

Inmunolocalización de catepsina B en condrocitos y osteoclastos en discondroplasia (osteocondrosis) equina

Gustavo Hernández Vidal[†]
Alejandro Valdés Martínez?
Francisco Mora Valdez??
Jorge Kawas Garza?
Rafael Ramírez Romero?
Elizabeth Davies??
Leo Jeffcott??

Abstract

The enzyme cathepsin B was immunolocalized by immunofluorescence in articular cartilage and subchondral bone in both normal and dyschondroplastic samples obtained from young horses aged, 1-5 years old. Distribution of the enzyme was variable in dyschondroplastic cartilage due to a general lack of zonal organization. A strong intracellular immunoreaction was observed in abnormal chondrocytes arranged in clusters in all of the zones of the dyschondroplastic cartilage. Conversely, in normal articular cartilage the expression of cathepsin B was low at the articular surface as well as the mid zone but higher in the majority of chondrocytes at the deep zone. No morphological differences were observed in osteoclasts of normal and pathological samples.

Key words: HORSE, CHONDROCYTES, CATHEPSIN B, OSTEOCLASTS, DYSCONDROPLASIA, OSTEOCHONDROSIS.

Resumen

La enzima catepsina B fue inmunolocalizada mediante inmunofluorescencia en muestras de cartílago articular y hueso subcondral normal y discondroplásico en caballos jóvenes de uno a cinco años de edad. La distribución de la enzima varió en cartílago discondroplásico debido a la desorganización celular existente en esas muestras. Una intensa expresión intracelular de la enzima fue observada en los condrocitos agrupados anormalmente en todas las zonas del cartílago discondroplásico. En el cartílago articular normal la expresión de la catepsina B en la superficie articular fue baja, así como en la zona media pero mayor en casi todos los condrocitos de la zona profunda. En cuanto a los osteoclastos no se observó diferencia morfológica entre las muestras de cartílago normal y patológico.

Palabras clave: CABALLO, CONDRÓCITOS, CATEPSINA B, OSTEOCLASTOS, DISCONDROPLASIA, OSTEOCONDROSIS.

Introducción

Uno de los padecimientos ortopédicos que se presentan durante el desarrollo de los equinos es la discondroplasia, esta última constituye la etapa temprana de la osteocondrosis.¹ Se presenta como resultado de una alteración en la diferenciación celular del cartílago en crecimiento de la superficie articular y de la placa de crecimiento,² lo que, a su vez, propicia un defecto en la osificación endocondral (proceso en el que el cartílago es sustituido por hueso) que resulta en un engrosamiento o

Recibido el 12 de febrero de 2002 y aceptado el 16 de julio de 2002.

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Universitaria Mederos, 64930, Monterrey, Nuevo León, México.

**Hospital Veterinario Hípico La Silla, Antiguo Camino al Diente 3333, La Estanzuela, 64988, Monterrey, Nuevo León, México.

***Department of Clinical Veterinary Medicine, University of Cambridge, Madingley Road, Cambridge CB3 0ES, England.

[†]Autor para correspondencia: E-mail hy10003@hotmail.com Tel: +52 (81) 83576119 Fax: +52 (81) 83650968.

retención de cartílago.³ Dicha falla en la osificación endocondral lleva a la necrosis de las capas basales del cartílago articular retenido, lo cual puede provocar su desprendimiento y manifestarse con signos clínicos de discondroplasia.⁴ Las primeras lesiones se generan comúnmente en la zona profunda o hipertrófica del cartílago articular, ello ocasiona retención del cartílago desmineralizado.^{5,6}

La patogénesis de la osteocondrosis no se ha definido exactamente. Se cree que es un problema multifactorial que puede ser causado por el grado de crecimiento, nutrición, desbalance mineral, heredabilidad, alteraciones endocrinas y la actividad física de los equinos.⁷

Dentro del proceso normal de osificación endocondral se ha observado que varias enzimas degradativas, tales como las metabproteinasas,⁸ las proteinasas cisteínicas y adenosintrifosfatasas (ATPasas)⁹ son capaces de degradar el colágeno y los proteoglicanos, componentes esenciales de la matriz extracelular del cartílago articular. Dichas enzimas, las cuales son producidas por condrocitos, osteoblastos, células endoteliales y osteoclastos, juegan un papel importante en el proceso de osificación endocondral. Como consecuencia de lo anterior una producción y secreción excesiva de estas enzimas ocasionaría la degradación del cartílago de manera irreversible,¹⁰⁻¹² o bien una secreción inadecuada de ellas causaría la retención de cartílago no degradado y provocaría un defecto en dicho proceso.

