ruolo nel rimodellamento della cartilagine stessa; distintamente dalle catepsine B e D rilevate a ridosso delle zone di calcificazione che sembrerebbero essere maggiormente coinvolte nel processo di degradazione della matrice extracellulare necessario per la neoformazione ossea (Jeffcott, 1998).

Infine, il processo di ossificazione endocondrale si completa a livello fisario con l'avanzamento dell'età del soggetto fino a completa regressione del piatto cartilagineo; a livello del complesso epifisario-articolare, esso risparmia un sottile strato cartilagineo che andrà a costituire la cartilagine articolare propriamente detta (van Weeren, 2004; Ytrehus, 2007).

## **1.2 Canali vascolari cartilaginei**

Distintamente dall'invasione vascolare propria del processo di ossificazione, la cartilagine in accrescimento, caratterizzandosi rispetto cartilagine articolare, è ampiamente vascolarizzata da strutture capillari che decorrono all'interno di canali. Nella sua complessa organizzazione, ogni elemento di tale rete origina da un'arteriola, derivante dal plesso subcondrale per il complesso epifisario-articolare e di ingresso dal versante epifisario per il disco fisario, e si organizza in una struttura capillare simil-glomerulare, che si continua in una venula con decorso retroverso rispetto all'arteriola.

Sebbene non sia stata compresa la reale funzione dei canali vascolari, sono state avanzate tre ipotesi che riconducono al loro potenziale ruolo nel trofismo condrocitario coordinatamente a quello derivante dal liquido sinoviale, nella funzione complementare ai centri d'ossificazione secondaria e nel rifornimento di cellule staminali mesenchimali nei confronti del tessuto cartilagineo ed osseo in formazione.

Infine, secondo un processo definito “condrificazione”, i canali e le strutture vascolari regrediscono con la conversione del pattern staminale mesenchimale in condrociti proliferanti e secernenti matrice extracellulare in grado di obliterare il lume canalicolare, con successiva sostituzione in tessuto osseo (Ytrehus, 2007).

### **1.3 Morfologia delle lesioni osteocondrotiche**

Nell’Osteocondrosi, il difetto focale dell’ossificazione endocondrale si manifesta con mancata calcificazione della matrice extracellulare e assente penetrazione vascolare della cartilagine con aree di ritenzione della stessa senza sua conversione in tessuto osseo.

Le prime lesioni osteocondrotiche identificate a livello della cartilagine del complesso epifisario-articolare nella specie equina e suina sono rappresentate da un’area di necrosi cartilaginea focale attorno ad un vaso cartilagineo investito anch’esso da necrosi. La lesione cartilaginea nella prima fase risulta confinata esclusivamente a livello dello spessore cartilagineo senza coinvolgimento della sottostante cartilagine articolare né del sovrastante osso subcondrale. L’indagine del pattern di distribuzione delle molecole nella matrice extracellulare (collagene di tipo II, COMP, proteoglicani, fibromodulina, fibronectina, CMP e biglicani), proprio di tali lesioni necrotiche precoci in soggetti di 8-10 settimane di specie suina prima dell’insorgenza del difetto dell’ossificazione, è risultato simile a quello della cartilagine epifisaria normale. Successivamente, verificatasi la ritenzione di cartilagine contestualmente al difetto dell’ossificazione, il pattern di

distribuzione molecolare delle lesioni è risultato simile a quello della normale cartilagine articolare, pertanto un tessuto esente dall'ossificazione endocondrale. Tale successione cronologica sembrerebbe avallare l'ipotesi che la necrosi condrocitaria si verifichi prima delle alterazioni molecolari della matrice extracellulare.

Il difetto dell'ossificazione si verifica effettivamente quando il fronte di ossificazione raggiunge l'area della cartilagine necrotica, pertanto, con coinvolgimento dell'osso subcondrale e circoscritte zone di mielofibrosi e rimodellamento trabecolare. La naturale vulnerabilità del tessuto necrotico e l'intervento di traumi verosimilmente rappresentano gli eventi determinanti l'insorgenza delle lesioni clinicamente manifeste dell'Osteocondrite Dissecante (Ekman, 1998).

Distintamente, a livello della cartilagine della fisi, le lesioni non si rendono manifeste finchè non si palesa il difetto di ossificazione, in occasione del quale la cartilagine ritenuta è rappresentata da una massa di condrociti ipertrofici vitali. Generalmente, tali lesioni regrediscono o guariscono autonomamente, qualora questo non avvenisse esse sono attribuite come causa di fratture patologiche o deformità angolari.

La differenza morfologica delle lesioni iniziali nei due siti di Osteocondrosi suggerirebbe una distinta patogenesi delle stesse; tuttavia studi sperimentali hanno riprodotto lesioni simil-osteocondrotiche in entrambi i siti mediante ischemia localizzata, presupponendo una potenziale eziopatogenesi comune (Ekman, 1998).

Tuttavia queste valutazioni potrebbero apparire sommarie se si considera che l'eziopatogenesi resta ancora il principale aspetto da chiarire dell'Osteocondrosi.

Uno studio condotto nella specie equina sulle lesioni precoci a livello del complesso epifisario-articolare ha, infatti, meglio descritto e caratterizzato l'esistenza di un'ampia varietà di rilievi istologici ed immunoistochimici, presupponendo una maggior complessità dei processi fisiopatogenetici alla base delle manifestazioni morfologiche della patologia (Henson, 1997).

Previa definizione delle lesioni in esame, quali discondrodisplastiche, Henson ha esaminato esclusivamente alterazioni riferibili a ritenzioni di tessuto cartilagineo. L'esame istologico di tali lesioni ha evidenziato referti di variegata natura: 1) presenza di clusters condrocitari, 2) interruzione della normale sequenziale transizione condrocitaria dallo stato quiescente a quello proliferativo fino all'ipertrofico con accumulo di cellule rotondeggianti in ciascuna delle zone fino al ridosso sub condrale con completa disorganizzazione dell'architettura tissutale secondo perpendicolarità rispetto alla superficie articolare, 3) presenza di aree di condronecrosi prevalentemente nella zona ipertrofica a ridosso dell'osso subcondrale, 4) assenza di vasi metafisari all'interno dell'interfaccia cartilagineo-osso concomitante con un aumento dell'uptake extracellulare per la colorazione ematossilina-eosina, ritenzione di condrociti tondeggianti all'interno della matrice mineralizzata e mancato riassorbimento della stessa, 5) ritenzione di strutture vascolari non associate ad aree di necrosi, 6) fessurazioni tra cartilagine ed osso subcondrale in corrispondenza del fronte di invasione metafisario.

La catalogazione di tali referti ha permesso la distinzione di due gruppi: 1) lesioni con accumulo di condrociti tondeggianti, aree di necrosi e clusters condrocitari; 2) lesioni con alterazione della matrice mineralizzata ed aree di necrosi e clusters condrocitari. Contestualmente all'esame istologico, l'indagine

immunoistochimica ha rilevato una differente immunoreattività del collagene di tipo VI da parte delle due distinte categorie di lesioni; tuttavia, in entrambi i gruppi la maggior immunoreattività è risultata pericellulare ai clusters condrocitari e nel secondo gruppo ulteriormente associata ai condrociti ritenuti nella matrice mineralizzata e nell'osso subcondrale (Henson, 1997).

Infine, l'aumento dell'upregulation del collagene tipo VI, grazie al suo ruolo di supporto strutturale dell'ECM, è attribuita ad un tentativo di stabilizzazione meccanica nei confronti di un'area di minor resistenza. Inoltre, la dimostrazione in vivo e in vitro che concentrazioni iperglicemiche up-regolano l'espressione del collagene tipo IV, la concomitanza di alti livelli di insulina in soggetti affetti dalla patologia e l'intervento eziologico di elevati livelli di energia nel determinismo delle lesioni suggeriscono l'esistenza di un meccanismo glucosio-mediato alla base delle alterazioni immunoistochimiche relative al collagene di tipo VI riscontrate nei campioni esaminati. La perdita della normale architettura tissutale, secondo studi condotti nelle specie avicole, riflette un difetto nel controllo del normale processo di maturazione con accumulo di cellule pre-ipertrofiche. La presenza di strutture vascolari non associate ad aree di condronecrosi sono descritte come un tentativo di rivascularizzazione per promuovere la riparazione o il recapito di cellule osteoprogenitrici a livello della lesione. Sebbene la cartilagine sia ritenuta resistente alla neovascolarizzazione, presumibilmente per un meccanismo mediato dal TGF- $\beta$ , l'alterazione locale di questo fattore di crescita dimostrata esistere a livello delle lesioni osteocondrali potrebbe giustificare la presenza di nuove strutture vascolari. L'assenza dei vasi metafisari a livello dell'interfaccia cartilagine-osso e l'alterazione dell'affinità alla

colorazione secondo l'autore necessiterebbero di ulteriori indagini per la comprensione del loro significato nella fisiopatologia osteocondrotica (Henson, 1997), sebbene possano essere riconducibili all'incapacità dei condrociti di produrre una matrice extracellulare idonea all'invasione metafisaria, fondamentale per il processo di ossificazione. Indicazioni circa l'imaturità della matrice prodotta a livello di tali lesioni vengono da studi condotti mediante test di immunoreattività nei confronti della fibronectina.; l'aumento del pattern nella colorazione intracellulare, similmente a quanto riscontrato in campioni di cartilagine fetale, presupporrebbe una assonante alterazione della matrice extracellulare riferibile ad immaturità della stessa (Jeffcott, 1998).

La molteplicità di referti descritti e l'eziologia multifattoriale, riscontrata per l'Osteocondrosi, dovrebbero verosimilmente riflettere l'intervento di diversi meccanismi nel determinismo delle lesioni, giustificando le difficoltà riscontrate per la loro completa comprensione.

La possibilità che i diversi fattori eziologici e predisponenti agiscano in maniera sinergica rappresenta ormai una certezza e, purtroppo, il principale aspetto ancora da chiarire per poter approcciare la malattia in maniera metodica e risolutiva.

#### **1.4 Eziopatogenesi**

Numerosi studi su diagnosi, trattamento terapeutico e indici prognostici sono stati redatti nel corso dei decenni di indagini scientifiche dedicate all'Osteocondrosi.

Lo stato dell'arte in ambito clinico risulta soddisfacente per la patologia in esame, i risultati ottenuti mediante l'applicazione degli approcci diagnostico-terapeutici proposti sono un discreto compromesso, considerando i limiti rappresentati dalla parziale conoscenza di molti aspetti della patologia.

I numerosi sforzi spesi per la comprensione dell'eziopatogenesi dell'Osteocondrosi hanno condotto alla stesura di numerose teorie ed ipotesi, fino alla candidatura di fattori fisici, alimentari e genetici come predisponenti o potenzialmente determinanti la turba dell'ossificazione endocondrale.

### **Ereditarietà**

Studi sulla predilezione di razza e di localizzazione in razza trottatore, purosangue, mezzosangue svedesi e tedeschi, con indici di prevalenza da 0,10 a 0,26 tra le diverse razze (Wittwer, 2007) oltre a proporre metodi di classificazione delle lesioni (Hoppe, 1984; Laws, 1993; Dik, 1999; van Grevenhof, 2009) hanno posto l'attenzione sul potenziale ruolo svolto dalla componente genetica nella patologia dell'Osteocondrosi.

Dati pubblicati circa l'ereditabilità stimata nei cavalli Wamblood varia ampiamente in un range di valori da 0,02 a 0,64 in presenza di elevati errori standard. Similmente studi condotti in soggetti di razza trottatore hanno espresso indici tra 0,09 e 0,52 (Wittwer, 2007).

La sensibile differenza tra i dati descritti in bibliografia causata dai metodi di stima, dagli schemi di campionamento e, in alcuni studi, dalla scarsità numerica del campione e l'avvento di nuove tecniche di indagine genetica ha generato interesse circa indagini ulteriori per la ricerca e l'identificazione di locus genetici

associati ad osteocondrosi generando una varietà di informazioni, che devono comunque essere ancora completamente integrate nel panorama eziopatologico della malattia (Wittwer, 2007; Dierks, 2007).

### **Rapido accrescimento, alimentazione e fattori ormonali**

Nel 1979, Stromberg ha riscontrato una preponderante incidenza dell'Osteocondrosi in soggetti di grossa taglia e con rapida crescita, motivando studi successivi circa la correlazione tra differenti piani alimentari e di management e l'incidenza delle lesioni osteocondrali e tra quest'ultima e la velocità di crescita del soggetto (Jeffcott, 1991). L'indagine circa l'esistenza di tale correlazione ha fornito dati contraddittori nelle diverse specie (Ytrehus, 2007).

L'ipotesi più accreditata è pervenuta da studi condotti nella specie equina secondo i quali il rapido grado di crescita presuppone un elevato in-take energetico su base alimentare aumentando il tasso circolante di insulina, coincidendo con indagini condotte su soggetti affetti da Osteocondrosi, i quali presentavano un'elevata risposta insulinica post-prandiale. L'insulina agirebbe secondo meccanismi endocrini esercitando effetti diretti e indiretti.

Secondo studi in vitro, i risultati ottenuti sarebbero correlabili all'accumulo condrocitario in fase pre-ipertrofica; gli effetti diretti, consistenti in un aumento del grado di sopravvivenza cellulare, verrebbero espliciti sui condrociti e sul metabolismo locale e sistemico di fattori di crescita quali il TGF- $\beta$  e IGFs, dimostrati essere soggetti a variazioni nel corso di discondroplasia (Henson, 1997; Jeffcott, 1998; van Weeren, 2004).

È stato ipotizzato che l'insulina agisca sull'attività delle IGF, riducendone l'attività, mediante un'azione indiretta sulle proteine sieriche leganti le IGF, tuttavia non è ancora chiaro quale sia il meccanismo alla base. L'insulina, pertanto, sarebbe in grado di ridurre la velocità con cui le cellule condrocitaria entrano nella fase terminale dell'ipertrofia (Henson, 1997).

Gli effetti indiretti dell'insulina vengono espressi mediante diminuzione del tasso circolante degli ormoni tiroidei T3 e T4, coinvolti negli step finali della differenziazione condrocitaria e nell'invasione vascolare sul fronte metafisario. L'intervento su tali processi sembrerebbe giustificare alcuni referti istologici differenziali della seconda categoria di lesioni osteocondrali precedentemente descritte; le alterazioni più comuni, in condivisione tra i due gruppi e rappresentate da alterazioni del metabolismo condrocitario, sembrano invece essere correlabili agli effetti diretti dell'ormone insulinico (Jeffcott, 1998).

Tuttavia l'ormone insulinico, il suo metabolismo correlato all'alimentazione e i suoi effetti diretti ed indiretti non risultano essere gli unici protagonisti delle indagini condotte sull'Osteocondrosi circa l'intervento di fattori ormonali e nutrizionali.

In particolare, uno studio condotto su 43 soggetti di specie equina ha indagato la potenziale correlazione tra lo scoring radiografico e postmortem per osteocondrosi dei soggetti fino ad età di 5 e 11 mesi successivamente sottoposti ad eutanasia e i dosaggi di IGF-I, IGF-II, ormone paratiroideo (PTH), 1,25-diidrossi-vitamina D (1,25-OH<sub>2</sub>D), cortisolo, rame, zinco e calcio. L'evidenza di una minor concentrazione di IGF-I nei soggetti affetti da patologia è integrata nel ruolo del

fattore di crescita sull'espansione clonale e differenziazione dei condrociti, similmente all'IGF-II.

Il dosaggio dei livelli di cortisolo, eseguiti per la potenziale correlazione con l'effetto inibitorio che l'ormone potrebbe avere sull'asse IGF-I, non ha rilevato aumenti degli stessi. Pertanto la diminuzione dell'IGF-I è riconducibile alla dinamiche precedentemente espresse.

La ridotta frazione di calcio ionizzato evidenziata nei soggetti affetti sembrerebbe giustificare le elevate concentrazioni di PTH e 1,25-OH<sub>2</sub>D, volte probabilmente a mantenere l'omeostasi plasmatica del minerale a spese del metabolismo osseo (Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999). Tuttavia restano ancora da chiarire le correlazioni tra tale aumento della 1,25-OH<sub>2</sub>D e il suo ruolo preventivo rilevato nella discondroplasia aviaria (Farquharson, 1996). L'aumento di tale metabolita della Vitamina D dovrebbe teoricamente garantire una prevenzione nei confronti dell'Osteocondrosi, tuttavia essa risulta aumentata proprio nei soggetti affetti; pertanto, resta da considerare per ulteriori indagini la possibilità che il suo metabolismo e la disponibilità locale dipendano da proteine di trasporto, descritte con basse concentrazioni nella specie equina (Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999; vd. Vitamin D Binding Protein nel capitolo Discussioni).

Le indagini condotte sugli oligoelementi hanno evidenziato la diminuzione della concentrazione di rame plasmatico nei soggetti affetti da osteocondrosi (Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999), avvalorando il ruolo del rame nella patologia in qualità di cofattore nell'attività di enzimi rame-dipendenti. Tra essi possiamo ricordare la Cu Superossido dismutasi (CuSOD), i citocromi e la lisilossidasi. Quest'ultimo, importante per il metabolismo cartilagineo, catalizza la

deaminazione ossidativa dei residui di lisina presenti nel procollagene, favorendo il cross-linking tra le molecole di collagene. La formazione di legami intermolecolari è essenziale alla stabilità del collagene e quindi all' integrità della matrice extracellulare. L'importanza dei legami cross-link dovuti alla lisilossidasi è stata dimostrata da studi in cui l'enzima è stato inibito tramite carenze nutrizionali del rame o inibitori specifici. Il minor apporto dell'oligoelemento comporta una riduzione della stabilità strutturale del tessuto connettivo riguardo essenzialmente al collagene e l'elastina, soprattutto degli animali in crescita (Bridges, 1984, Bridges, 1988, Jeffcott, 1998, Badadani, 2007).