Es de especial interés el estudio de la proteínasa cisteínica catépsina B, ya que a esta enzima se le ha asociado con la destrucción de la matriz extracelular en artritis¹³⁻¹⁵ y con la degradación de proteoglicanos dentro del proceso de renovación de la matriz extracelular del cartílago humano.¹⁶ Se ha demostrado que la catépsina B es capaz de degradar *in vitro* componentes extracelulares del cartílago en una gran variedad de especies.^{8,17-19} Tiene la capacidad de degradar subunidades de proteoglicanos (agrecan) y de proteína enlazadora, la cual estabiliza el enlace del agrecan con el ácido hialurónico.²⁰ Se conoce también su acción sobre el colágeno de tipo I,²¹ II, IX, XI,²² X,⁸ y su efecto activador en otras proteinasas (activador pro-plasminógeno, procolagenasa y proestromelisin).^{3,15} Además, posee la capacidad de iniciar una cascada de eventos degradativos contra una gran variedad de sustratos.^{13,23} En diversas investigaciones se ha observado importante aumento de la actividad enzimática de la catépsina B en condiciones patológicas, tales como artritis reumatoide,²⁴ osteoartritis²⁵ y discondroplasia equina.¹⁷ También la catépsina B tiene una acción degradativa dentro del proceso de osificación endocondral, sobre el cartílago no calcificado, ya que se ha demostrado en diferentes estudios^{9,18} que los osteoclastos, células indispensables en este proceso, sintetizan y secretan altos niveles de esta enzima.

Estudios previos han demostrado la presencia de la proteínasa cisteínica catépsina B en condrocitos del caballo^{17,26,27} y otras especies. También se ha localizado en osteoclastos de aves,⁸ de ratas¹⁸ y de humano,¹⁹ en donde su función es degradar la matriz extracelular de la zona hipertrófica del cartílago dentro del proceso normal de osificación endocondral. Sin embargo, la catépsina B no ha sido localizada en osteoclastos del caballo, aun cuando su presencia en condrocitos es fundamental para la degradación de la matriz extracelular.²⁷ El objetivo de este estudio fue localizar e investigar la distribución de la catépsina B en condrocitos y osteoclastos en muestras patológicas y normales de cartílago articular con el propósito de establecer una posible función de esta enzima en la patogénesis de la discondroplasia equina.

Material y métodos

Enzimas y anticuerpos

En esta investigación se utilizó catépsina B purificada de bovino (EC 3.4.22.1)* y lisados de condrocitos y fibroblastos de caballo,²⁸ que fueron analizados por electroforesis (SDS-PAGE) en geles al 15%.²⁹ Después de la electroforesis, los geles fueron usados para Western-Blot²⁸ o teñidos con azul

* Sigma, St. Louis, Missouri USA

** Dako, Denmark

de Coomassie. En la técnica de Western-Blot se utilizó como anticuerpo primario un antisuero obtenido a partir de ovino contra catepsina B humana (s ? h U554/4)³⁰ y como anticuerpo secundario se utilizaron inmunoglobulinas (IgG) de conejo antiovino conjugadas con FITC^{**} (isotiocianato de fluoresceína). Lo anterior se realizó para comprobar la especificidad del anticuerpo primario con catepsina B de caballo, en donde se analizaron catepsina B purificada de bovino (como marcador de peso molecular) y lisados de condrocitos y fibroblastos de caballo.

Muestras de cartílago y hueso subcondral

Se obtuvieron diez muestras completas de cartílago y hueso subcondral normal de la cresta lateral de la tróclea del fémur de 12 caballos sin historia previa de enfermedades ortopédicas del desarrollo. Las muestras fueron colectadas dentro de las primeras 3-6 horas *postmortem*. También se usó el mismo número de muestras de cartílago y hueso subcondral discondroplásico de siete caballos, que se obtuvieron durante cirugías por artroscopia. Para este estudio se utilizaron animales de entre de uno a cinco años de edad. Todas las muestras se tiñeron con azul de toluidina o con hematoxilina y eosina³¹ para observar su histología. Las muestras fueron preparadas en parafina o inmediatamente congeladas en OCT^{*} con nitrógeno líquido (-186°C) para estudios histoquímicos e inmunolocalización de la catepsina B.

Las muestras preparadas en parafina líquida se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se cortaron (8 ?m de espesor) usando un microtomo^{**} y se montaron en portaobjetos tratados previamente con un autoadherente de poly-L-lisina, para después reposar a 56°C en un horno por una noche. Las muestras se guardaron a temperatura ambiente hasta su utilización. Las muestras congeladas se cortaron con un microtomo criogénico^{**} a una temperatura de -30°C. Se obtuvieron muestras de la cresta lateral de la tróclea del fémur, cortadas perpendicularmente a la superficie articular con un espesor de 8 ?m, las cuales incluían las tres zonas del cartílago articular (superficial o articular, media o proliferativa y profunda o hipertrófica), así como alrededor de 5 mm de hueso subcondral.

Inmunofluorescencia

Las secciones de cartílago y hueso subcondral se trataron con solución bloqueadora (tris-HCl pH 7.4 en presencia de caseína al 5% y suero fetal bovino al 10%) durante 15 minutos, para evitar la unión no específica del antisuero primario. Después se incubaron por una hora a temperatura ambiente o bien a 4°C durante la noche con 25 ?l de antisuero primario (s ? h U554/4) diluido en una proporción de 1:50 en solución amortiguadora de lavado (albúmina de suero bovino al 1% en PBS). En las secciones utilizadas como testigo se reemplazó el antisuero primario por suero normal de ovino o suero ovino preinmune (U554/1) diluido también en una proporción de 1:50. Después de la incubación se removió el antisuero lavando las secciones tres veces durante cinco minutos en PBS. Luego se incubaron las secciones con solución bloqueadora por 15 minutos para después incubarse durante una hora con 25 ?l de antisuero secundario, IgG de conejo antiovino conjugadas con FITC,^{***} diluidas 1:100 en solución amortiguadora de lavado. Después se lavaron como ya se mencionó y se tiñeron los núcleos con verde metilo al 0.01% (p/v) durante dos minutos y se enjuagaron en PBS por 30 segundos. Las secciones se montaron en Citofluor (glicerol/PBS) y fueron observadas a través de un fotomicroscopio^{****} equipado con iluminación epifluorescente y se fotografiaron.

* Medio de montaje Tissue-Tek Elkhart, IN USA.

** Bright Instruments, Huntingdon, UK

*** Dako, Denmark

**** Nikon Diaphot

Resultados

Western-blot

El electroblot demostró claramente dos bandas con pesos moleculares de 30-kDa y 25-kDa, respectivamente, lo cual confirmó que el suero de ovino antihumano catepsina B (s?h, U554/4) reconoció las dos cadenas de la catepsina B de bovino purificada. El mismo antisuero reaccionó con dos bandas ligeramente más pesadas de 32-kDa y 27-kDa, respectivamente, ello corresponde a la enzima en los condrocitos del caballo. Para este análisis se corrieron también lisados de fibroblastos en los cuales no se encontraron las bandas equivalentes a la enzima, debido tal vez a que la concentración de lisados de fibroblastos no fue la suficiente para su detección. La ausencia de otras bandas confirma nuevamente la especificidad del antisuero para catepsina B (Figura 1).

Histoquímica e inmunolocalización de la catepsina B en condrocitos y osteoclastos del caballo

Mediante la técnica de inmunofluorescencia se pudo inmunolocalizar la catepsina B en condrocitos y osteoclastos del caballo. La inmunoreacción se reconoció como una fluorescencia de color verde manzana en la gran mayoría de los condrocitos de la zona profunda o hipertrófica, así como en los osteoclastos. Esta reacción fue mucho más intensa en animales con discondroplasia. Por otra parte, tanto en los animales enfermos como en los sanos la fluorescencia disminuyó en la zona superficial o articular y en la zona media o proliferativa.

En las muestras de cartílago normal teñidas con azul de toluidina se observó la organización columnar característica de los condrocitos en la zona profunda o hipertrófica (Figura 2a). En estas muestras la catepsina B se inmunolocalizó intracelularmente mediante inmunofluorescencia, lo cual indica reacción inmunopositiva al anticuerpo primario (Figura 2b).

En la histología del cartílago discondroplásico se observaron agrupaciones anormales de condrocitos en la zona profunda o hipertrófica y pérdida parcial de la tinción metacromática debido a la degradación de la matriz extracelular como consecuencia de la pérdida de proteoglicanos en dicha zona (Figura 3a). En estas secciones también se encontró una reacción inmunopositiva del anticuerpo primario (s ? h, U554/4) con la catepsina B intracelularmente (Figura 3b). Lo anterior se confirmó con el control en donde la inmunofluorescencia fue nula (Figura 3c).

La morfología del osteoclasto tanto en muestras normales como patológicas se observa en la Figura 4a y se identifica como una célula multinucleada que se encuentra en las lagunas de Howship. No se observó histológicamente alguna diferencia en la organización o morfología celular entre muestras de cartílago normal y discondroplásico. La inmunolocalización de la catepsina B en estas células se demostró al obtener una reacción inmunopositiva específica del anticuerpo primario (s ? h, U554/4) con la catepsina B (Figura 4b). Dicha especificidad se confirmó con el testigo en donde no se observó inmunofluorescencia (Figura 4c). No se llegó a observar expresión extracelular enzimática en áreas de hueso subcondral de las muestras estudiadas. Estos resultados determinan por primera vez la inmunolocalización de la enzima catepsina B en los osteoclastos del caballo.

Discusión

En la presente investigación se informa por primera vez la inmunolocalización de la enzima catepsina B en osteoclastos del caballo. Dicha enzima no ha sido purificada de tejido equino, por lo que la primera parte de este estudio se enfocó a la confirmación de la especificidad de los anticuerpos usados.