Tuttavia, la presenza di dati contraddittori in bibliografia, quali la scarsa correlazione tra la sua integrazione della gestante pre-partum e del puledro fino allo svezzamento e l'incidenza della lesioni osteocondrali (Gee, 2005; Gee, 2007), mantiene viva la discussione circa il ruolo primario e i meccanismi certi secondo cui il rame potrebbe agire nel determinismo della patologia e delle lesioni, fino a considerarne effetti sui livelli delle catepsine B e D (Jeffcott, 1998).

Variegate sono state le ipotesi e le proposte avanzate per identificare i fattori di natura alimentare in grado di intervenire nell'eziopatogenesi dell'Osteocondrosi, ad oggi non è stato ancora identificato il ruolo primario di ciascuno di essi, in presenza talvolta di dati discordanti in bibliografia si ritiene che i fattori eziologici possano agire in condizioni diverse e proprio tale azione circostanziata permetterebbe loro di intervenire nell'eziopatogenesi in maniera sinergica oppure generare referti contraddittori fino a metterne in discussione il protagonismo nella patologia.

## **Eventi traumatici ed esercizio**

La predilezione circa la localizzazione delle lesioni osteocondrali in determinate articolazioni e il loro reperimento in siti specifici di esse ha supportato l'ipotesi che stress biomeccanici rappresentino fattori predisponenti allo sviluppo dell'Osteocondrosi o per lo meno alla sua manifestazione clinica. Alterazioni conformazionali e la taglia corporea sembrerebbero predisporre all'impressione di traumi e forze biomeccaniche anomale, questo giustificerebbe lo sviluppo delle lesioni in aree già note in quanto soggette a stimoli meccanici nella normale deambulazione (Ytrehus, 2007).

Secondo uno studio, integrato in un progetto di ricerca circa l'influenza dell'esercizio sullo sviluppo dell'apparato muscoloscheletrico e condotto su 43 puledri, progenie di stalloni con Osteocondrosi a livello delle articolazioni femoropatellari e crurotarsiche, pertanto geneticamente predisposti all'insorgenza della patologia, sarebbe limitato l'effetto dell'esercizio sullo sviluppo delle lesioni. I soggetti sono stati svezzati all'età di 5 mesi secondo identiche condizioni eccezion fatta per il tipo e la quantità di esercizio. La loro destinazione, nel corso dei primi 5 mesi, a tre distinti regimi di esercizio ne ha previsto il riposo in box per i primi, i secondi hanno condotto il ricovero in box con integrazione giornaliera di percorsi al galoppo e gli ultimi lasciati liberi al pascolo. Al quinto mese 8 soggetti di ciascun gruppo sono stati eutanizzati e i rimanenti di ogni gruppo sottoposti a un regime di esercizio limitato fino all'età di 11 mesi, per esser successivamente eutanizzati. L'ispezione macroscopica delle maggiori articolazioni diartroidali ha mostrato la presenza di lesioni macroscopiche di 5 mesi, escludendo pertanto un effetto dell'esercizio sulla loro insorgenza; tuttavia è

stata riscontrata una tendenza alla riduzione della gravità delle lesioni con l'esercizio, statisticamente non significativa. Le indicazioni maggiori giungono dalle differenti localizzazione delle lesioni in funzione dell'appartenenza ai diversi gruppi. La riduzione delle lesioni nei soggetti di 11 mesi è invece un indice del dinamismo dell'Osteocondrosi e la capacità di regressione in determinate articolazioni, quali la femoropatellare a differenza della crurotarsica. In conclusione, si ritiene verosimile l'esistenza di un periodo di suscettibilità delle articolazioni all'intervento di eventi traumatici piuttosto che all'esercizio controllato e che possa essere auspicabile la diminuzione della manifestazione clinica delle lesioni in seguito a regressione delle stesse o evitandone l'avanzamento nel rispetto di determinate condizioni di allevamento. Secondo tali evidenze, la regressione dopo i 5 mesi sembra essere probabile più per le lesioni femoropatellari che crurotarsica (van Weeren, 1999).

Secondo alcuni autori, la disponibilità di un esercizio non controllato, possibile grazie alla disponibilità di distese aree di pascolo, espone a maggiori rischi di traumi pertanto creando un fattore di discrezione rispetto all'esercizio inteso come attività controllata, non privando pertanto il soggetto in crescita di un adeguato stimolo per un corretto sviluppo muscoloscheletrico (Lepeule, 2009, van den Hoogen, 1999).

In virtù di tali valutazioni, suffragate da studi condotti su suini sottoposti ad eventi traumatici con aumento dell'incidenza delle lesioni osteocondrali rispetto a soggetti esentati da tali insulti, nell'eziologia dell'Osteocondrosi l'insulto traumatico nel corso dei primi mesi di vita rivestirebbe un ruolo maggiore rispetto a quello dell'esercizio (van Weeren, 1999; Ytrehus, 2007).

## **Fattori ischemici**

Secondo studi condotti nella specie suina sull'Osteocondrosi ad insorgenza spontanea, a livello delle lesioni precoci, è stata identificata la presenza di aree di condronecrosi associate a canali cartilaginei necrotici e non perfusi. È stato dimostrato che tali lesioni si localizzano in siti prediletti in relazione all'età e al processo di regressione vascolare età-dipendente. In assenza di indicazioni circa un insulto diretto alla rete vascolare dei canali cartilaginei, da parte di alcuni autori sono state avanzate diverse ipotesi in merito all'eccessiva velocità di crescita cartilaginea nella specie suina o all'insorgenza di fenomeni ischemici secondari a difetti nella rete vascolare cartilaginea in grado di generare aree di necrosi, responsabili del difetto di ossificazione endocondrale. Le evidenze ottenute in studi sperimentali hanno dimostrato la riproducibilità di lesioni simil-ostecondrotiche mediante l'interruzione dell'apporto vascolare dei canali vascolari, caratterizzate da necrosi vascolare seguita da aree di condronecrosi. Tali reperti hanno suggerito che la naturale insorgenza delle lesioni potesse esser relazionata ad un evento locale in grado di generare un danno dei canali vascolari. Tale ipotesi sembra esser supportata da uno studio condotto nella specie suina mediante perfusione della cartilagine d'accrescimento e suo sezionamento in fette, dimostrando che la necrosi vascolare cartilaginea si localizza in maniera focale e appena distalmente rispetto al punto in cui i vasi cartilaginei attraversano la giunzione condro-ossea. La necrosi affligge pertanto il canale vascolare da tale punto di intersezione verso la sue estremità distale, implicando l'insorgenza delle lesioni a livello dell'interfaccia cartilagine-osso. Questi risultati dimostrano l'esistenza di un processo di modificazione della vascolarizzazione della

cartilagine in accrescimento, passando da una rete fornita dai vasi dei canali cartilaginei a quella dei vasi originati dal fronte di ossificazione. È stato, infatti, dimostrato lo sviluppo di anastomosi tra i vasi cartilaginei e quelli del fronte di ossificazione al momento del loro incontro contestualmente all'avanzamento del processo di ossificazione endocondrale. È verosimile che tali anastomosi possano essere soggette a stress e danni, poiché attraversano una zona di intensa attività di rimodellamento e circondata da tessuto potenzialmente debole agli stimoli biomeccanici, rappresentato da spicole cartilaginee calcificate e spongiosa primaria. Questa teoria spiegherebbe la specifica localizzazione e la bilateralità delle lesioni osteocondrotiche e l'esistenza di un periodo di suscettibilità legato al processo di regressione vascolare cartilaginea e invasione vascolare del fronte di ossificazione (Yttrhus, 2007; Ekman, 1998).

Tale teoria trova conferma in uno studio nella specie equina circa la vascolarizzazione della cartilagine di accrescimento del complesso epifisario-articolare del tarso e la correlazione tra il processo di condificazione delle strutture vascolari cartilaginee e la localizzazione delle lesioni in siti specifici parallelamente all'impressione di forze meccaniche che giustificerebbero un insulto alle strutture vascolari (Olstad, 2008).

Tuttavia, anche queste teorie sono soggette a confutazioni e critiche sulla base di dati contraddittori che addirittura, non descrivendo la costanza di aree di necrosi a livello delle lesioni osteocondrotiche, refertano la ritenzione dei canali vascolari cartilaginei attribuendo loro un ruolo nel determinismo delle lesioni (van Weeren, 2004).

Tra le varie ipotesi patogenetiche coinvolgenti la rete vascolare trofica della cartilagine in accrescimento, è annoverata una teoria circa la sottoproduzione del fattore di crescita fibroblastico basico (bFGF) e la presenza di un fattore “anti-invasivo” (AIF), i quali potrebbero deprimere l'angiogenesi e la conseguente penetrazione vascolare; inoltre, essendo la degradazione della matrice cartilaginea necessaria alla migrazione degli elementi vascolari, essa potrebbe essere ridotta da difetti, da parte dei condrociti, nella secrezione di enzimi responsabili di questo processo (metalloproteinasi) (Watkins, 1999). Infine, studi condotti sul suino hanno messo in evidenza alterazioni strutturali della matrice cartilaginea che sembrano essere responsabili della mancata penetrazione delle strutture vascolari fondamentali per il processo di ossificazione (Farnum, 1986).

### **1.5 Ricerca di marker molecolari riferibili ad Osteocondrosi**

Sebbene molte sono state le teorie eziopatogenetiche riferibili all'Osteocondrosi ancora oggi non è possibile individuare con certezza il vero agente eziologico e l'esatta sequenza patogenetica, principalmente per quanto concerne il preciso momento di insorgenza della lesione primaria. Infatti, le lesioni che si rendono manifeste da un punto di vista clinico e radiografico riflettono molto più facilmente modificazioni degenerative legate alla cronicità e processi riparativi secondari piuttosto che la reale lesione primaria alla base del processo patologico (Bertone, 2005; Ytrehus, 2007).

Data la rilevanza della malattia e la precoce insorgenza delle lesioni, assume capitale importanza la possibilità non solo di fare precocemente la diagnosi, vale a dire in un periodo precedente allo sviluppo di lesioni radiograficamente evidenziabili, ma anche di poter individuare i soggetti che sono a rischio di presentare la malattia. In quest'ottica, fondamentale è stata la scoperta di alcune molecole marker della patologia che potrebbero divenire un mezzo importante per fare diagnosi e potenzialmente, in futuro, prevenzione; tuttavia, ad oggi non esiste un numero adeguato di lavori tali da poter consentire un uso pratico di queste molecole.

Fra i vari marker ematici e articolari valutati nella specie equina, alcuni sono stati messi in relazione con l'Osteocondrosi. E' stato, ad esempio, rilevato un aumento dei livelli ematici del Carbossipeptide del collagene tipo II (CPII) in soggetti affetti da Osteocondrosi. E' stato ipotizzato che questo aumento rifletta una maggiore sintesi di collagene tipo II in caso di lesioni con frammenti osteocondrali. Parallelamente al CPII si è osservato un aumento del Condroitin-Solfato sia a livello ematico che a livello articolare, specialmente in soggetti che presentavano la forma dissecante della patologia (Frisbie, 1999). Soggetti con fratture osteocondrali hanno presentato un aumento a livello di fluido sinoviale dei valori della Proteina Oligomerica della componente cartilaginea (Skioldebrand, 2001). Discusso è il ruolo del Cheratan-Solfato; attualmente si tende però a considerarlo di scarso valore come marker nel cavallo (Frisbie, 1999).

In un caso di un puledro affetto da discondroplasia generalizzata e lisi delle epifisi vertebrali si è valutato un decremento dei livelli di osteocalcina rispetto a puledri della stessa età (Girard, 1997).

Billinghurst ha associato la determinazione dei marker del metabolismo osteoarticolare all'indagine radiografica, valutando l'eventuale correlazione esistente tra i loro livelli e la gravità delle lesioni in cavalli affetti da Osteocondrosi. In questo studio sono stati valutati i principali marker del metabolismo del collagene, vale a dire propeptide C del collagene tipo I (PICP), propeptide C del procollagene di tipo II (CPII), metalloproteinasi di matrice (MMP), neoepitopo collagenasi-generato dei frammenti di collagene tipo II, neoepitopo collagenasi-generato dei frammenti di collagene tipo I e II, telopeptide C del collagene tipo I; marker indicativi dei processi anabolici del tessuto osseo; l'osteocalcina e l'epitopo 846 del condroitin solfato, e un indicatore generale del turnover dei proteoglicani, i glicosamminoglicani solforati (sGAG) (Billinghurst 2004).

Alle valutazioni effettuate su puledri di 5 mesi affetti da Osteocondrosi tutti i marker di degradazione del collagene e l'osteocalcina si sono rilevati significativamente aumentati, mentre fortemente diminuiti sono risultati i sGAG. Queste modificazioni riflettono il sostanzioso turnover del collagene indotto dagli enzimi collagenolitici, i tentativi di riparazione delle lesioni, la maggior sintesi di collagene tipo II nella cartilagine e la mineralizzazione-rimodellamento osseo.

L'identificazione di questi marker non ci permette ancora di utilizzarli adeguatamente in campo clinico diretto né per la diagnosi né per la prognosi né per il monitoraggio terapeutico; da questo risulta fondamentale ampliare le nostre

conoscenze sulle modificazioni biochimico-metaboliche dell'articolazione affetta da Ostecondrosi nella speranza di conoscere meglio questa patologia e di riuscire ad approcciare ad essa in modo sistematico e tempestivo.

## **CAPITOLO 2**

### **ANALISI PROTEOMICA**

Nel 1994, nel vocabolario scientifico viene introdotto un nuovo termine Proteoma; coniato dall'unione della parole PROTEine con la parola genOMA, il Proteoma indica la totalità delle proteine espresse da un genoma in un aspetto estremamente dinamico. Tale dinamismo dell'espressione proteica propria dei sistemi biologici è determinata dall'intervento di fattori, quali lo sviluppo, la caratteristiche tissutali e le condizioni ambientali, la cui azione può determinare mutamenti della proteina originaria. Il principio di proteoma va quindi inteso come la totalità delle proteine, incluse le isoforme proteiche e le modificazioni post-traduzionali, presenti in una determinata cellula, tessuto o organismo, in un preciso momento. Si intende quindi come tali modificazioni possano essere anche l'effetto di patologie sistemiche o locali, oltre che dei normali processi fisiologici associati allo sviluppo e differenziamento cellulare (Williams, 1999).

Il riconoscimento del compito delle proteine quali effettrici dell'attività cellulare ha reso necessario il loro studio per la comprensione dei diversi sistemi biologici sia in condizioni normali che patologiche, rendendo necessaria l'istituzione di metodiche in grado determinare il livello di espressione proteica e la struttura, la localizzazione, le modificazioni post-traduzionali e le interazioni fra molecole proteiche e ligandi di diversa natura. La Proteomica, dunque, può essere descritta come lo studio sistematico delle proprietà delle proteine al fine di ottenere descrizioni dettagliate della funzione e del controllo dei sistemi biologici (Patterson e Aebersold, 2003).

Lo studio del genoma di numerosi organismi ha caratterizzato i primi studi permettendone il sequenziamento. Successivamente è stata evidente la presenza di limiti da parte dell'approccio genomico; le informazioni acquisite non erano in grado di fornire spiegazioni sugli aspetti molecolari dei processi cellulari né sulla loro regolazione.

Il riconoscimento di un gene non presuppone che si conosca il momento in cui esso verrà trascritto e tradotto né la quantità, il grado e la natura della sua competenza funzionale. Un'ulteriore deficienza di informazioni è deducibile dal fatto che un unico gene può codificare per proteine con funzioni molto diverse. Molti geni infatti possono dare origine a più di un trascritto (mRNA) e da ciascuno di questi possono derivare più proteine, potenzialmente soggette a modificazioni post-traduzionali per dare vita a diverse isoforme attive.

La Proteomica dovrebbe essere in grado di superare i limiti descritti, completando la informazioni acquisite mediante studi genomici e trascrittomici (Agaton, 2004; Kavallaris e Marshall, 2005).

Per concludere mediante un'analogia, possiamo affermare che "oggi (nell'era post-genomica) abbiamo le lettere (le Sequenze) e, sin qui, abbiamo scoperto poche frasi (i Geni che si conoscono) ma si è solo all'inizio della lettura dei contenuti del capitolo (come i geni potrebbero essere trascritti) mentre i libri (le proteine e i metaboliti) impegneranno, per la loro lettura, la mente umana ancora per molti secoli" (Baak, 2005).

Risulta quindi chiaro che tali discipline approcciano i sistemi biologici da punti di vista differenti e danno informazioni integrate per una migliore comprensione dell'attività biologica.

L'analisi del pattern proteico può avvenire mediante diverse metodiche in funzione degli obiettivi dello studio e delle caratteristiche del sistema biologico in esame.

Viene indicata come proteomica descrittiva la definizione di mappe proteiche di riferimento caratterizzanti un tessuto, intese come rappresentazioni istantanee dell'espressione proteica. Essa oltre ad elencare le proteine presenti ne identifica la struttura molecolare e la sequenza aminoacidica.

La proteomica funzionale si occupa invece della valutazione e definizione delle modificazioni quali-quantitative circa la componente proteica, che si verificano nelle fasi di differenziazione, proliferazione e segnalazione cellulare. In tal maniera dovrebbero essere consentita la comprensione della sequenza degli eventi molecolari che regolano la vita di un sistema biologico, in condizioni sia patologiche che fisiologiche (Tilleman, 2005; Carbonaro, 2004).

Le metodiche proteomiche prevedono solitamente una prima fase in cui le miscele proteiche complesse vengono risolte mediante tecniche separative, come l'elettroforesi o la cromatografia, ed una seconda fase di identificazione dei polipeptidi mediante spettrometria di massa, utilizzo di anticorpi specifici o confronti con mappe di riferimento. Grazie alla sua riproducibilità, facilità di esecuzione, potere di risoluzione e capacità di analisi, recentemente si è venuta ad affermare la metodologia sperimentale che mette quello definito un "approccio classico". Esso prevede tre fasi sequenziali:

- elettroforesi bidimensionale (2DE)

- analisi computerizzata dei gel

- spettrometria di massa

## 2.1 Elettroforesi bidimensionale - 2DE

L'elettroforesi bidimensionale permette di separare contemporaneamente miscele proteiche molto complesse sfruttando due proprietà chimico-fisiche diverse ed indipendenti l'una dall'altra, la carica e la massa.