Mediante inmunoelectro análisis se comprobó que el antisuero usado en esta investigación (s?h, U554/4) es específico para la inmunolocalización de la enzima catepsina B en el caballo. El inmunoelectro- análisis demostró claramente dos bandas con pesos moleculares de 30-kDa y 25-kDa, respectivamente, ello confirmó que el suero de ovino antihumano catepsina B (s?h, U554/4)

* Nikon Diaphot

reconoció las dos cadenas de la catepsina B de bovino purificada. El mismo antisuero reaccionó con dos bandas ligeramente más pesadas de 32-kDa y 27-kDa, respectivamente, lo cual corresponde a la enzima en los condrocitos del caballo. En esta investigación se usaron también lisados de fibroblastos en los cuales no se observaron las bandas equivalentes a la enzima probablemente debido a que la concentración de los lisados de fibroblastos no fue la adecuada para su identificación.

En el presente estudio se confirma la presencia de la catepsina B tanto en cartílago articular normal como en cartílago discondroplásico del caballo. Sin embargo, se observa diferencia entre los niveles enzimáticos de la catepsina B expresados por los condrocitos en las diferentes zonas que conforman el cartílago articular; las células de la zona profunda expresaron el mayor nivel enzimático. Estos datos confirman la interesante variación previamente reconocida de la expresión de la enzima en el cartílago articular normal y discondroplásico del caballo.^{17,26,27} No obstante, en las muestras histológicas de los caballos con discondroplasia se identificaron altos niveles de expresión enzimática intracelularmente en las agrupaciones de condrocitos, asociadas con disminución en la tinción metacromática, lo cual ha sido interpretado como una degradación de la matriz extracelular.³² Aunque estas agrupaciones celulares predominaron en la zona profunda, también se observaron en la zona articular y media de las muestras patológicas.

Hasta ahora no se conoce la importancia del incremento en la expresión enzimática de la catepsina B en dichas agrupaciones celulares. No obstante la agrupación de los condrocitos es una de las principales características observadas en la discondroplasia;⁵ por tanto, es razonable sugerir que la presencia incrementada de la catepsina B en estas agrupaciones tiene importancia patológica. En estas agrupaciones, las cuales difieren morfológicamente de los condrocitos hipertróficos de la zona profunda del cartílago articular,^{6,33} se han observado también en osteoartritis,^{25,33-35} sin embargo, se conoce muy poco de su mecanismo de formación y acción. Se ha sugerido que la degradación de los proteoglicanos en la matriz extracelular desencadenan la proliferación de los condrocitos provocando la agrupación de éstos³² y que estas agrupaciones participan en el proceso de reparación local de la osteoartritis.^{25,35} Ciertamente las enzimas juegan un papel importante en la remodelación de la matriz extracelular de la osteoartritis pero ha sido difícil reconocer las enzimas que participan y establecer su principal función. Por otra parte, se ha demostrado también que la catepsina B es capaz de degradar el colágeno de tipo II³⁶ y ejercer cambios en la organización de los colágenos pericelulares VI y IX.³⁷ Con base en estas observaciones se sugiere que los altos niveles de la catepsina B en las agrupaciones celulares del cartílago discondroplásico pueden tener una participación importante en esta enfermedad.

La expresión enzimática de la catepsina B fue inmunolocalizada en osteoclastos de caballos sanos y con discondroplasia; pero no se observó diferencia en los niveles enzimáticos expresados por los osteoclastos adheridos al hueso en los lugares de resorción ósea activa entre muestras normales y patológicas. En las muestras patológicas utilizadas en esta investigación se observaron cambios morfológicos en los condrocitos; sin embargo, en los osteoclastos no se reconocieron alteraciones en cuanto a su morfología. La expresión de la catepsina B por los osteoclastos fue intracelular, no obstante se observó un poco de liberación enzimática pericelular debido tal vez al uso del Triton X-100, que produce un aumento de la permeabilidad de la membrana lisosomal³⁸ y a la densidad del citofluor, la cual pudiera liberar la enzima por ósmosis. Ciertamente la catepsina B derivada de los osteoclastos es importante en la degradación de la matriz extracelular del cartílago en el proceso normal de osificación endocondral al contribuir a la degradación completa del colágeno tipo X.⁸

A pesar de la función potencialmente importante de la catepsina B en el metabolismo de la matriz extracelular, sorprendentemente se conoce muy poco acerca de su regulación en el cartílago y función patológica. Experimentos *in vitro* han demostrado que la catepsina B tiene la capacidad de degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular incluyendo los proteoglicanos²⁰ y los colágenos de tipo I,²¹ II, IX, XI.²² Después de la identificación de esta enzima en el cartílago³⁸ las investigaciones se han basado exclusivamente en su capacidad de degradar la matriz extracelular en reumatismo y osteoartritis en humanos;³⁹⁻⁴² sin embargo, no se conoce su función en la discondroplasia equina. Aunque tiene la capacidad de degradar los proteoglicanos es muy poco probable que la catepsina B