In particolare consta di due sistemi elettroforetici ortogonali tra loro:

- l' isoelettrofocalizzazione, che costituisce la prima dimensione in cui le proteine vengono separate in base al proprio punto isoelettrico,
- la classica SDS-page, indicata come seconda dimensione, in cui le proteine vengono risolte in funzione del peso molecolare.

Il 2D-gel che si ottiene risulta essere una vera e propria mappa che può essere letta come un piano cartesiano in cui ogni spot, corrispondente ad un singolo polipeptide, può essere individuato mediante due coordinate: il punto isoelettrico (pI) ed il peso molecolare (PM) (Shaw, 2003).

La sua applicazione su larga scala ha permesso di *mappare* il contenuto proteico di numerose matrici biologiche fino a permettere la realizzazione di banche dati on-line fruibili e universalmente accessibili (Fig. 1) (Cho 2003; Hedberg 2005).

**Isoelettrofocalizzazione - IEF.** Le proteine sono molecole anfotere in grado di comportarsi sia da acido che da base e di assumere una carica netta globale in funzione del pH del mezzo. Al valore di pH a cui le cariche positive e negative si equivalgono (pI-punto isoelettrico) la proteina presenta carica netta nulla e pertanto mobilità elettroforetica pari a zero.

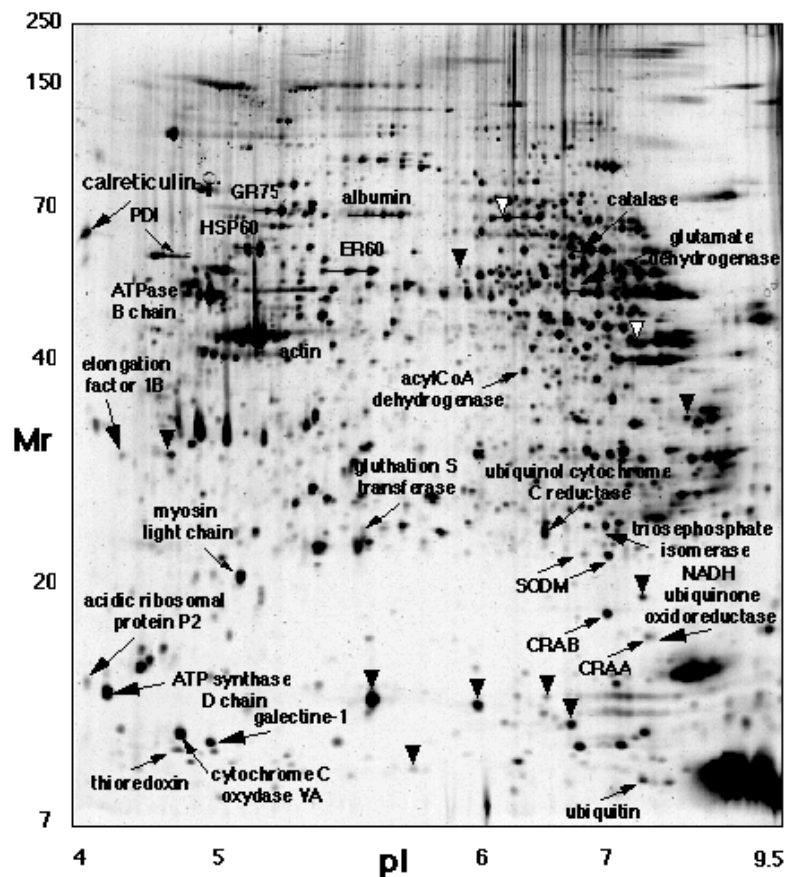


Fig.1 Mappa 2D di riferimento on line ottenuta da estratto proteico di rene umano-  
<http://www.expasy.org/ch2dothergifs/publi/kidney.gif>

In funzione di questa proprietà se una miscela di proteine viene caricata su un gel che presenta un gradiente di pH, i polipeptidi che si trovano a pH inferiore al proprio pI si caricano positivamente mentre quelle che si trovano ad un pH maggiore del proprio pI si caricano negativamente. L'applicazione di una differenza di potenziale ne determinerà la migrazione verso il catodo o l'anodo fino al raggiungimento della zona del gradiente che coincide con lo specifico punto isoelettrico.

**SDS-page.** La seconda dimensione viene condotta su gel di poliacrilammide in presenza di SDS, un detergente anionico che si lega alle proteine mascherandone completamente la carica. Le proteine oltre a risultare denaturate presentano tutto lo stesso rapporto carica massa e perciò, se sottoposte a migrazione elettroforetica, si muovono solo in base al proprio peso molecolare (Shaw, 2003; Cho, 2003).

Il gel ottenuto viene sottoposto a colorazione. La scelta del colorante da utilizzare dipende dalla quantità di proteina caricata e dagli obiettivi dell'analisi. (Miller, 2006).

## **2.2 Analisi densitometrica dei gel**

L'introduzione e lo sviluppo di software informatici ha facilitato negli ultimi anni l'analisi e la comparazione dei gel elettroforetici. Previa scansione dell'immagine del gel, questi software sono in grado di distinguere gli spot proteici da eventuali rumori di fondo, grazie all'uso di un particolare algoritmo che esprime le coordinate x e y, i pixel delle posizioni orizzontali e verticali, e il valore z, il segnale dell'intensità del pixel. L'intensità totale di ciascuno spot, espressa in unità di densità ottica (OD), viene calcolata sommando le intensità di tutti i pixel registrati per quello spot e normalizzando relativamente all'intensità totale o a quella degli spot ritenuti validi. Mediante la comparazione delle posizioni sul gel di proteine note è possibile attribuire ai singoli spot il punto isoelettrico e il peso molecolare. Questi software sono in grado di effettuare l'analisi sia qualitativa che quantitativa di gel differenti messi a confronto mediante la realizzazione di una

mappa di riferimento, di attribuire a ciascuno spot un numero identificativo SSP (Standard Spot Number), di raggruppare le repliche dei gel ottenuti dallo stesso gruppo sperimentale, di calcolare il rapporto di espressione di ogni spot nei gruppi messi a confronto e valutarne la significatività, infine di esportare la lista dei SSP e relative OD.

### **2.3 Spettrometria di massa**

La metodica d'elezione per l'identificazione delle proteine rimane ancora oggi il "mass fingerprint" che prevede: la digestione della proteina con un enzima proteolitico specifico, solitamente la tripsina; la misurazione della massa dei peptidi ottenuti, mediante spettrometria di massa; ed infine il confronto dei dati con le masse di peptidi derivati dalla digestione "virtuale" di proteine note, con l'utilizzo di software in grado di interrogare database universali. La proteolisi enzimatica darà origine all'insieme di peptidi specifici e la determinazione accurata della loro massa identificherà una sola proteina fra quelle presenti negli archivi informatici. La spettrometria di massa rappresenta uno step essenziale per l'identificazione inequivocabile della proteina e delle modificazioni post-traduzionali. Tuttavia è una metodica utilizzabile solo a scopi analitici in quanto la molecola da analizzare viene distrutta. Le fasi principali sono rappresentate dalla ionizzazione dei peptidi in fase gassosa, la separazione di ioni generati in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ) e la loro rivelazione (Kolker, 2006). Nell'analisi proteica si sono rivelati particolarmente validi due metodi di ionizzazione, l'ESI

(ElectroSpray Ionisation) e il MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) (Yamashita, 1984; Karas, 1987; Hamdan, 2001; Kolker, 2006; Cravatt, 2007).

## **2.4 Analisi Proteomica applicata allo studio delle patologie articolari**

L'elevata incidenza, la gravità delle lesioni e la complessità intrinseca di patologie osteoarticolari, quali l'osteoartrite e l'artrite reumatoide, ha suscitato interesse scientifico per testare l'applicabilità delle tecniche proteomiche per lo studio di tali malattie. La possibilità di analisi dei pattern proteici dei tessuti articolari affetti da tali patologie sarebbe stata un'ottima occasione per rivelarne le variazioni e comprendere il loro ruolo delle rispettive patogenesi.

L'indagine proteomica per lo studio delle patologie osteoarticolari dispone di diverse matrici biologici di origine sistemica, siero e plasma, e locali, come cartilagine, liquido e membrana sinoviale, ciascuna potenzialmente utile per acquisire informazioni.

La peculiarità della popolazione cellulare condrocitaria e il diretto coinvolgimento nelle patologie articolari, infiammatorie e degenerative, rappresenta un aspetto positivo per l'indagine del pattern proteico cellulare. Tuttavia, la presenza di notevoli quantità di collagene di II tipo connesso con aggregati di acido ialuronico e aggregati, rappresenta un limite per la qualità dell'immagine e dell'indagine correlata, poiché essi mascherano notevolmente le proteine caratterizzanti il tessuto, rappresenta una notevole difficoltà. Un altro limite è rappresentato dalla

necessità di rapido campionamento e dell'uso di specifiche colture per i condrociti, soggetti ad elevata instabilità fenotipica dei condrociti (Wilson, 2008). Questi problemi in medicina umana sono stati parzialmente risolti, tuttavia, in medicina veterinaria essi non sono stati ancora approcciati. In umana, è stato possibile ottenere la completa differenziazione del proteoma di cartilagini sane da quello di cartilagini implicate nei processi di osteoartrite e caratterizzare il ruolo che queste differenze hanno nella manifestazione clinica e nell'evoluzione patogenetica (Guo, 2008).

Nella specie umana, tali conoscenze e il superamento dei limiti descritti hanno concretizzato una migliore comprensione di alcuni meccanismi biomolecolari associati a patologie tipiche dell'articolazione, la caratterizzazione delle modificazioni proteiche ai fini della diagnosi precoce e del monitoraggio prognostico e terapeutico; questo grazie all'identificazione e confronto di pattern proteici descritti come appartenenti a processi fisiologici o patologici (De Ceuninck, 2007; Tilleman, 2005; Tilleman, 2008; Vincourt, 2006). Un esempio è rappresentato dalla caratterizzazione delle modificazioni valutabili in articolazioni di soggetti affetti da artrite reumatoide (RA), portando al riconoscimento di marker proteici aspecifici della patologia, come particolari immunocomplessi IgM-IgG rinvenibili nel liquido sinoviale (Lambrecht, 2008), e all'identificazione di specifici enzimi e peptidi espressi in corso di RA (Lambrecht, 2008; Chang, 2009).

In medicina veterinaria, lo stato dell'arte è sensibilmente diverso, sia per la tardività con cui l'approccio proteomico è stato introdotto in questo ambito sia per interessi diversi rispetto alla specie umana; tuttavia, questo non esclude

l'importanza che alcuni modelli animali potrebbero rivestire per la conduzione di studi con ricadute in ambito umano.

In alcuni studi condotti sulla specie equina, è stato relazionata l'incremento e la modificazione di proteine oligomeriche della matrice cartilaginea di articolazioni diartroidali in soggetti sottoposti ad allenamenti di lunga durata (Skioldebrand, 2006). L'esercizio, determinando un incremento dei processi anabolici e catabolici, altererebbe, proporzionalmente alla sua intensità e durata, le caratteristiche biochimiche della cartilagine articolare e l'espressione delle proteine della matrice extracellulare.

Sebbene in altre malattie di pertinenza locale siano state rilevate variazioni sistemiche mediante l'indagine di plasma e siero, l'analisi delle matrici ematiche ha trovato difficile applicazione per la caratterizzazione di pattern proteici associati a patologie articolari. Nella specie umana infatti, l'osteoartrite, pur causando una notevole variazione del pattern articolare, si associa a minime o inesistenti modificazioni dell'espressione proteica ematica.

Il liquido sinoviale rappresenta pertanto il materiale d'elezione; di facile reperibilità, esso rappresenta un quadro di esclusiva pertinenza articolare ed, essendo un ultrafiltrato dal plasma, esclude macromolecole non implicate nell'attività biochimico-metabolica dell'articolazione, che potrebbero interferire con il risultato. Inoltre, in patologie di carattere degenerativo come l'osteoartrite, il liquido sinoviale rappresenta l'unico materiale biologico utile al campionamento, viste le evidenze circa l'assenza di modificazioni significative del pattern proteico a livello di matrici diverse, come quelle ematiche, seppur di facile reperibilità anch'esse (Tilleman, 2005; Tilleman, 2008).

In qualità di ultrafiltrato plasmatico, il liquido sinoviale possiede funzioni lubrificanti e trofiche proprie che motivano la presenza in esso di un variegato spettro biochimico, con molecole utili al metabolismo cartilagineo e alla regolazione dei processi di turn-over tissutale e di risposta agli insulti meccanici e settici.

L'ultrafiltrazione del plasma avviene attraverso la membrana sinoviale, un filtro che permette il passaggio in sede intra-articolare di molecole di piccole dimensioni, come il glucosio e gli elettroliti; mentre le macromolecole, come le proteine, difficilmente oltrepassano tale filtro. In condizioni normali, glucosio ed elettroliti si rinvencono in concentrazioni sovrapponibili a quelle plasmatiche; le proteine sono solo il 25-35% di quelle plasmatiche (Steel, 2008).

Alle molecole di derivazione plasmatica, la produzione da parte della componente cellulare sinoviale attua un'integrazione del liquido sinoviale con altre di derivazione locale, come il proteoglicano 4, l'acido ialuronico e fosfolipidi.

Processi patologici, siano essi di natura infettiva, metabolica o degenerativa, portano ad alterazioni delle componenti normalmente espresse dal liquido sinoviale soprattutto riferibili al pattern proteico che può addirittura incrementare arrivando a quote di 40-60 g/L (Steel, 2008); negli eventi settici notevoli variazioni quantitative caratterizzano anche il pool cellulare.

L'aspetto quantitativo del pattern proteico non risulta essere l'unico soggetto a sostanziali variazioni, infatti, è certo il coinvolgimento dell'aspetto qualitativo delle proteine; l'evidenza che vengono espresse in maniera differente tra sano e patologico permette la candidatura di alcune proteine o loro isoforme come marker della patologia in atto, in grado di riflettere i processi anabolici e

catabolici dei tre principali tessuti articolari (osso, cartilagine e sinovia) (Garnero, 2006).

L'interesse rivolto verso la ricerca dei marker di patologia è legato al loro potenziale uso come indici diagnostici e prognostici e per il monitoraggio dell'efficacia terapeutica di determinati protocolli.

Studi condotti sull'osteoartrite e artrite reumatoide hanno identificato vari tipi di collagene, aggreganti, proteasi e citochine quali mediatori del metabolismo cartilagineo e associati agli stati patologici appena citati. Questi, in associazione con altre molecole come IL-1, metalloproteinasi, prostaglandine o TNF, sono stati infatti candidati come marker per la diagnosi precoce, affiancando i convenzionali esami clinico-radiografici (Rousseau, 2006; Westacott, 1996; Garnero, 2006; Anastassiades, 2005).

Secondo tali evidenze, la potenziale applicazione dell'analisi proteomica per lo studio delle patologie osteoarticolari, la necessità di dati scientifici utili alla comprensione della eziologia e fisiopatologia dell'Osteocondrosi e l'utilità dell'analisi del pattern proteico sinoviale al fine di identificare marker per la diagnosi precoce hanno motivato la ricerca presentata in questo lavoro di tesi sperimentale.

# **CAPITOLO 3**

## **MATERIALI E METODI**

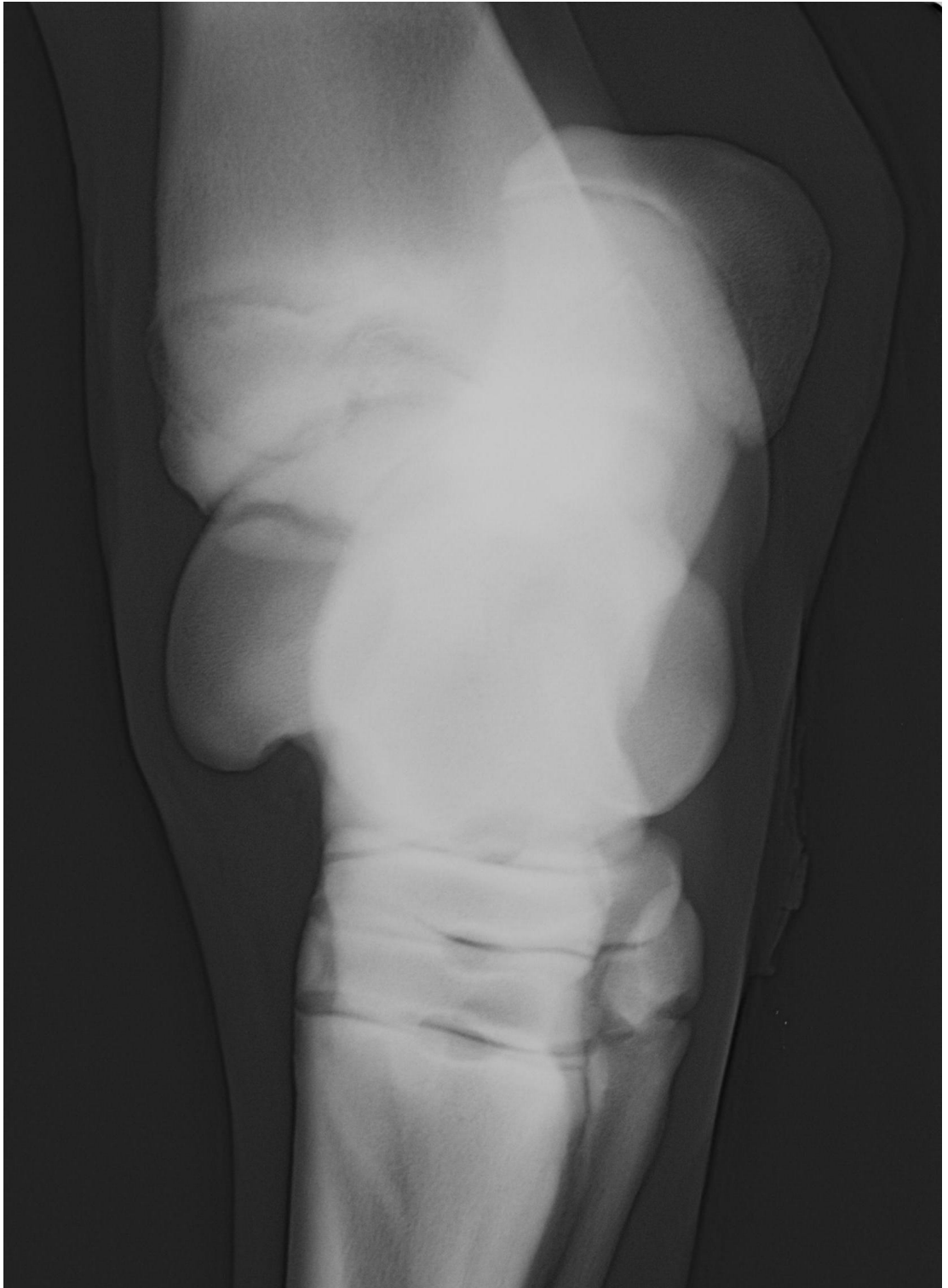
### **Materiali**

Lo studio è stato condotto su 12 equini riferiti presso la Sezione di Chirurgia e Radiodiagnostica della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Perugia. I cavalli, di sesso diverso e di età compresa tra 12 e 18 mesi, sono stati suddivisi in un gruppo di cavalli sani (CTR=n°6) e in un gruppo di cavalli affetti da Osteocondrosi dissecante (PAT=n°6).