sea directamente responsable de los bajos niveles de este componente de la matriz extracelular, como se observó en las zonas de agrupaciones celulares en muestras discondroplásicas. Debe considerarse la participación de otras enzimas como serinproteasa, metaloproteinasa, y agrecanasa en la degradación de los proteoglicanos.^{15,43} El colágeno de tipo VI se encuentra en elevadas cantidades en las agrupaciones celulares observadas en discondroplasia⁶ y en osteoartritis^{44,45} y tiene una función estructural en la matriz extracelular.^{46,47} Es de particular interés el colágeno tipo X porque predomina en la matriz extracelular de la zona profunda o hipertrófica, zona principal en la que el hueso reemplaza al cartílago en el proceso de osificación endocondral.⁸ La primera etapa en la degradación de este colágeno se lleva a cabo por la acción conjunta de la catepsina B y metaloproteinasas producidas por los condrocitos antes de la invasión ósea.⁸ Una vez que el hueso invade al cartílago, la presencia de condrocitos en esa zona es prácticamente nula, lo que sugiere que la última etapa en la degradación de las fibras de colágeno se lleve a cabo por la acción de enzimas producidas por los osteoclastos, especialmente la catepsina B,⁸ la cual actúa a nivel lisosomal.⁴⁸ Obviamente, la degradación del colágeno tipo X es importante en el proceso de osificación endocondral. Las alteraciones en dicho colágeno debido a una actividad anormal de la catepsina B producida por los osteoclastos probablemente conducen a una falla en la osificación endocondral y a un debilitamiento en la placa de crecimiento, situaciones características que definen a la discondroplasia.

Agradecimientos

Agradecemos a la doctora Cecilia Ramírez Hernández de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, su asesoría en la revisión de este artículo. La presente investigación se efectuó como consecuencia del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT), convocatoria 1999-UANL.

Immunolocalization of cathepsin B in chondrocytes and osteoclasts in equine dyschondroplasia (osteochondrosis)

Gustavo Hernández Vidal[†]
Alejandro Valdés Martínez*
Francisco Mora Valdez**
Jorge Kawas Garza*
Rafael Ramírez Romero*
Elizabeth Davies***

Introduction

One of the orthopedic problems that can present itself during equine development is dyschondroplasia, or early stage of osteochondrosis.¹ It can present as a result of altered cellular differentiation of the cartilage at the articular surface and growth plate,² which, as a result, causes defective endochondral ossification (the process by which cartilage is substituted by bone). This, in turn, leads to cartilage thickening or retention.³ The failure of endochondral ossification leads to necrosis of the basal layers of the retained articular cartilage, which can cause it to become unattached, with subsequent clinical manifestations of dyschondroplasia.⁴ The first lesions are commonly generated in the deep or hypertrophic articular cartilage zone, thus causing retention of the demineralized cartilage.^{5,6}

The pathogenesis of osteochondrosis has not yet been precisely defined. It is believed to be a multifactorial problem that can be caused by the amount of growth, nutrition, mineral imbalances, hereditary factors, endocrine alterations or the equine's level of physical activity.⁷

During the normal endochondral ossification process, various degrading enzymes, such as metalloproteinases,⁸ cysteine proteinases and adenosine-triphosphatases (ATPases),⁹ are capable of degrading collagen and proteoglycans, both of which are essential components of the extracellular matrix in articular cartilage. Said enzymes, produced by chondrocytes, osteoblasts, endothelial cells and osteoclasts, play an important role in the endochondral ossification process. As a consequence of this, excessive production and secretion of these enzymes would result in irreversible cartilage degradation,¹⁰⁻¹² whereas their inadequate secretion would cause a retention of non-degraded cartilage with subsequent defects in the process.

The cysteine proteinase called cathepsin B is of special interest, since this enzyme has been associated with the extracellular matrix destruction that takes place in arthritis¹³⁻¹⁵ and with the proteoglycan degradation that occurs during the renovation process in the extracellular matrix of human cartilage.¹⁶ Cathepsin B has been shown to be capable of degrading extracellular *in vitro* cartilage components in a great variety of species.^{8,17-19} It is capable of degrading proteoglycan subunits (agrecan), as well as a linking protein, which stabilizes the link of agrecan to hyaluronic acid.²⁰ Its action upon types I,²¹ II, IX, XI,²² and X⁸ of collagen, as well as its role in activating other proteinases (pro-plasminogen activator, pro-collagenase and pro-stromelysin)^{3,15} is well known. Furthermore, it possesses the ability of starting a cascade of degradation events against a great variety of substrates.^{13,23} Diverse studies have observed an important increase in the enzymatic activity of cathepsin B in pathological conditions, including rheumatoid arthritis,²⁴ osteoarthritis²⁵ and equine dyschondroplasia.¹⁷ Cathepsin B also has a degradation effect on non-calcified cartilage in the endochondral ossification process, given that it has

* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Universitaria Mederos, 64930, Monterrey, Nuevo Leon, México.

** Hospital Veterinario Hípico La Silla, Antiguo Camino al Diente 3333, La Estanzuela, 64988, Monterrey, Nuevo León, México.