### **Metodi**

#### **Selezione dei pazienti e campionamento del liquido sinoviale**

Il gruppo PAT era costituito da 6 animali con OCD a carico delle articolazioni tibiotarsica con frammentazione osteocondrale a livello della cresta intermedia della tibia, secondo diagnosi radiografica (Fig. 2). All'esame clinico, i pazienti presentavano una ectasia (grado 1-2/5) delle articolazioni colpite e zoppia variabile di grado 1-2/5. Nel gruppo CTR sono state valutate 6 articolazioni tibiotarsiche, tutte esenti da patologie e appartenenti a cavalli sottoposti ad eutanasia per patologie esenti da compromissione sistemica. Il liquido sinoviale (LS) è stato prelevato, seguendo le normali tecniche di asepsi, in fase preoperatoria dalle articolazioni patologiche (PAT), subito dopo l'eutanasia dalle articolazioni sane (CTR) senza contaminazione di cheratina.



**Fig. 2** *Referto radiografico, riferibile ad OCD, di un soggetto inserito nel gruppo PAT.*

### **Preparazione del campione**

Immediatamente dopo il prelievo ai campioni di liquido sinoviale è stata aggiunta una miscela di inibitori di proteasi contenente 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina, e aprotinina. I LS così ottenuti sono stati centrifugati a 2331xg per 20' a 4°C per eliminare eventuali componenti cellulari, e conservati a -80°C.

### **Dosaggio proteine**

La quantizzazione degli estratti proteici è stata effettuata determinando la concentrazione proteica mediante il metodo Bradford utilizzando il reattivo commerciale fornito dalla Bio-Rad e come standard di riferimento BSA.

### **Precipitazione**

Un'aliquota di liquido sinoviale corrispondente a 400µg di proteine totali è stata precipitata a freddo con una soluzione di solventi organici quali TBP/Acetone/Metanolo (1:12:1) 1h e 30'. Il pellet ottenuto da centrifugazione a 13500 rpm per 35' a 4°C è stato solubilizzato in tampone contenente 8M urea (Sigma-Aldrich), 2 M thiourea (Sigma-Aldrich) 4% CHAPS, 100mM DTT, 30mM di Tris, 0.8 % anfoline e tracce di blu di bromofenolo.

### **Prima dimensione - Focalizzazione Isoelettrica**

L'isoelettrofocalizzazione è stata condotta su PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), utilizzando IPG -Strip lunghe 18 cm, con gradiente di pH 4-7 e/o 3-10. Dopo 12 ore di reidratazione attiva, l'isoelettrofocalizzazione è

stata eseguita a 20 °C a 50mA/strip in 3 differenti passaggi fino al raggiungimento di 96000V/h totali.

### **Equilibratura**

La fase di equilibratura, essenziale per rendere compatibili le IPG-strip focalizzate con i componenti della SDS-page, è stata eseguita in tampone contenente 6M Urea, 20% glicerolo, 2% SDS, 375 mM Tris/HCl pH 8.8 mediante riduzione con TBP 5mM alchilazione in presenza di IAA al 2.5% .

### **Seconda dimensione – SDS-page**

La seconda dimensione è stata eseguita utilizzando il sistema Ettan DALTsix Electrophoresis System (Amersham Pharmacia Biotech) su gel di poliacrilamide in gradiente 9-16 % T (T% è la percentuale in peso del monomero totale, acrilamide+cross-linker) per i campioni di Liquido sinoviale.

La temperatura di corsa è stata mantenuta collegando il sistema elettroforetico al termostato MultiTemp III ThermostaticCirculator (Pharmacia LKB). Al termine della corsa gli spots proteici sono stati rivelati mediante colorazione Brilliant Blue Coomassie G250-Colloidale (Candiano, 2004).

### **Analisi delle immagini**

Al termine della colorazione, l'immagine di ciascun gel è stata acquisita mediante Imaging Densitometer GS-800 (BIO-RAD) ed analizzata con il software PD-Quest (BIO-RAD). Le scansioni dei gel sono state ottenute utilizzando un

filtro rosso (lunghezza d'onda 595-750 nm) 63.5 x 63.5  $\mu\text{m}$ . L'intensità del segnale di ciascuno spot è stata determinata in unità pixel (Densità Ottica, OD) e normalizzata rispetto alla somma delle intensità di tutti gli spot inclusi nell'immagine standard. Dopo aver processato i gels si possono ottenere una serie di informazioni sugli spot come area, volume altezza del picco etc. Particolarmente importante è il volume dello spot calcolato utilizzando algoritmi che sommano i pixel all'interno sottraendo il background Il software PD-QUEST consente di effettuare analisi sia qualitative che quantitative degli spot presenti sui gel messi a confronto. Per cui, sono stati confrontati per l'analisi qualitativa e quantitativa 6 differenti campioni sani e 6 differenti campioni patologici, tutti in triplicato. Il programma è in grado di creare un "master" che contiene le informazioni di tutte le immagini acquisite e inserite nel "matching" ovvero nel protocollo di confronto. Lo stesso protocollo permette l'analisi comparativa attribuendo agli stessi spot appartenenti ai diversi gel lo stesso numero SSP (Standard Spot Number). L'analisi qualitativa e quantitativa è stata eseguita raggruppando i gel ottenuti dai campioni sani e patologici in due differenti "replicate group" controllo (CTR) e patologico (PAT). L'analisi qualitativa identifica le proteine presenti in un gruppo di gel ma non nell'altro. Con l'analisi quantitativa si analizzano, rispetto al gruppo controllo, gli spot del gruppo patologico le cui intensità (valutate in termini di densità ottica, OD) sono "aumentate" o "diminuite" di un fattore che è stato posto per convenzione  $\geq 2.0$ . Di queste stesse variazioni ne è stata valutata la significatività statistica attraverso t-test ( $p < 0.05$ ).

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica per la valutazione delle differenze tra le intensità degli spot relativi ai gel confrontati è stata effettuata mediante t-test di Student integrato nel software utilizzato per l'analisi dell'immagine. I valori sono stati considerati statisticamente significativi solo per  $p < 0.05$ .

### **Analisi degli Spot mediante Spettrometria di Massa**

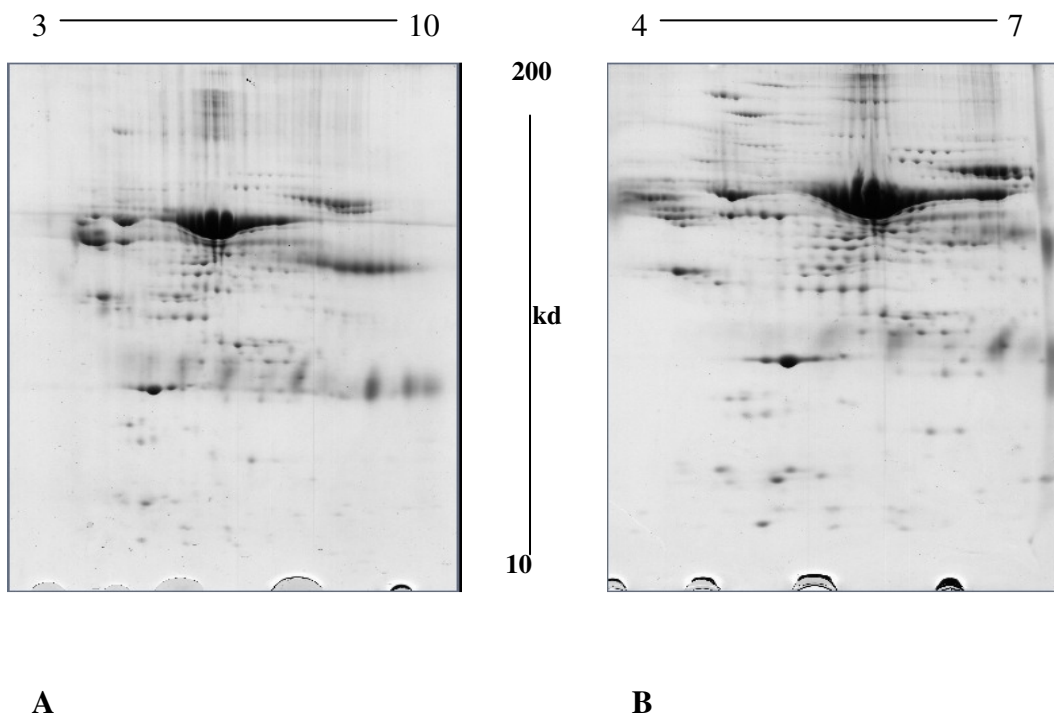
Gli spot risultati significativamente differenti sono stati escissi dal gel ed inviati al laboratorio di spettrometria di Massa dell'Istituto di Biochimica Animale dell' I.S.P.A.A.M. (Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo) C.N.R di Napoli per l'identificazione delle proteine corrispondenti mediante analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF ed LC-ESI MS/MS. Per la ricerca dei peptidi in MS/MS database è stato utilizzato il "MASCOT MS/MS ion search software" ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

## CAPITOLO 4

### RISULTATI

L'utilizzo dei protocolli descritti nel capitolo "Materiali e metodi" hanno permesso l'ottenimento di 2D-Gel di riferimento sia utilizzando intervalli di pH 3-10 che di pH 4-7 (Fig. 3). Una successiva identificazione degli spot ottenuti permetterà la determinazione di una mappa di riferimento dell'intero pattern proteico di liquido sinoviale equino normale.

Come teoricamente prevedibile, il liquido sinoviale mostra un profilo proteico molto simile ad altri fluidi biologici (plasma, siero, etc.) (Hu, 2006) con una maggiore presenza di spot nel range di pH acido.

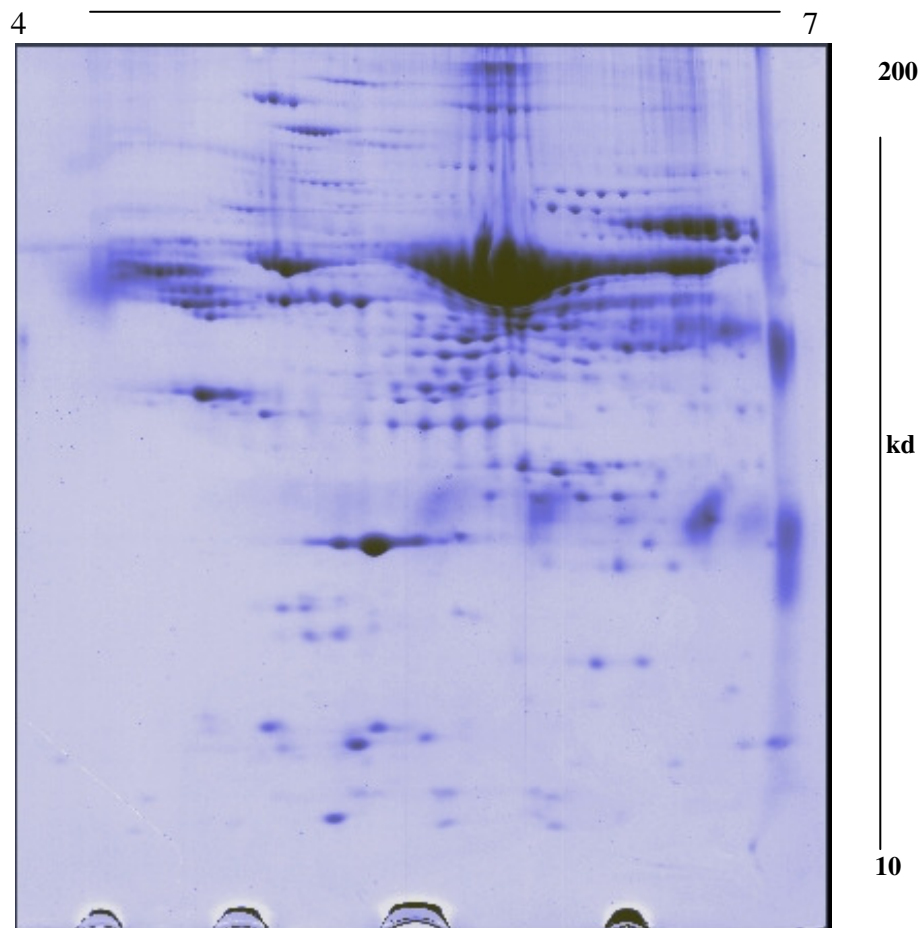


**Fig. 3** 2D- gel da SDS-page 9-16 %T con IPG strip pH 3-10 (A) e pH 4-7 (B).

La regione a pH basico appare invece ricca soprattutto di spot che, dal confronto con mappe presenti in database, risultano riferibili alle diverse catene leggere e pesanti delle immunoglobuline e a frammenti delle catene alfa e beta di emoglobina (Miller, 2004; Ritorto, 2008).

Il nostro profilo proteico di riferimento è riportato in figura 4, ottenuto dal liquido sinoviale di articolazioni sane, in cui si evidenziano circa 298-308 spot totali.

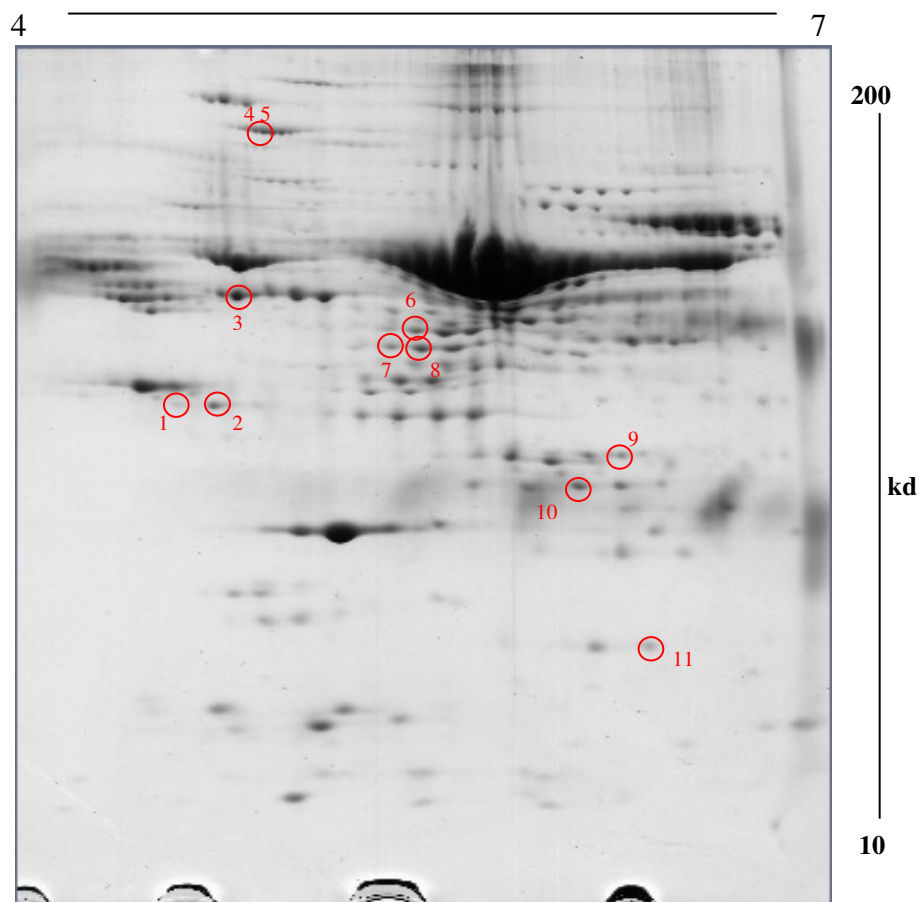
L'analisi comparativa del pattern proteico di liquido sinoviale prelevato da articolazione sane e affette da OCD è stata effettuata confrontando 6 campioni sani (CTR) e 6 campioni patologici (PAT), tutti analizzati in triplicato.