*** Department of Clinical Veterinary Medicine, University of Cambridge, Madingley Road, Cambridge CB3 0ES, England.

† Author to which correspondence should be sent: E-mail hy10003@hotmail.com Tel:+52(81)83576119 Fax:+52(81)83650968.

been shown in various studies^{9,18} that osteoclasts, cells which are indispensable for this process, synthesize and secrete high levels of this enzyme.

Previous studies have demonstrated the presence of the cysteine proteinase, cathepsin B, in horse chondrocytes,^{17,26,27} as well as in those of other species. It has been found in the osteoclasts of birds,⁸ rats¹⁸ and humans,¹⁹ where its function is the degradation of the extracellular matrix in the hypertrophic cartilage zone during the normal process of endochondral ossification. However, cathepsin B has not been found in horse osteoclasts, even when its presence in chondrocytes is fundamental for the degradation of extracellular matrix.²⁷ The objective of the present study was to locate and investigate the distribution of cathepsin B in chondrocytes and osteoclasts of pathological and normal samples of articular cartilage, with the purpose of establishing a possible function of this enzyme in the pathogenesis of equine dyschondroplasia.

Materials and methods

Enzymes and antibodies

In this study we used purified bovine cathepsin B (EC 3.4.22.1)^{*} and lysed equine chondrocytes and fibroblasts.²⁸ These were analyzed via 15% gel electrophoresis (SDS-PAGE).²⁹ Following electrophoresis, the gels were used for a Western blot²⁸ or were stained with Coomassie blue. The primary antibody used for the Western blot was an ovine antihuman cathepsin B antiserum (s a h U554/4),³⁰ while for the secondary antibody we used anti-ovine rabbit immunoglobulins (IgG) conjugated with FITC^{**} (fluoresceine isothiocyanate). This was done to prove the specificity of the primary antibody against equine cathepsin B, by analyzing both purified bovine cathepsin B (as a molecular weight marker) and lysed equine chondrocytes and fibroblasts.

Cartilage and Subchondral Bone Samples

Ten complete samples of normal cartilage and subchondral bone from the lateral femoral trochlea of 12 horses without a previous history of orthopedic developmental problems, were obtained. The samples were collected during the first three to six hours *postmortem*. The same number of samples of dyschondroplastic subchondral bone and cartilage were obtained from seven horses during arthroscopic surgery. In this study, the animals used were all between one and five years of age. All the samples were stained with toluidine blue and hematoxylin-eosin,³¹ for histological analysis. They were included in paraffin or immediately frozen in OCT^{***} with liquid nitrogen (-186°C) for histochemistry and immunolocalization analyses to locate cathepsin B.

The samples prepared in liquid paraffin were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, at room temperature. Then they were cut (8 µm thickness) with a microtome^{****} and mounted on a slide which had been previously treated with auto-adherent poly-L-lysine, and were then left standing in a 56°C oven overnight. The samples were stored at room temperature until they were to be used. The frozen samples were cut using a cryogenic microtome^{*} at a temperature of -30°C. Samples from the lateral crest of the femoral trochlea, were obtained, and cut perpendicularly to the articular surface at an 8 µm thickness. These samples included three zones of articular cartilage (superficial or articular, mid zone or proliferative and deep or hypertrophic), as well as around 5 mm of subchondral bone.

Immunofluorescence

The sections of cartilage and subchondral bone were treated with a blocking solution (Tris-HCl with a pH of 7.4 in presence of 5% caseine and 10% bovine fetal serum) for 15 minutes, to avoid non-specific union of the primary antiserum. Then they were incubated for an hour at room temperature or at 4°C during the night, with 25 µl of primary antiserum (s a h U554/4) diluted with a 1:50 buffered washing solution (1% bovine serum albumin in PBS). In the sections that were to be used as controls the primary antiserum was

* Sigma, St. Louis, Missouri, USA.

** Dako, Denmark.

*** Tissue-Tek Elkhart mounting medium, IN, USA.

**** Bright Instruments, Huntingdon, UK.

* Bright Instruments, Huntingdon, UK.

substituted by normal ovine serum or diluted pre-immune ovine serum (U554/1), also in a 1:50 proportion. Following incubation, the antiserum was removed by washing each section three times for 15 minutes in PBS. The sections were then incubated with blocking solution for 15 minutes. Then they were incubated for an hour with 25 µl of the secondary antiserum, anti-ovine rabbit IgG conjugated with FITC^{**}, in a 1:100 dilution with buffered washing solution. After washing, as was previously mentioned, the nuclei were stained with 0.01% methyl green (p/v) for two minutes and then rinsed in PBS for 30 seconds. The sections were mounted in CytoFluor (glycerol/PBS), to be observed through a photomicroscope^{***} equipped with epifluorescent illumination, and were photographed.

Results

Western blot

The electroblot clearly showed two bands with molecular weights of 30-kDa and 25-kDa, which confirmed that the antihuman ovine cathepsin B antiserum (s a h, U554/4) recognized both chains of purified bovine cathepsin B. The same antiserum reacted with two bands slightly heavier than 32-kDa and 27-kDa, which correspond to the equine chondrocyte enzyme. Lysed fibroblasts were also run in the analysis, but no bands were detected which were equivalent to these enzymes, maybe because the concentration of lysed fibroblasts was insufficient for their detection. The lack of any other bands confirms once again the antiserum specificity against cathepsin B (Figure 1).