**Fig. 4** 2D-gel da liquido sinoviale equino SDSpage 9-16% T, pH 4-7.

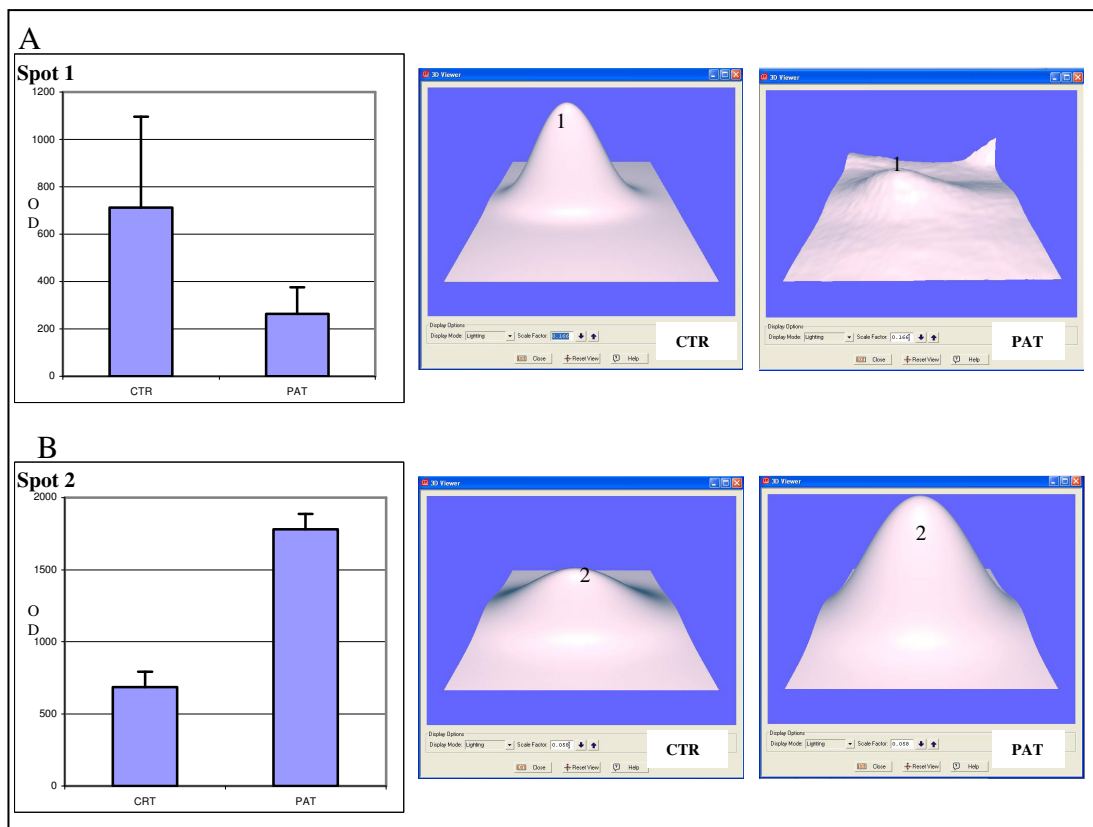
Dall'analisi differenziale, effettuata confrontando campioni sani (CTR) e campioni patologici (PAT), è emerso che il profilo proteico ottenuto da LS patologico mostra 28 spot la cui densità è differente rispetto ai controlli, di questi però solo le variazioni quantitative di 11 spot, indicati in figura 5, risultano statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

In particolare, nel LS prelevato da articolazioni affette da osteocondrosi abbiamo riscontrato una diminuzione dell'intensità degli spot identificati come 1, 3, 4, 5 e un aumento degli spot 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11.

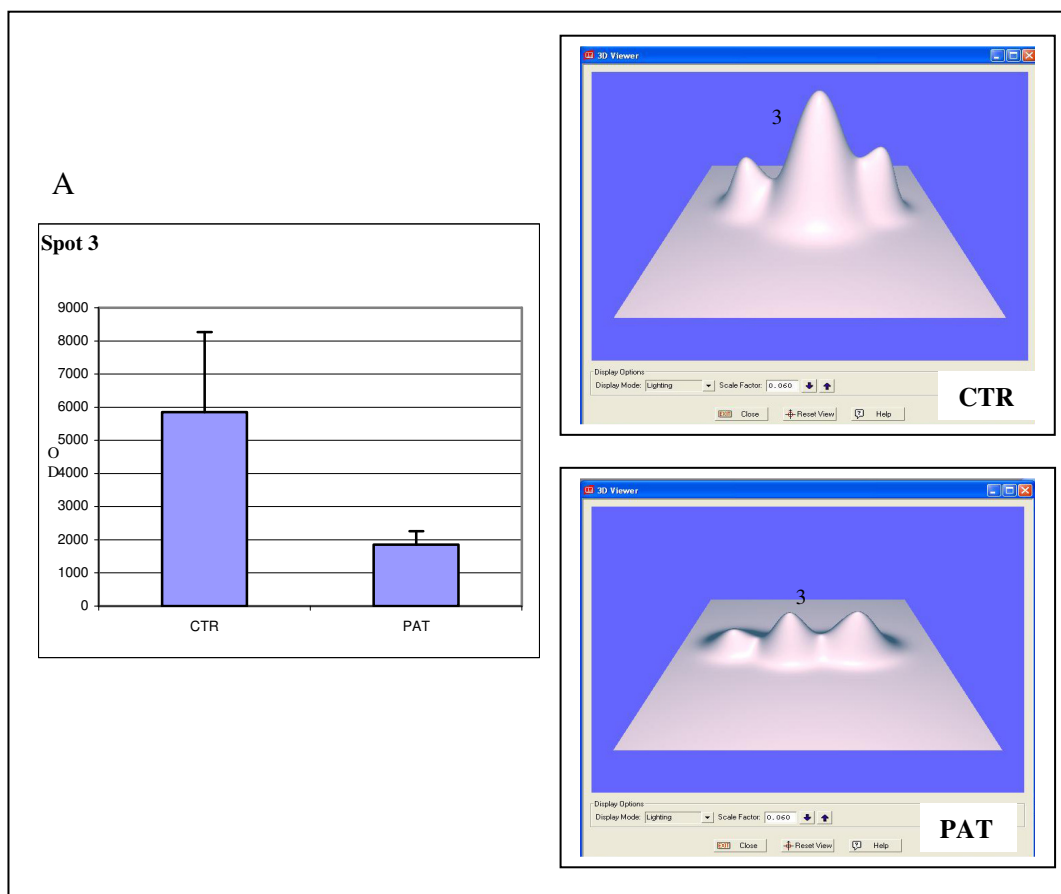


**Fig. 5** 2D-gel da liquido sinoviale equino; spot variati statisticamente significativi.

In figura 6 vengono mostrate le variazioni relative agli spot 1 e 2, consistenti in un aumento dell'intensità dello spot 2 ed una diminuzione di quelle riferibile allo spot 1, mentre in figura 7 si osserva la diminuzione dell'intensità registrata per lo spot 3. Questi spot, secondariamente ad analisi in spettrometria di massa, sono risultati essere due diverse isoforme di aptoglobina (spot 1 e 2) e Vitamina D-binding protein (spot 3).



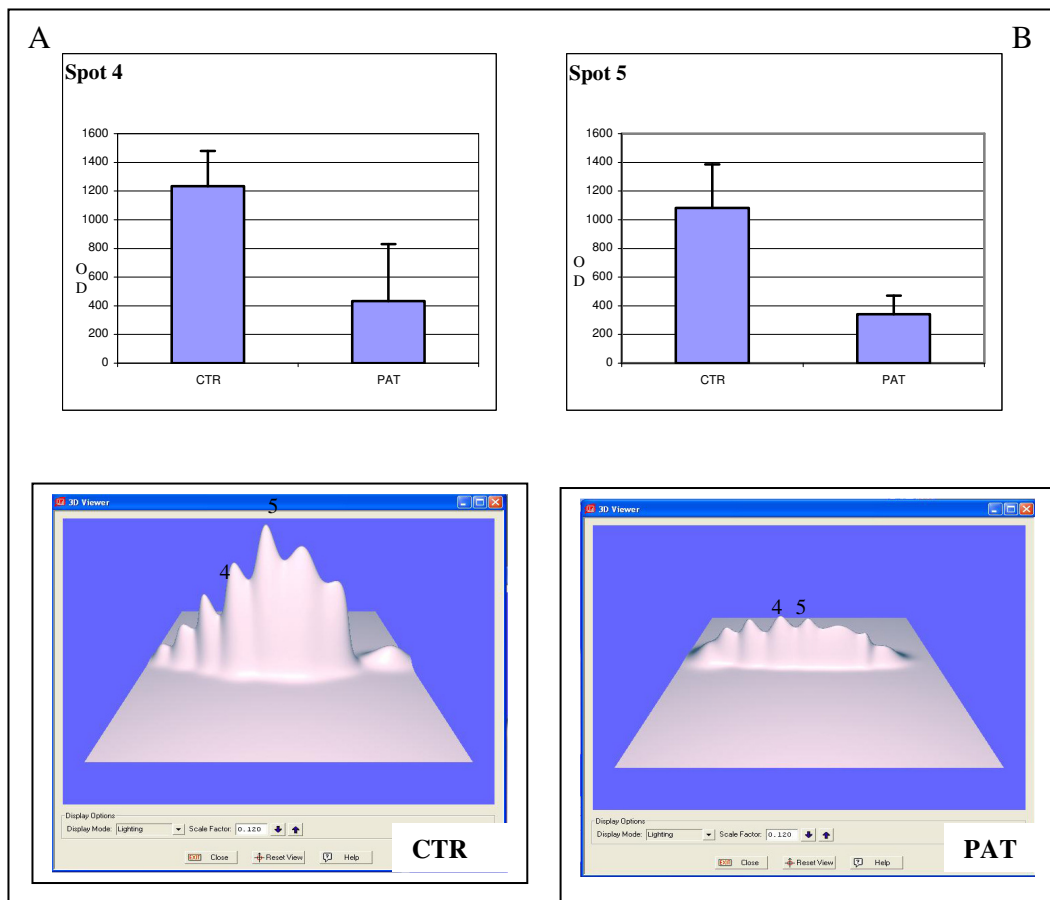
**Fig. 6** Variazioni quantitative degli spot 1 (A) e 2 (B) espresse come  $OD \pm SD$  ( $p < 0.05$ ) e relative immagini tridimensionale dell'elaborazione gaussiana, da gel rappresentativi, fornite dal software PDQuest.



**Fig. 7** Variazioni quantitative dello spot 3 (A) espresse come  $OD \pm SD$  ( $p < 0.05$ ) e immagine tridimensionale dell'elaborazione gaussiana, di gel rappresentativi, fornite dal software PDQuest del cluster di origine.

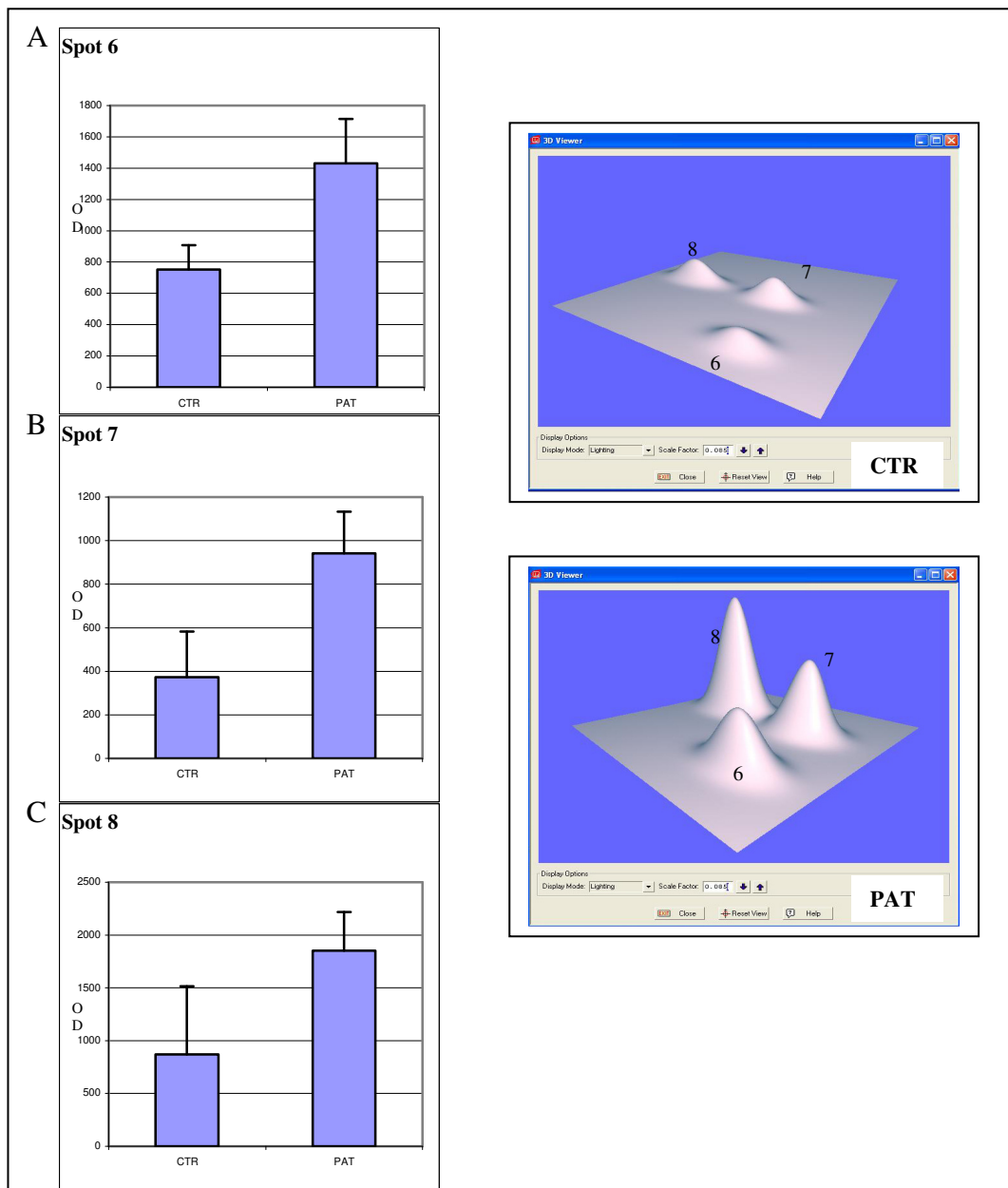
In figura 8 sono invece descritte le variazioni negative corrispondenti al cluster di spot di cui risultano statisticamente significative solo quelle associate agli spot 4 e 5.

Entrambi gli spot e quindi verosimilmente tutto il cluster sono stati identificati come ceruloplasmina.

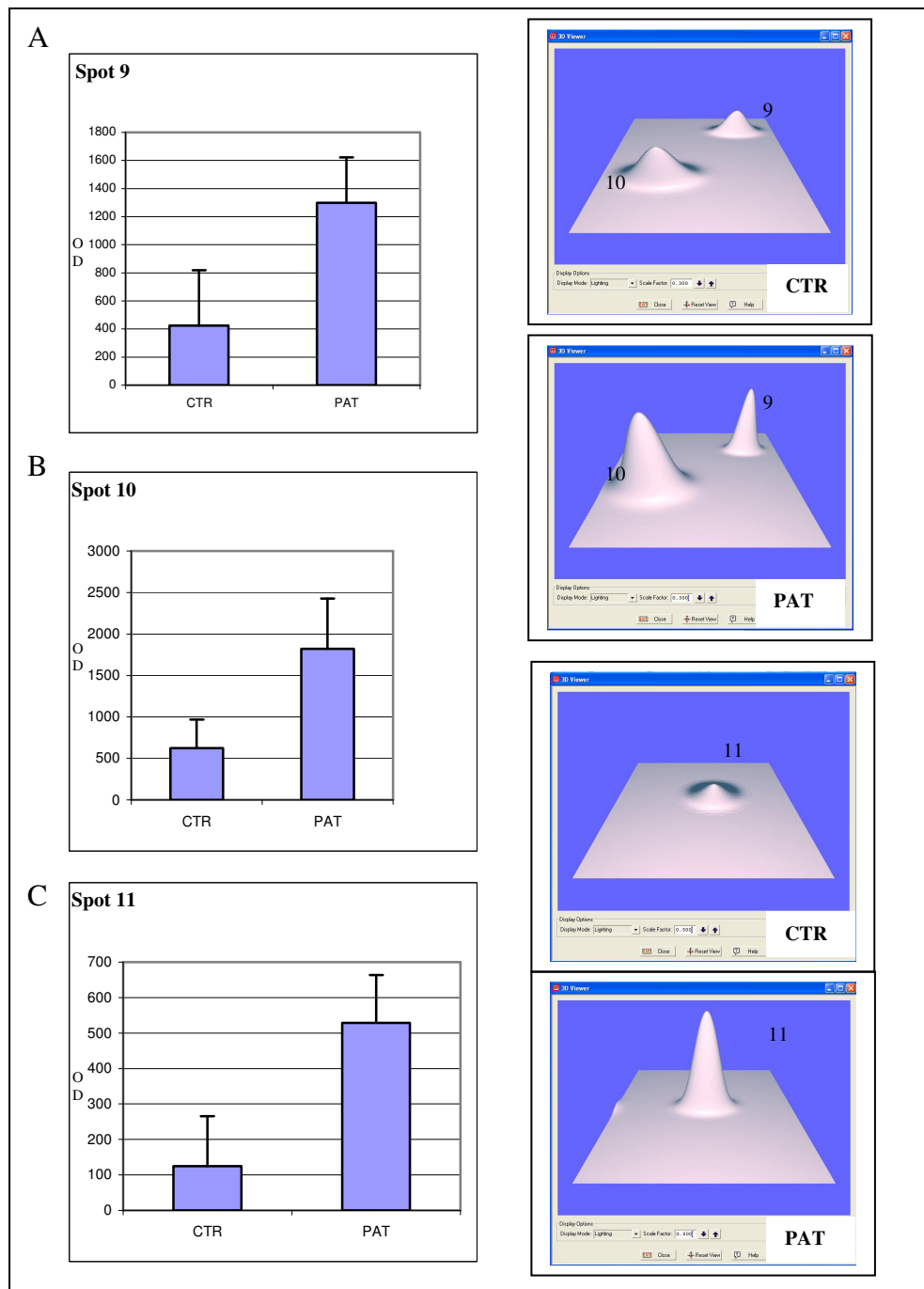


**Fig. 8** Variazioni quantitative degli spot 4 (A) e 5 (B) espresse come  $OD \pm SD$  ( $p < 0.05$ ) e immagine tridimensionale dell'elaborazione gaussiana del relativo cluster, di gel rappresentativi, fornite dal software PDQuest.