Histochemistry and Immunolocalization of cathepsin B in equine chondrocytes and osteoclasts

Using immunofluorescence it was possible to immunolocalize cathepsin B in equine chondrocytes and osteoclasts. The immunoreaction, seen as an apple green fluorescence, recognized the great majority of the chondrocytes and osteoclasts in the deep or hypertrophic zone. This reaction was much more intense in dyschondroplastic animals. On the other hand, both in ill and healthy animals, fluorescence decreased in the superficial or articular zone and in the mid or proliferative zone.

In the normal cartilage samples, stained with toluidine blue, the characteristic columnar organization of chondrocytes was seen in the deep or hypertrophic zone (Figure 2a). In these samples, cathepsin B was intracellularly immunolocalized by immunofluorescence, indicating an immunopositive reaction to the primary antibody (Figure 2b).

Histologically, the dyschondroplastic cartilage, showed abnormal clusters of chondrocytes in the deep or hypertrophic zone, as well as partial loss of metachromatic staining due to the degradation of the extracellular matrix, resulting from a loss of proteoglycans in said zone (Figure 3a). These sections also showed an immunopositive reaction to the primary antibody (s a h, U554/4) with intracellular cathepsin B (Figure 3b). This was confirmed by the control sample, in which there was no immunofluorescence (Figure 3c).

Osteoclast morphology, both in normal and pathological samples, can be observed in Figure 4a, seen as a multinucleated cell located in Howship's lacunae. Histologically, no organizational or morphological differences were seen in normal or dyschondroplastic samples. The immunolocalization of cathepsin B in these cells was demonstrated upon obtaining a specific immunopositive reaction to the primary antibody (s a h, U554/4) against cathepsin B (Figure 4b). Said specificity was confirmed by the control sample, where immunofluorescence was not observed (Figure 4c). None of the samples of subchondral bone showed enzymatic extracellular expression. These results show, for the first time, the immunolocalization of cathepsin B enzyme in horse osteoclasts.

Discussion

This study shows, for the first time, the immunolocalization of cathepsin B enzyme in horse osteoclasts. Said enzyme has not been purified from equine tissue, so the first part of the research focused on confirming the specificity of the antibodies used.

^{**} Dako, Denmark.

^{***} Nikon Diaphot.

Immuno-electroanalysis proved that the antiserum used in this study (s a h, U554/4) is specific for immunolocalization of the cathepsin B enzyme in the horse. This analysis clearly showed two bands with molecular weights equal to 30-kDa and 25-kDa, respectively, which confirmed that the antihuman ovine cathepsin B antiserum (s a h, U554/4) recognized both chains of purified bovine cathepsin B. The same antiserum reacted with two bands slightly heavier than 32-kDa and 27-kDa, respectively, which correspond to the chondrocyte enzyme found in the horse. This study also used lysed fibroblasts from which no bands were found, probably due to the fact that the concentration of lysed fibroblasts was not sufficient for enzyme identification.

The present study confirmed the presence of cathepsin B both in normal and dyschondroplastic equine articular cartilage. However, differences in cathepsin B enzyme levels expressed by chondrocytes in the different zones that make up the articular cartilage, were noticed. The cells from the deep zone expressed a greater enzymatic level. These data confirm the interesting variation which had been recognized previously in enzyme expression both in normal articular cartilage and dyschondroplastic horse cartilage.^{17,26,27} Nevertheless, the histological samples in dyschondroplastic horses showed high levels of intracellular enzymatic expression in the clusters of chondrocytes, associated to the decreased levels of metachromatic staining, which has been interpreted as evidence of extracellular matrix degradation.³² Though these clusters predominated in the deep zone, they were also observed in the articular and mid zone of the pathological samples.

The importance of increased cathepsin B enzymatic expression in cell clusters has still not been determined. Nevertheless, chondrocytes clusters are one of the main characteristics observed in dyschondroplasia,⁵ and, as such, it is reasonable to suggest that the increment of cathepsin B in these clusters has pathological significance. These cell clusters, which differ morphologically from hypertrophic chondrocytes in the deep zone of articular cartilage,^{6,33} have also been observed in osteoarthritis;^{25,33-35} however, very little is known about the mechanism by which they are formed or the way in which they act. It has been suggested that proteoglycan degradation in extracellular matrix unleashes the proliferation of chondrocytes, thus causing the clusters,³² and, furthermore, that these participate in the local repair process which takes place in osteoarthritis.^{25,35} Though it is certainly true that enzymes play an important role in the remodeling of extracellular matrix in osteoarthritis, it has been difficult to determine which enzymes are present and their precise role. On the other hand, cathepsin B has also been shown to be capable of degrading type II collagen,³⁶ as well as provoking changes in the organization of pericellular collagen types VI and IX.³⁷ Based upon these observations, we suggest that the high levels of cathepsin B in cellular clusters of dyschondroplastic cartilage are important in this disease.