In figura 9 si possono osservare gli aumenti delle intensità degli spot 6, 7 e 8 mentre nella figura 10 quelle relative agli spot 9, 10, 11. Questi spot sono stati identificati come frammenti e diverse isoforme di albumine.



**Fig. 9** Variazioni quantitative degli spot 6 (A), 7 (B) e 8 (C) espresse come  $OD \pm SD$  ( $p < 0.05$ ) e immagine tridimensionale dell'elaborazione gaussiana, di gel rappresentativi, fornite dal software PDQuest.



**Fig. 10** Variazioni quantitative degli spot 9 (A), 10 (B) e 11 (C) espresse come  $OD \pm SD$  ( $p < 0.05$ ) e immagine tridimensionale dell'elaborazione gaussiana, di gel rappresentativi, fornite dal software PDQuest.

In tabella 1 sono riportati i risultati relativi all'identificazione delle proteine corrispondenti agli spot sopra discussi. Per ciascuna proteina è indicato il numero specifico d'accesso alla banca dati NCBI (National Centre for Biotechnology Information-Bethesda, Maryland), il nome, il peso molecolare, il punto isoelettrico sperimentale e il Mascot Score, indicante la significatività dell'identificazione. Il *Mascot Score* è definito come  $-10 \times \text{Log}P$  dove P è la probabilità assoluta che l'evento di confronto sia casuale. Minore è il valore di P maggiore è il valore del *Mascot Score*, più significativo è il parametro realizzato.

SPOT N°	NCBI accession	NOME	Mr (KDa)	pI	Mascot Score	Specie
1	149699777	Aptoglobina precur.	37.5	4.48	138	Equus caballus
2	149699777	Aptoglobina precur.	37.3	4.62	138	Equus caballus
3	149701606	Vit.D Binding Protein	56.2	4.72	340	Equus caballus
4	149729967	Ceruloplasmina precur.	148.4	4.83	391	Equus caballus
5	149729967	Ceruloplasmina precur.	148.2	4.86	391	Equus caballus
6	126723507	Albumina precur.	48.8	5.47	466	Equus caballus
7	126723507	Albumina precur	45.5	5.37	410	Equus caballus
8	126723507	Albumina precur	45.3	5.49	410	Equus caballus
9	126723507	Albumina precur	32.2	6.20	326	Equus caballus
10	126723507	Albumina precur	28.6	5.97	1231	Equus caballus
11	126723507	Albumina precur	17.7	6.45	112	Equus caballus

**Tab.1** Identificazione degli spot le cui variazioni sono risultate statisticamente significative ( $p < 0.05$ )

Come si evince dalla tabella, tutte le proteine sono state identificate mediante sovrapposizione delle sequenze peptidiche, ottenute dagli spot in analisi, con quelle note, presenti nei database, riferibili a specie omologa.

## **CAPITOLO 5**

### **DISCUSSIONI E CONCLUSIONI**

#### **DISCUSSIONI**

La standardizzazione dei protocolli sperimentali ci ha permesso di ottenere 2DE-gel di riferimento sia a range di pH 4-7 che pH 3-10. L'identificazione delle proteine corrispondenti a tutti gli spot risolti permetterà la definizione dell'intero pattern proteico del liquido sinoviale equino arricchendo le informazioni sul proteoma della specie. Queste mappe potranno essere di notevole utilizzo per altri studi differenziali riguardanti patologie articolari, che rimangono ancora oggi di particolare interesse per la medicina equina. Il confronto delle diverse isoforme proteiche con quelle di plasma e siero della stessa specie potrà essere utile per stabilire l'origine delle stesse e confermare quanto marker ematici proteici, ritenuti indicativi di situazioni articolari, siano effettivamente tali o altrimenti correlabili a situazioni sistemiche. Va comunque sottolineato che, i 2DE-gel di riferimento presentati sono da ritenersi delle mappe integrali ottenute dall'intero contenuto proteico della matrice, quindi ricco di proteine particolarmente abbondanti che probabilmente mascherano proteine di origine articolare presenti in concentrazioni più basse. Pertanto, un ulteriore sviluppo potrebbe essere rappresentato dall'aggiunta di step di pre-frazionamento allo scopo di arricchire gli estratti di peptidi meno abbondanti, ma importanti come marker articolari. Questi rimangono ancora evidenziabili solo con metodiche altamente specifiche,

come l'immunoblotting in grado di fornire una osservazione del fenomeno limitata e circoscritta. Probabilmente l'utilizzo di campioni tal quale rimane la ragione principale per cui abbiamo evidenziato, in campioni di liquido sinoviale proveniente da articolazioni affette da OCD, modificazioni quali-quantitative solo riferibili ad aptoglobina, vitamina D binding protein (VDBP), ceruloplasma e albumine. Tuttavia l'analisi e il significato di tali variazioni ci portano ad affermare che esse sono correlabili alla presenza di uno stato patologico, che incide notevolmente sull'attività metabolica dell'articolazione, e probabilmente ad una componente infiammatoria.

L'aptoglobina è una glicoproteina della fase acuta sintetizzata dal fegato, la cui produzione sembra maggiormente indotta dall'attività dell'IL-6, propria dei processi flogistici. La sua funzione principale è l'eliminazione di emoglobina dal torrente circolatorio in seguito alla formazione di un complesso riconosciuto e degradato dal sistema reticolo endoteliale. Tale complesso, Aptoglobina-Emo, riduce la disponibilità del Ferro libero per la Reazione di Fenton e Haber-Weiss, generando radicali liberi in grado di compromettere l'integrità del doppio strato lipidico delle pareti cellulari mediante per ossidazione lipidica. Queste proprietà giustificano il motivo per cui molti autori attribuiscono all'aptoglobina funzioni antiossidanti relativamente alla capacità di diminuire il  $Fe^{+2}$  circolante. L'intervento sulla produzione di radicali liberi sembra essere esercitata anche grazie a proprietà antiossidanti intrinseche dell'Aptoglobina, riferite superiori a quelle dell'acido ascorbico, e in grado di intervenire sulla moderazione del burst respiratorio dei neutrofili al momento della risposta infiammatoria, pertanto

attribuendo un'attività anti-infiammatoria all'Aptoglobina, o per lo meno ad alcune sue isoforme.

A tale glicoproteina si attribuisce inoltre un ruolo diretto nella modulazione della risposta immunitaria, nelle patologie autoimmuni e negli eventi infiammatori, perché in grado di intervenire sull'attivazione dei neutrofili e di inibire il rilascio di citochine  $T_H1/T_H2$  e la produzione di enzimi ciclo-ossigenasi (COX) e lipo-ossigenasi (LOX), coinvolti nella produzione di leucotrieni e citochine dall'acido arachidonico (Quaye, 2008).

Ad oggi, studi condotti nella specie umana sono stati in grado di identificare la struttura dell'Aptoglobina, costituita da due subunità proteiche  $\alpha$  e  $\beta$  unite da ponti solfuri in seguito a processi post-traduzionali, e come variazioni della subunità  $\alpha$  diano luogo ai fenotipi più comuni (Hp1-1; Hp2-2; Hp2-1) o generino fenotipi mutati (Hp2-1M; Hp0) con forme di ipo- o a-aptoglobulinemia in determinate etnie (Quaye, 2008). Pertanto, nella valutazione delle possibili funzioni di tale proteina, va considerato che l'aptoglobina è presente nei fluidi biologici in diverse isoforme e in diverse varianti fenotipiche e che di alcune di esse non è stato completamente definito il ruolo biologico; in aggiunta, la notevole variabilità interindividuale nelle risposte dell'aptoglobina (Yamagiwa, 2003; Sinz, 2002) rende un'ulteriore difficoltà nel predirne o interpretarne le eventuali fluttuazioni quantitative sia locali che sistemiche.

Uno studio condotto su 24 cavalli di razza Purosangue Inglese ha dimostrato come l'inoculazione di Amfotericina B in articolazioni mediocarpiche sia stata in grado di suscitare uno stimolo flogistico acuto tale da indurre un significativo aumento di alcune proteine della fase acuta, compresa l'aptoglobina. Tale aumento è stato

imputato al notevole stimolo flogistico indotto dalla reattività articolare, tale da suscitare una produzione di citochine infiammatorie che per via sistemica hanno stimolato la produzione di proteine della fase acuta da parte del fegato. Tuttavia, restano ancora da chiarire se esistono processi fisiopatologici che mettano in diversa relazione la produzione sistemica delle proteine della fase acuta, quali potenziali modulatori della flogosi in sedi distrettuali periferiche, come le articolazioni affette da patologie degenerativo-metaboliche, e se esistono isoforme e varianti differentemente espresse in sede locale (Hultèn, 2002).

L'analisi del liquido sinoviale prelevato da articolazioni affette da patologie articolari ha per esempio evidenziato, in maniera del tutto sovrapponibile ai nostri risultati, che mentre alcune isoforme aumentano in maniera sistematica indipendentemente dal tipo di patologia articolare considerata, altre si rinvengono invece invariate ed altre ancora addirittura diminuite (Gibson, 2006; Gibson, 2009; Sinz, 2002).

Seppur apparentemente contraddittorie queste osservazioni sono del tutto giustificabili in virtù dei diversi ruoli svolti dall'aptoglobina e di tutte le considerazioni fin qui riportate. Se, infatti, un aumento è registrabile in fase acuta, va ricordato che una delle strategie difensive messe in atto dall'aptoglobina è la formazione di complessi che riducono le sue forme circolanti. Per le patologie articolari questo trova conferma e giustificazione nella capacità dell'aptoglobina di legare le metalloproteasi (MP-1, MP-3 e MP-9), che risultano inibite, e l'acido ialuronico, che ne risulta protetto e meno suscettibile ai processi degradativi (Quaye, 2008; Bannikov, 2007).

La nota compromissione delle proprietà viscoelastiche del liquido sinoviale appartenente ad articolazioni affette da patologia è sempre stata imputata alla diminuzione della concentrazione e del peso molecolare dell'acido ialuronico contenuto in tali articolazioni, come risultato della sua depolimerizzazione da parte dei radicali liberi, alla cui produzione sono deputati i leucociti polimorfonucleati e i macrofagi in sede infiammatoria, anche articolare.

Alcuni studi hanno dimostrato come l'acido ialuronico proveniente da articolazioni affette da Artrite Reumatoide (RA) sia legato ad alcune proteine in percentuale maggiore rispetto a quello da articolazioni sane. In uno studio condotto su 201 soggetti, nel 46% di pazienti affetti da RA il contenuto percentuale di proteine legate all'acido ialuronico risultava >4% contro 1% nei soggetti sani. Il 29.2% delle proteine legate è stato identificato quale aptoglobina, validandone inoltre la capacità di proteggere l'acido ialuronico dagli effetti degradativi dei radicali liberi da ossigeno (Hutadilok, 1988).

Recentemente, è stato ipotizzato un ruolo essenziale dell'aptoglobina nei processi di migrazione cellulare e degradazione della matrice extracellulare propri delle patologie neoplastiche e osteoartriti, motivando la realizzazione di uno studio sperimentale volto ad investigare le modificazioni dell'espressione locale dell'aptoglobina in tali processi. Viene così verificato l'effettivo aumento dell'espressione locale di mRNA-aptoglobina a livello delle articolazioni artritiche di animali da laboratorio, al fine di escludere che l'aumento possa essere attribuibile ad ultrafiltrazione vasale in occasione dell'evento flogistico. Gli autori suppongono che tale aumento dell'espressione proteica possa costituire un meccanismo per ottenere un'elevata concentrazione locale di aptoglobina in grado

di intervenire sul processo degradativo della matrice extracellulare, sia in occasione di artrite che di patologia neoplastica, o l'espressione della produzione di un'aptoglobina distinta da quella di origine epatica. Viene descritta, infatti, la possibilità di modificazioni del pattern di glicosilazione post-traduzionale della catena  $\beta$  dell'aptoglobina in corso di processi patologici. Gli autori, pertanto, non escludono l'aumento dell'espressione locale di aptoglobina con un diverso pattern di glicosilazione possa riflettersi in una funzione differente rispetto all'aptoglobina di nota origine epatica (Smeets, 2003).

In virtù delle argomentazioni affrontate, è possibile pertanto affermare che una corretta analisi del significato di queste proteine può avvenire solo attraverso l'utilizzo di metodiche selettive in grado di evidenziare tutte le possibili varianti ed isoforme, al fine di identificarle e definire i potenziali e diversi ruoli nella patologia osteoarticolare, così come in altre, previa loro indagine con studi sia in vitro che in vivo.

La VDBP è una  $\alpha$ -globulina deputata soprattutto al trasporto della Vitamina D e dei suoi metaboliti, l'88% del contenuto sierico di 25(OH)D<sub>3</sub> e l'85% di 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, oltre che al sequestro di actina, al trasporto di acidi grassi, al controllo e modulazione dello sviluppo osseo. La sua sintesi avviene prevalentemente nel parenchima epatico, anche se molti altri sistemi cellulari sono in grado di produrla, ed è possibile ritrovarla nel fluido cerebrospinale, liquido seminale, latte, saliva e ovviamente nel sangue (Gomme, 2004; Fang, 2009).

L'analisi del significato metabolico della VDBP non può prescindere dal considerare innanzitutto gli steroli da essa veicolati e le loro funzioni, tra le quali di nostro interesse, quelle coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi del calcio.

Come ormai noto da tempo infatti la Vitamina D favorisce la demineralizzazione e il rilascio di calcio e fosforo, pertanto modulando i processi di ossificazione. Basse disponibilità metaboliche di questa vitamina sono state da sempre associate a patologie del sistema scheletrico o ad anomalie del rimodellamento osseo (Van den Berghe, 2003). Considerando lo stretto legame esistente tra la vitamina D e il suo trasportatore è facile ricondurre entrambe le molecole alle patologie articolari. In realtà l'associazione tra VDBP e patologie ossee si amplia nella recente identificazione di un suo metabolita, la VDBP-MAF (Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor), considerato come potente stimolatore dell'attività osteoclastica.

La VDBP-MAF deriva dalla rimozione di un residuo di acido sialico o di galattosio dalla VDBP ed è in grado di legarsi in maniera specifica ad un recettore di membrana degli osteoclasti coinvolto nel feedback cellulare, che ne down-regola l'attività in seguito all'aumento del calcio extracellulare (Gomme, 2004). La VDBP-MAF inibisce questo feedback e di conseguenza mantiene alta l'attività osteoclastica in presenza di calcio extracellulare a basse concentrazioni; in sede infiammatoria la sua produzione di sembra essere indotta dai linfociti T attivati. Sebbene la VDBP/VDBP-MAF sia stata associata al riassorbimento osseo, gli stessi autori suggeriscono un ruolo della VDBP molto più generalizzato nella formazione dell'osso e nel suo rimodellamento, in virtù del fatto che sia essa che il suo VDBP-MAF sono risultati in grado di promuovere neoformazione ossea in modelli animali, grazie alla presenza di un dominio aminoacidico che sembrerebbe mediare tale funzione (Adebanjo, 1998; Gomme, 2004). La VDBP-MAF è inoltre implicata non solo nella stimolazione del rimodellamento ma anche

nella correzione di difetti dello sviluppo scheletrico congeniti o secondari a patologie di diversa natura (Schneider, 2003). La valutazione di queste diverse funzioni attribuite alla VDBP evidenzia, comunque, un suo ruolo essenziale nella modulazione del metabolismo osteoarticolare, sia direttamente che indirettamente, e questo ne spiega la presenza inequivocabile nel liquido sinoviale come da noi osservato in questo lavoro e confermato da recentissimi studi di medicina umana (Gibson, 2009). Risulta altrettanto logico a questo punto ipotizzare spiegare il significato di un suo decremento nei soggetti affetti da patologie correlate ad anomalie dell'ossificazione, come l'osteochondrosi. L'ossificazione è, infatti, un processo garantito dall'equilibrio esistente tra l'attività di sintesi degli osteoblasti e quella di demolizione degli osteoclasti. Venendo a mancare un fattore osteoclasto-trofico come la VDBP, gli osteoblasti hanno il sopravvento, traducendosi in un ispessimento con ipermineralizzazione dell'osso o in una maggior fragilità per la mancata rimozione del tessuto metabolicamente più anziano. L'importanza della VDBP nelle patologie del sistema osseo è a tal punto testimoniata dai protocolli terapeutici sperimentali, che ne prevedono l'iniezione diretta in articolazione, per il trattamento di osteoporosi e osteopetrosi (Fang, 2009; Gomme, 2004; Schneider, 2003).

Analogamente la riduzione della VDBP è facilmente associabile ad una diminuita disponibilità di vitamina D, la cui correlazione a patologie articolari è stata ampiamente dimostrata. In un recente studio, sono state indagate le correlazioni tra contenuto di VDBP e metaboliti della vitamina D nel siero e nel liquido sinoviale di soggetti affetti da osteoartrite, artrite reumatoide e altre forme miscelanee di artropatia (es. gotta, psoriasi). Sebbene una correlazione diretta con

ratio siero:liquido sinoviale di 2:1 sia stata evidenziata per la VDBP e 25(OH)D<sub>3</sub> indipendentemente dal tipo di patologia articolare, tale correlazione non è stata riscontrata per 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Secondo studi condotti in vitro su colture cartilaginee e condrocitarie, il metabolita 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> è ritenuto essere direttamente coinvolto nella mineralizzazione ossea ed esser prodotto in sede articolare a partire dal precursore 25(OH)D<sub>3</sub>; quest'ultimo, come altri metaboliti della vitamina D disponibili per via sistemica, entra nella costituzione del liquido sinoviale mediante l'ultrafiltrazione. Le alterazioni delle concentrazioni di 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, riscontrate nello studio riportato, sarebbero dunque motivate da una sua produzione locale in sede articolare. Pertanto, è facilmente intuibile come il metabolismo del 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, dimostrato utile alla mineralizzazione ossea e all'omeostasi articolare, possa dipendere dalla disponibilità dei metaboliti precursori veicolati dalla VDBP e come un deficit di quest'ultima possa determinare effetti negativi a cascata sull'esplicazione delle funzioni metaboliche proprie del 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; rendendo possibile l'ampliamento di tali valutazioni anche nei confronti dei suoi congeneri (Fairney, 1987).

La disponibilità delle forme attive della Vitamina D, correlata alla capacità veicolante della VDBP, sembra intervenire nella produzione di una proteina coinvolta primariamente nel metabolismo del calcio, la Vitamin D-dependent Calcium Binding Protein (CaBP). Essa sembra intervenire nel movimento del calcio dal comparto cellulare a quello extracellulare, generando un processo di calcificazione mediante la deposizione del minerale a livello della matrice; inoltre, si ritiene che la CaBP svolga un ruolo di tutela nei confronti dei condrociti in occasione dell'aumentato flusso di calcio. Nel tessuto cartilagineo in via di

calcificazione, la presenza di recettori condrocitari per la Vitamina D, distribuiti similmente a quelli per la CaBP, suffraga ulteriormente il ruolo della Vitamina D nei confronti della sintesi della CaBP (Zhou, 1986).

È stata descritta una differente distribuzione della CaBP a livello della zona di maturazione dei condrociti con una sua diminuzione fino ad una completa assenza procedendo verso la zona ipertrofica. Parallelamente alle modificazioni morfo-funzionali dei condrociti in accrescimento, la proteina sembra localizzarsi diversamente rispetto alla cellula stessa, risultando intracellulare a livello dei condrociti maturi, ridistribuendosi a livello dei processi citoplasmatici fino ad essere extracellulare a livello dei setti longitudinali propri dell'area di mineralizzazione della zona ipertrofica adiacente. La distribuzione della proteina sembrerebbe, pertanto, associarsi a quelli che sono i processi di maturazione e differenziativi della cartilagine in accrescimento, fino a ritenerla un indicatore della maturazione condrocitaria (Balmain, 1986).

Ulteriore conferma circa l'intervento della Vitamina D sull'ossificazione e i ruoli da essa mediati in tale processo deriva dall'identificazione dell'azione preventiva sulla capacità differenziativa condrocitaria svolta da parte del metabolita  $1,25(\text{OH})\text{D}_3$  nei confronti della discondroplasia tibiale nelle specie avicole in accrescimento. Tale evidenza, riscontrata mediante confronto con l'attività di prodotti analoghi di sintesi (RO 23-7553), permette di avanzare l'ipotesi che tale attività preventiva possa essere relazionata alla maggiore affinità di legame del  $1,25(\text{OH})\text{D}_3$  con la VDBP, garantendo l'esplicazione dei meccanismi precedentemente presentati, e, pertanto, alla maggior capacità di intervenire sulla

captazione del calcio a livello condrocitario, rispetto agli analoghi sintetici (Farquharson, 1996).

Queste evidenze permettono di attribuire un ruolo primario della VDBP nella capacità differenziativa dei condrociti in accrescimento, giustificando come essa, quale trasportatore delle Vitamina D e suoi metaboliti e mediatore della sintesi di CaBP, e un suo deficit possano patogeneticamente integrarsi nelle alterazioni morfologiche proprie dell'OCD, storicamente definita come turba dell'ossificazione endocondrale.

La ceruloplasmina è una metalloproteina in grado di legare e veicolare circa il 90-95 % del rame presente nei tessuti e nei fluidi biologici di tutti i vertebrati, ed è perciò considerata un indicatore dello stato funzionale di questo elemento. Tra le sue funzioni vanno inoltre ricordate le attività ferro-ossidasi e rame-ossidasi, l'ossidazione di ammine organiche e la capacità di scavenging dell'ossigeno singoletto ( $O_2^{\bullet}$ ), dell'anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e del radicale idrossilico ( $^{\bullet}OH$ ). Possiamo pertanto dedurre che dalla ceruloplasmina dipendono le attività delle proteine e dei processi molecolari in cui sono coinvolti i metalli di transizione. L'ossidazione del  $Cu^{+1}$  a  $Cu^{+2}$  e del  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$  ne favorisce infatti l'incorporazione nelle proteine trasportatrici e negli enzimi di cui costituiscono i cofattori.

La scoperta di specifici recettori di membrana per la ceruloplasmina in diversi tipi di cellule ha confermato il ruolo predominante di questa proteina nel trasporto del rame e nella regolazione indiretta della sintesi di tutti gli enzimi rame dipendenti (Badadani, 2007). Un buon apporto di rame è importante per garantire il corretto funzionamento degli enzimi antiossidanti, come Cu Superossido dismutasi

(CuSOD), e dei meccanismi della respirazione cellulare, intervenendo esso come cofattore dei citocromi (Fife, 1994).

Un'indagine condotta circa l'eventuale correlazione tra il metabolismo del rame e l'incidenza della discondroplasia nelle specie avicole ha evidenziato una diminuita capacità ossidativa del glucosio in CO<sub>2</sub> e acqua posseduta dai tessuti patologici rispetto ai sani, potenzialmente correlabile all'alterata attività della citocromo ossidasi. Sebbene non siano stati riscontrati danni mitocondriali che potessero giustificare in maniera diretta tale alterazione e siano da indagare ulteriormente i meccanismi alla base di tale evidente alterazione funzionale, si evince il potenziale coinvolgimento della citocromo ossidasi nella turba discondrodisplasica avicola, assimilabile all'osteochondrosi dei mammiferi (Lilburn, 1980; Wardale, 1996).

Il rame interviene, inoltre, nell'azione di un altro enzima, la lisil-ossidasi. Essa è un ossidoreduttasi extracellulare particolarmente importante per il metabolismo cartilagineo poiché catalizza la deaminazione ossidativa dei residui di lisina presenti nel procollagene, favorendo così il cross-linking tra le molecole di collagene. La formazione di legami intermolecolari è essenziale alla stabilità del collagene e all'integrità della matrice extracellulare. Il minor apporto dell'oligoelemento comporta una riduzione della stabilità strutturale del tessuto connettivo riguardo essenzialmente al collagene e l'elastina, soprattutto degli animali in crescita (Badadani, 2007). L'importanza dei legami cross-link dovuti alla lisil-ossidasi è stata dimostrata, infatti, da studi in cui l'attività dell'enzima è stata inibita tramite carenze nutrizionali del rame o la somministrazione di inibitori specifici.

Nella specie equina, i primi studi sono stati condotti indagando la potenziale correlazione tra la concentrazione sierica di rame e ceruloplasmina e l'incidenza di lesioni osteocondrali, discutendo la significatività dei dati acquisiti mediante confronto con lesioni simil-osteocondrali riscontrate in specie diverse in seguito a deficienza del metabolismo del rame per somministrazione di molibdeno o inibizione dell'attività della lisil-ossidasi beta-aminopropionitrile-indotta (Bridges, 1984).

Una sperimentazione condotta su puledri sottoposti a carenza alimentare dell'oligoelemento, monitorata con dosaggio della concentrazione sierica ed epatica, ha prodotto lesioni osteocondrali riferibili a OCD. La stima del grado di solubilità del collagene presente nei campioni cartilaginei e aortici dei soggetti deficitari ha evidenziato percentuali da 3 a 5 volte superiori a quelle ottenute nei soggetti di controllo; l'aumento del collagene solubile è stato correlato alla sua diminuita polimerizzazione, con deficit dei cross-links intermolecolari, per riduzione dell'attività enzimatica della lisil-ossidasi (Bridges, 1988).

Studi successivi hanno confermato tale ipotesi mediante dosaggio dei cross-links di collagene a livello delle lesioni osteocondrali nella specie equina, idrossilisilpiridinolina e lisilpiridinolina (Van de Lest, 2004), e nella specie suina, idrossilisilpiridinolina, idrossilisil-ketonorleucina e deidro-idrossilisisonorleucina (Wardale, 1994).

Tuttavia, la presenza di dati contraddittori in bibliografia mantiene viva la discussione circa il ruolo primario del rame nel determinismo della patologia. Alcuni studi hanno confutato l'enfasi attribuita alle responsabilità dell'oligoelemento nella turba osteocondrotica, evidenziando la scarsa

correlazione tra la sua integrazione della gestante pre-partum e del puledro fino allo svezzamento e l'incidenza della lesioni osteocondrali (Gee, 2005; Gee, 2007). Il rame tuttavia sembrerebbe rivestire, comunque, un ruolo fondamentale nella progressione della patologia influenzando la possibile manifestazione clinica. Esso sembra essere in grado di intervenire sul processo involutivo-riparativo delle lesioni osteocondrali, talvolta in maniera differenziale in funzione delle articolazioni affette, verosimilmente effetto correlabile alla diversa tempistica propria dei processi maturativi in atto in articolazioni distinte (van Weeren, 2003). Da quanto sopra, si evince che una riduzione della ceruloplasmina nel liquido sinoviale indica sicuramente un'alterazione dello stato redox articolare, con uno sbilanciamento verso le condizioni ossidanti e produzione di radicali liberi dell'ossigeno. In aggiunta, le stesse variazioni possono indicare una riduzione dell'attività degli enzimi rame dipendenti coinvolti nel metabolismo della matrice cartilaginea, intervenendo sul crosslinking delle catene di collagene. Sebbene sia ancora da confermare il ruolo primario del rame nel determinismo dell'osteocondrosi, non deve essere comunque sottostimata la sua potenziale responsabilità nella evoluzione fisiopatologica della malattia, come dimostrato per altre patologie articolari (Rees, 2008).

L'aumento degli spot identificati come corrispondenti a precursori di albumina può essere interpretato come conseguenza della formazione di frammenti proteici, generati dalla proteolisi della stessa albumina, catalizzata dalle metalloproteasi, enzimi che in articolazioni affette da OCD risultano particolarmente attive (Kuroki, 2005). Una variazione delle componenti albuminiche del liquido sinoviale può sicuramente comportare un diverso

rifornimento di tutti quei metaboliti da esse veicolati ed in particolare una diminuzione dell'apporto di nutrienti. Queste variazioni potrebbero quindi rappresentare un'ulteriore dimostrazione dell'alterazione dell'omeostasi articolare che può condurre a squilibri metabolici, che sicuramente potrebbero contribuire all'instaurarsi di quei fattori predisponenti alla degenerazione dei processi di ossificazione.

Riassumendo, il decremento della ceruloplasmina sottolinea da un lato un deficit metabolico nell'attività di enzimi rame-dipendenti, implicati nella sintesi e stabilizzazione di tessuti connettivi come il collagene, e dall'altro una minore capacità del sistema di intervenire per contrastare le variazioni associate a stress ossidativo.

La diminuzione della VDBP facilmente si può correlare al ridotto apporto di Vitamina D nell'articolazione, fondamentale per il corretto susseguirsi delle fasi dell'ossificazione, e ad una ridotta attività della proteina stessa nella stimolazione degli osteoclasti, con un conseguente deficit quali-quantitativo nel rimodellamento osseo.

Significativo è poi l'aumento di precursori delle albumine sieriche, evento interpretabile come un'intensificazione dell'attività di proteasi associato alla patologia, e quello dell'aptoglobulina. In realtà, il comportamento bivalente di questa proteina, che si rinviene aumentata per alcune isoforme e diminuita per altre, è spiegabile da un lato considerandola come proteina della fase acuta e dall'altro come polipeptide implicato nella protezione del collagene e nell'inibizione delle metalloproteasi.

## CONCLUSIONI

Nel corso della dissertazione introduttiva è stato possibile apprezzare come diversi siano stati i tentativi finora dedicati alla comprensione dell'Osteocondrosi. Se alcuni studi hanno ben descritto gli aspetti morfologici circa le alterazioni indotte dalla patologia, altri studi sono stati in grado di proporre ipotesi circa l'intervento di fattori eziologici e l'evoluzione del processo patogenetico determinanti le lesioni osteocondrotiche. È evidente pertanto come i numerosi decenni dedicati allo studio di questo difetto dell'ossificazione endocondrale siano stati caratterizzati da differenti correnti scientifiche intenzionate a comprendere la complessità dell'Osteocondrosi, portando all'identificazione di classi eziologiche di diversa natura. L'intervento e il coinvolgimento di numerosi fattori, verosimilmente unico punto di certezza eziopatogenetica, non permette di distinguere l'esistenza di una primogenitura di uno di essi o la necessità di coesistenza di alcuni per l'insorgenza delle alterazioni nell'ossificazione.

Nel determinare tali difficoltà di comprensione, oltre all'intrinseca complessità del processo patologico, intervengono limiti di aspetto pratico per l'applicazione di un approccio scientifico metodico. Molti studi sono stati condotti su lesioni diagnosticate radiograficamente, grazie alla maggior reperibilità di materiale per il campionamento che questo tipo di lesioni offre e a causa della contingenza di studi condotti su basi cliniche. Solo pochi studi hanno avuto la possibilità di indagare lesioni precoci, grazie alla disponibilità di soggetti destinati alla

sperimentazione o condotti su specie, quale quella suina, con reperimento incondizionato di soggetti destinati al campionamento.

La ricerca presentata in questo lavoro di tesi ha incontrato, purtroppo, limiti sovrapponibili ai precedenti, legati all'impossibilità di utilizzare le lesioni precoci dell'Osteocondrosi quale materiale di analisi.

Sebbene tali circostanze possano risultare limitanti, ad oggi, ai primordi dell'analisi proteomica in medicina veterinaria, esse devono essere ritenute come il punto di partenza per indagare in maniera retrograda i processi caratterizzanti la patologia in esame. L'integrazione del quadro clinico e delle informazioni acquisite mediante l'analisi del pattern proteico descrive un processo osteocondrotico primario concomitante con un evento flogistico secondario. La discussione circa il significato metabolico delle proteine, espresse in maniera differenziale tra soggetti sani e affetti da Osteocondrosi, ha permesso di identificare la potenziale correlazione con ciascuno dei due eventi.

La possibile applicazione dell'analisi proteomica anche per lo studio delle lesioni precoci, qualora fosse realizzabile il loro campionamento in prossime sperimentazioni, rappresenta uno sviluppo futuro dell'approccio discusso in questa sede e rende ipotizzabile il confronto dei dati appartenenti ai due diversi stadi di lesione. Sarà pertanto possibile identificare eventuali correlazioni o differenze del significato metabolico dei pattern proteici differenziali al fine di fornire informazioni utili al mondo scientifico per la comprensione della patologia e di avanzare ipotesi circa il processo patogenetico alla base dell'Osteocondrosi.

L'applicazione dell'approccio proteomico a patologie di rilevante interesse nella specie equina, quale l'osteoartrite, potrebbe collaborare ulteriormente a definire

verosimiglianze, correlazioni o differenze sostanziali esistenti tra i due processi, certificando l'eventuale predominanza del processo degenerativo o flogistico in ciascuna patologia alla luce della bivalente evoluzione.

L'analisi proteomica possiede pertanto un elevato potenziale applicativo nella medicina veterinaria, come ampiamente dimostrato dai risultati prodotti nello studio di patologie articolare di interesse nella medicina umana. L'integrazione delle conoscenze cliniche e biochimiche potrebbe, infatti, avere utili riscontri per la candidatura di molecole proteiche quali markers precoci di Osteocondrosi e l'applicazione della loro ricerca nella pratica veterinaria equina. Tali risultati rappresenterebbero un ulteriore presupposto per lo studio interspecifico della patologia.

Infine, la ricerca descritta in questo lavoro e condotta secondo tecniche di analisi innovative intende rivestire un ruolo propositivo per l'impostazione di studi sistematici ed interdisciplinari nei confronti della patologia producendo, al contempo, utili informazioni di interesse fisiopatologico circa il metabolismo articolare in corso di malattia per una sua miglior comprensione.

## BIBLIOGRAFIA

- Adebanjo O. A., Moonga B.S., Yamate T., Sun L., Minkin C., Abe E., Zaidi M. (1998) *Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption.* J Cell Biol. 142; 1347-56
- Agaton C., Uhlén M., Hober S. (2004) *Genome-based proteomics.* Electrophoresis 25; 1280-1288
- Anastassiades T., Rees-Milton K. (2005) *Biochemical Markers for the Osteoarthritis: From the Present to the Future and back to the Past.* J Rheum 32:4
- Badadani M., Shetty K. T., Babu S. V. S. (2007) *Metabolic status of magnesium and ceruloplasmin in Handigodu Joint Disease: a variety of spondylo epi (meta) physeal dysplasia.* Cl Chim Acta 395; 170-171
- Baak J. P. A., Janssen E. A. M., Soreide K., Heikkilae R. (2005) *Genomics and proteomics-the way forward.* Ann Oncol 16; 1130-1140
- Balmain N., Tisserand-Jochem E., Thomasset M., Cuisinier-Gleizes P. (1986) Mathieu H. *Vitamin-D-dependent calcium-binding protein (CaBP-9K) in rat growth cartilage.* Histochemistry 84(2);161-8
- Bannikov G. A., Mattoon J. S., Abrahamsen E. J., Premanandan C., Green-Church K. B., Marsh A. E., Lakritz J. (2007) *Biochemical and enzymatic characterization of purified covalent complexes of matrix metalloproteinase-9*

- and haptoglobin released by bovine granulocytes in vitro.* Am J Vet Res 68; 995-1004
- Bertone A. L., Bramlage L. R., McIlwraith C. W., Malemud C. J. (2005) *Comparison of proteoglycan and collagen in articular cartilage of horses with naturally developing osteochondrosis and healing osteochondral fragments of experimentally induced fractures.* Am J Vet Res 66; 1881–1890
- Billingham R. C., Brama P. A. J., Van Weeren P. R., Knowlton M. S., McIlwraith C. W. (2004) *Evaluation of serum concentration of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals.* Am J Vet Res 65; 143-50
- Bridges C. H., Harris E. D. (1988) *Experimentally induced cartilaginous fractures (osteochondritis dissecans) in foals fed low-copper diets.* J Am Vet Med Assoc 193(2);215-21.
- Bridges C. H., Womack J. E., Harris E. D., Scrutchfield W. L. (1984) *Considerations of copper metabolism in osteochondrosis of suckling foals.* J Am Vet Med Assoc 185(2);173-8.
- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G. M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P. G. (2004) *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.* Electrophoresis 25; 1327-33
- Carbonaro M. (2004) *Proteomics: present and future in food quality evaluation.* Trends in Food Science & Technology. Vol.15; 209-216

- Chang X., Cui Y., Zong M., Zhao Y., Yan X., Chen Yu., Han J. (2009) *Identification of Proteins with Increased Expression in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissues*. J Rheumatol 36:5
- Cho C. W., Lee S. H., Choi J., Park S. J., Ha D. J., Kim H. J., Kim C. W. (2003) *Improvement of the two-dimensional gel electrophoresis analysis for the proteome study of Halobacterium salinarum*. Proteomics 3; 2325-2329
- Cravatt B. F., Simon G. M., Yates III J. R. (2007) *The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics*. Nature 450; 991-1000
- De Ceuninck F. (2007) *The birth and infancy of proteomic analysis in osteoarthritis research*. Curr Opin Mol Ther Vol.9 N.3; 263-9
- Dik K. J., Enzerink E., van Weeren P. R. (1999) *Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months*. Equine Vet J Suppl. (31); 9-15
- Dierks C., Löhring K., Lampe V., Wittwer C., Drögemüller C., Distl O. (2007) *Genome-wide search for markers associated with osteochondrosis in Hanoverian warmblood horses*. Mamm Genome 18(10); 739-47
- Ekman S., Carlson C. S. (1998) *The pathophysiology of osteochondrosis*. Vet Clin North Am Small Anim Pract 28; 17-32
- Fairney A, Straffen AM, May C, Seifert MH. (1987) *Vitamin D metabolites in synovial fluid*. Ann Rheum Dis. 46(5); 370-4
- Fang Y., Van Meurs J. B. J., Arp P., van Leeuwen J. P. T., Hofman A., Pols H. A. P., Uitterlinden A. G. (2009) *Vitamin D Binding Protein Genotype and Osteoporosis*. Calcif Tissue Int 85(2); 85-93

- Farnum C. E., Wilsman N. J. (1986) *Ultrastructural histochemical evaluation of growth plate cartilage matrix from healthy and osteochondrotic swine*. Am J Vet Res 47; 1105-15
- Farquharson C., Rennie J. S., Loveridge N., Whitehead C. C. (1996) *In vivo and in vitro effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D3 on the proliferation and differentiation of avian chondrocytes: their role in tibial dyschondroplasia*. J Endocrinol 148(3); 465-74
- Fife R. S., Moody S., Houser D. (1994) Proctor C. *Studies of copper transport in cultured bovine chondrocytes*. Biochim Biophys Acta 1201(1); 19-22
- Frisbie D. D., Ray C. S., Ionescu M., Poole A. R., Chapman P. R., McIlwraith C. W. (1999) *Measurement of synovial fluid and serum concentration of the 846 epitope of chondroitin sulfate and carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses*. Am J Vet Res 60; 306-9
- Garnero P., (2006) *Use of Biochemical Markers to study and follow patients with Osteoarthritis*. Curr Rheumatol Rep 8; 37-44
- Gee E, Davies M, Firth E, Jeffcott L, Fennessy P, Mogg T. (2007) *Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of copper supplemented and non-supplemented dams*. Vet J 173(1); 109-17
- Gee E. K., Firth E. C., Morel P. C., Fennessy P. F., Grace N. D., Mogg T. D. (2005) *Articular / epiphyseal osteochondrosis in Thoroughbred foals at 5 months of age: influences of growth of the foal and prenatal copper supplementation of the dam*. N Z Vet J. 53(6); 448-56

- Gibson D.S., Blelock S., Brockbank S., Curry J., Healy A., McAllister C., Rooney M.E. (2006) *Proteomic analysis of recurrent joint inflammation in juvenile idiopathic arthritis*. J Proteome Research 5; 1988-1995
- Gibson D. S., Blelock S., Curry J., Finnegan S., Healy A., Scaife C., McAllister C., Pennington S., Dunn M., Rooney M. (2009) *Comparative analysis of synovial fluid and plasma proteomes in juvenile arthritis-Proteomic patterns of joint inflammation in early stage disease*. J Proteomics 656-676
- Girard C., Lepage O. M., Rossier Y. (1997) *Multiple vertebral osteochondrosis in a foal*. J Vet Diagn Investigation 9; 436-8
- Gomme P. T., Bertolini J. (2004) *Therapeutic potential of vitamin D-binding protein*. Trends Biotechnol 22; n. 7
- Guo D., Tan W., Wang F., Lv Z., Hu Z., Lv T., Chen Q., Gu X., Wan B., Zhang Z. (2008) *Proteomic analysis of human articular cartilage: Identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis*. Joint Bone Spine 75; 439-444
- Hamdan M., Bordini E., Galvani M., Righetti P.G. (2001) *Protein alkylation by acrylamide, its N-substitute derivatives and cross-linkers and its relevance to proteomics: A matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry study*. Electrophoresis 22; 1633-1644
- Hedberg J. J., Bjerneld E. J., Cetinkaya S., Goscinski J., Grigorescu I., Haid D., Laurin Y., Bjellqvist B. (2005) *A simplified 2-D electrophoresis protocol with the aid of an organic disulfide*. Proteomics 2; 3088-3096

- Henson F. M., Davenport C., Butler L., Moran I., Shingleton W. D., Jeffcott L. B., Schofield P. N. (1997) *Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes*. Equine Vet J. 29(6); 441-7
- Henson F. M., Davies M. E., Jeffcott L. B. (1997) *Equine dyschondroplasia (osteochondrosis)--histological findings and type VI collagen localization*. Vet J. 154(1); 53-62
- Hoppe F. (1984) *Radiological investigations of osteochondrosis dissecans in Standardbred Trotters and Swedish Warmblood horses*. Equine Vet J 16(5):425-9
- Hu S., Loo J. A., Wong D. T. (2006) *Human body fluid proteome analysis*. Proteomics.6; 6326-53
- Hultén C., Grönlund U., Hirvonen J., Tulamo R. M., Suominen M. M., Marhaug G., Forsberg M. (2002) *Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced non-infectious arthritis in the horse*. Equine Vet J 34(7); 699-704
- Hutadilok N., Ghosh P., Brooks P. M. (1988) *Binding of haptoglobin, inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor, and  $\alpha$ 1 proteinase inhibitor to synovial fluid hyaluronate and the influence of these proteins on its degradation by oxygen derived free radicals*. Ann Rheumc Dis 47; 377-385
- Jeffcott L. B. (1991) *Osteochondrosis in the horse-searching for the key of pathogenesis*. Equine Vet J 23; 331-8

- Jeffcott L. B., Henson F. M. D. (1998) *Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (ostechondrosis)*. Vet J 156; 177-92
- Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. (1987) *Matrix assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds*. Int J Mass Spectrom Ion Process 78; 53
- Kavallaris M., Marshall G. M. (2005) *Proteomics and disease: opportunities and challenges*. Med J Aust 182; 575-579
- Kolker E., Higdon R., Hogan J. M. (2006) *Protein identification and expression analysis using mass spectrometry*. Trends Microbiol 14 N.5
- Kuroki K., Cook J. L., Stoker A. M., Turnquist S. E., Kreeger J. M., Tomlinson J. L. (2005) *Characterizing osteochondrosis in the dog: potential roles for matrix metalloproteinases and mechanical load in pathogenesis and disease progression*. OsteoArthritis Cartilage 13; 225-234
- Lambrecht S., Tilleman K., Elewaut D., Deforce D. (2008) *Proteomics in rheumatology: the beginning of a fairy tale?*. Proteomics Clin Appl. 2; 411-419
- Laws E. G., Richardson D. W., Ross M. W., Moyer W. (1993) *Racing performance of standardbreds after conservative and surgical treatment for tarsocrural osteochondrosis*. Equine Vet J 25(3); 199-202
- Lepeule J., Bareille N., Robert C., Ezanno P., Valette J. P., Jacquet S., Blanchard G., Denoix J. M., Seegers H. (2009) *Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the prevalence of Developmental Orthopaedic Disease in limbs of French foals at weaning*. Prev Vet Med 89; 167-177

- Lilburn MS, Leach RM Jr. (1980) *Metabolism of abnormal cartilage cells associated with tibial dyschondroplasia*. Poult Sci 59(8); 1892-6
- McIlwraith C. W. (1996) *Clinical aspects of osteochondrosis dissecans*. In McIlwraith C.W., Trotter G.V. Editors: Joint disease in the horse, Philadelphia, W.B.Saunders
- Miller I., Crawford J., Gianazza E. (2006) *Protein stains for proteomic applications: Which, when, why?*. Proteomics 6; 5385-5408
- Miller I., Friedlein A., Tsangaris G., Maris A., Fountoulakis M., Gemeiner M. (2004) *The serum proteome of Equus caballus*. Proteomics 4; 3227–3234
- Nilsson F. (1947) *Gonitis in the horse*. Svensk Vetidn 52, 1-14
- Olstad K., Ytrehus B., Ekman S., Carlson C. S., Dolvik N. I.(2008) *Epiphyseal cartilage canal blood supply to the tarsus of foals and relationship to osteochondrosis*. Equine Vet J 40(1); 30-9
- Quaye I.K. (2008) *Haptoglobin, inflammation and disease*. Trans R Soc Trop Med Hyg 102; 735-742
- Rees M. D., Kennett E. C., Whitelock J. M., Davies M. J. (2008) *Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies*. Free Radic Biol Med 44; 1973-2001.
- Ritorto M. S., Borlak J. (2008) *A simple and reliable protocol for mouse serum proteome profiling studies by use of two-dimensional electrophoresis and MALDI TOF/TOF mass spectrometry*. Proteome Sci 6; 6-25.

- Rousseau J.-C., Delmas P. D. (2007) *Biological markers in osteoarthritis*. Nat Clin Pract Rheumatol Vol. 3 N. 6
- Schneider G. B., Greco K. J., Safari F. F., Popoff S. N. (2003) *The anabolic effects of vitamin D-binding protein-macrophage activating factor (DBP-MAF) and a novel small peptide on bone*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 13; 277-284
- Shaw M. M., Riederer B. M. (2003) *Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics 3; 1408-1417
- Sinz A, Bantscheff M, Mikkat S, Ringel B, Drynda S, Kekow J, Thiesen H. J., Glocker M. O. (2002) *Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis*. Electrophoresis 23; 3445-3456
- Skioldebrand E., Lorenzo T., Zunino L., Rucklidge G.J., Sandgren B., Carlsten J., Ekman S. (2001) *Concentration of collagen, aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid from equine middle carpal joints*. Equine Vet J 33; 394-402
- Sloet van Oldruitenborgh-Ooste, Mol JA, Barneveld A. (1999) *Hormones, growth factors and other plasma variables in relation to osteochondrosis*. Equine Vet J Suppl. (31); 45-54
- Smeets M. B., Fontijn J., Kavelaars A., Pasterkamp G., De Kleijn D. P. (2003) *The acute phase protein haptoglobin is locally expressed in arthritic and oncological tissue*. Int J Exp Pathol. 84(2); 69-74
- Steel C. M. (2008) *Equine synovial fluid analysis*. Vet Clin North Am Equine Pract 24; 437-454

- Strand V., Kimberly R., Isaacs J. D. (2007) *Biological therapies in rheumatology: lesson learned, future directions*. Nat Rev Drug Discov 6; 75-92
- Tilleman K., Deforce D., Elewaut D. (2005) *Rheumatology: a close encounter with proteomics*. Rheumatology 44; 1217-1226
- Tilleman K., Deforce D. (2008) *Proteomics in rheumatology*. Expert Rev Proteomics 5; 755-759
- Van de Lest C. H. A., Brama P. A. J., van El B., DeGroot J., van Weeren P. R., (2004) *Extracellular matrix changes in early osteochondrotic defects in foals: a key role for collagen?* Biochim Biophys Acta 54-62
- Van den Berghe G., Van Roosbroeck D., Vanhove P., Wouters P. J., De Pourcq L., Bouillon R. (2003) *Bone turnover in prolonged critical illness: effect of vitamin D*. J Clin Endocrinol Metab 88; 4623-4632
- van den Hoogen B. M., van de Lest C. H., van Weeren P. R., van Golde L. M., Barneveld A. (1999) *Changes in proteoglycan metabolism in osteochondrotic articular cartilage of growing foals*. Equine Vet J Suppl (31); 38-44
- Van Grevenhof E. M., Ducro B. J., Van Weeren P. R., Van Tartwijk J. M., Van den Belt A. J., Bijma P. (2009) *Prevalence of various radiographic manifestations of osteochondrosis and their correlations between and within joints in Dutch warmblood horses*. Equine Vet J 41(1); 11-6
- van Weeren P. R., Barneveld A. (1999) *The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal*. Equine Vet J Suppl (31); 16-25

- van Weeren P. R., Knaap J., Firth E. C. (2003) *Influence of liver copper status of mare and newborn foal on the development of osteochondrotic lesions*. Equine Vet J 35(1); 67-71
- Van Weeren P. R. (2004) *Osteochondrosis*. In Auer JA, Stick JA editors: Equine Surgery, ed 3, Philadelphia, WB Saunders
- Vincourt J. B., Lionneton F., Kratassiouk G., Guillemin F., Netter P., Mainard D., Magdalou J. (2006) *Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage*. Mol Cell Proteomics 10;1984-95
- Wardale R. J., Duance V. C. (1994) *Characterisation of articular and growth plate cartilage collagens in porcine osteochondrosis*. J Cell Sci 107:47-59
- Wardale R. J., Duance V. C. (1996) *Collagen expression in chicken tibial dyschondroplasia*. J Cell Sci 109; 1119-31
- Watkins J. P. (1999) *Osteochondrosis*. In Auer JA, Stick JA editors: Equine Surgery ed 2 Philadelphia WB Saunders
- Westacott C. I., Sharif M. (1996) *Cytokines in osteoarthritis: Mediators or markers of Joint destruction?*. Semin Arthrit Rheum Vol.25, N.4; 254-272
- Wilson R., Belluoccio D., Bateman J. F. (2008) *Proteomic analysis of cartilage proteins*. Methods 45; 22-31
- Wittwer C., Löhring K., Drögemüller C., Hamann H., Rosenberger E., Distl O. (2007) *Mapping quantitative trait loci for osteochondrosis in fetlock and hock joints and palmar/plantar osseous fragments in fetlock joints of South German Coldblood horses*. Anim Genet 38(4); 350-7

- Yamagiwa H., Sarkar G., Charlesworth C., McCormick D. J., Bolander M. E. (2003) *Two-dimensional gel electrophoresis of synovial fluid: method for detecting candidate protein markers for osteoarthritis*. J Orthop Sci 8; 482-490
- Yamashita M., Fenn J. B. (1984) *Electrospray ion source. Another variation of the free-jet theme*. J Phys Chem 88; 4451-4459
- Ytrehus B., Carlson C. S., Ekman S. (2007) *Etiology and Pathogenesis of Osteochondrosis*. Vet Pathol 44; 429-448
- Zhou X. Y., Dempster D. W., Marion S. L., Pike J. W., Haussler M. R., Clemens T. L. (1986) *Bone vitamin D-dependent calcium-binding protein is localized in chondrocytes of growth-plate cartilage*. Calcif Tissue Int 38(4); 244-7

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il Chiar.mo Prof. Marco Pepe per avermi condotto in qualità di Maestro nel mio percorso formativo professionale, per avermi sostenuto nei miei primi passi nel mondo scientifico, per avermi insegnato l'Arte della Medicina Veterinaria, per aver permesso di approfondire gli ambiti di mio particolare interesse medico e, soprattutto, per avermi educato quale professionista. A Lui con profonda stima, Grazie;

Ringrazio il Chiar.mo Dr. Rodolfo Gialletti per avermi spronato, in maniera caratteristica, ed aver motivato momenti di riflessione circa le mie potenzialità;

Ringrazio la Chiar.ma Dr.ssa Elisabetta Chiaradia per avermi assistito pazientemente nel corso della ricerca e per i suoi suggerimenti; il Chiar.mo Prof. Luca Avellini, la Dr.ssa Micaela Tartaglia, il Dr. Fausto Scoppetta per la personale integrazione nell'equipe della Sezione di Scienze Sperimentali e Biotecnologia applicate e per l'attiva collaborazione nella stesura del presente lavoro scientifico;

Ringrazio il Chiar.mo Prof. Franco Moriconi, in qualità di Tutor, ed il Prof. Maurizio Del Bue, in qualità di Coordinatore, per aver consentito alla mia persona lo svolgimento del percorso formativo di Dottorato di Ricerca;

Ringrazio i colleghi della Sezione di Chirurgia e Radiodiagnostica della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Perugia nelle persone de Dr.ssa Chiara Bazzica, Dr. Francesca Beccati, Dr.ssa Marta Cercone, Dr. Sara Nannarone, Dr. Stefano Prato, Dr. Iacopo Secco, Dr. Cristina Tamantini per aver collaborato alla mia formazione professionale ed aver dimostrato un sentimento di stima ed amicizia nei miei confronti;

Ringrazio il Dr. Mario Angelone per la sua amicizia fin dai primi anni di Università e per i preziosi suggerimenti personali e professionali;

Ringrazio la Dr.ssa Margreet Voermans per la motivazione professionale trasmessami e la disponibilità dimostrata fin dall'inizio della nostra amicizia, Grazie;

Ringrazio il Prof. Paolo Botti e Prof. Stefano Zanichelli per la collaborazione nell'istituzione e svolgimento del progetto di ricerca di riferimento per la stesura del presente lavoro di Tesi;

Ringrazio il Prof. Gianluigi Ingletto e la Prof.ssa Kramer per avermi seguito lungo il mio percorso accademico fornendomi utili consigli e confidenze;

Ringrazio il Dr. Giovanni Lezoli, in qualità di collega ed amico