The enzymatic expression of cathepsin B was immunolocalized in healthy and dyschondroplastic horse osteoclasts. However, neither in the normal nor in the pathological bone were there differences in enzymatic levels expressed by osteoclasts adhered to bone in areas with active resorption. Morphological changes were observed in chondrocytes from pathological samples, but no such changes were encountered in osteoclasts. Cathepsin B expression by osteoclasts is intracellular, nevertheless, some pericellular liberation was noticed, possibly because of the use of Triton X-100, which increases lysosomal membrane permeability,³⁸ as well as the density of the CytoFluor, which could have liberated the enzyme through osmosis. Certainly, osteoclasts-derived cathepsin B is important in the degradation of cartilaginous extracellular matrix in normal endochondral ossification, given that it contributes to the complete degradation of type X collagen.⁸

Despite the potentially important function of cathepsin B in extracellular matrix metabolism, surprisingly little is known about its pathological or regulatory functions upon cartilage. *In vitro* studies have shown that cathepsin B is capable of degrading the majority of extracellular matrix components, including proteoglycans²⁰ and types I,²¹ II, IX and XI²² of collagen. Following this enzyme's identification in cartilage,³⁸ research has been based exclusively on its capacity of degrading extracellular matrix in human rheumatism and osteoarthritis;³⁹⁻⁴² however, its role in equine dyschondroplasia is unknown. Though it has the ability of degrading proteoglycans, it is not very likely to be directly responsible for the low level of these compounds in the extracellular matrix, as was observed in the cellular clusters of dyschondroplastic samples. One must also consider the role of other enzymes, such as serinoprotease,

metalloproteinase and aggrecanase, in the degradation of proteoglycans.^{15,43} Type IV collagen, which has a structural function in the extracellular matrix,^{46,47} is found in high quantities in the cellular clusters observed in dyschondroplasia⁶ and osteoarthritis.^{44,45} Type X collagen is of particular interest, given that it predominates in the deep or hypertrophic zone of the extracellular matrix, this being the main zone in which bone replaces cartilage during endochondral ossification.⁸ The first step in degrading this type of collagen, takes place via the joint action of cathepsin B and metalloproteinases produced in the chondrocytes prior to the osseous invasion.⁸ Once bone invades cartilage, the presence of chondrocytes in this zone, is practically null, suggesting that the last phase of collagen fiber degradation is produced by enzymatic action from osteoclasts, specially cathepsin B, which acts at a lysosomal level.⁴⁸ Obviously, degradation of type X collagen is important for endochondral ossification. Alterations in said collagen, due to abnormal activity of cathepsin B produced by osteoclasts, probably leads to a failure in endochondral ossification and a weakening of the growth plate, the defining characteristics of dyschondroplasia.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Cecilia Ramirez Hernandez from the College of Veterinary Medicine, at the Autonomous University of Nuevo Leon, for her input on this article. The present study was carried out as a consequence of the Aid to Scientific and Technological Research Program (PAICYT), CONVOCATORIA 1999-UANL.

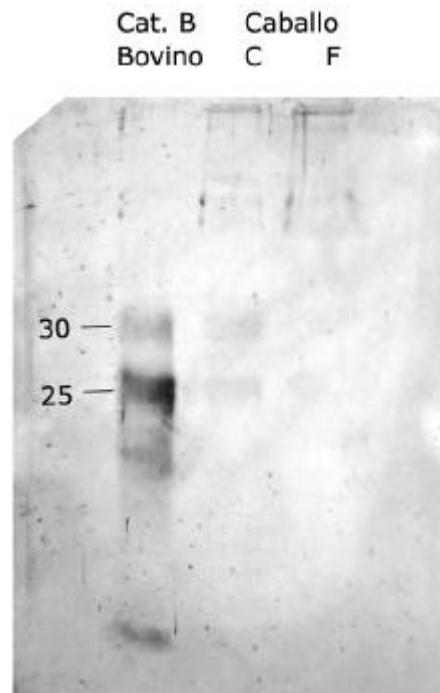


Figura 1. Western-Blot de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando suero de ovino antihumano (s^o h, U554/4), en donde se observan las bandas de 30-kDa y 25-kDa con catepsina B purificada de bovino. El suero reconoció las bandas de 32-kDa y 27-kDa que corresponden a la catepsina B cruda de lisados de condrocitos (C). No se observaron bandas en los lisados de fibroblastos (F).

Figure 1. Western blot of a polyacrylamide gel (SDS-PAGE) using antihuman ovine serum (s^o a h, U554/4), where one can observe the 30-kDa and 25-kDa bands which correspond to purified bovine cathepsin B. The serum also recognized the 32-kDa and 27-kDa bands that correspond to the raw cathepsin B from lysed chondrocytes (C). No bands for lysed fibroblasts (F) can be seen.

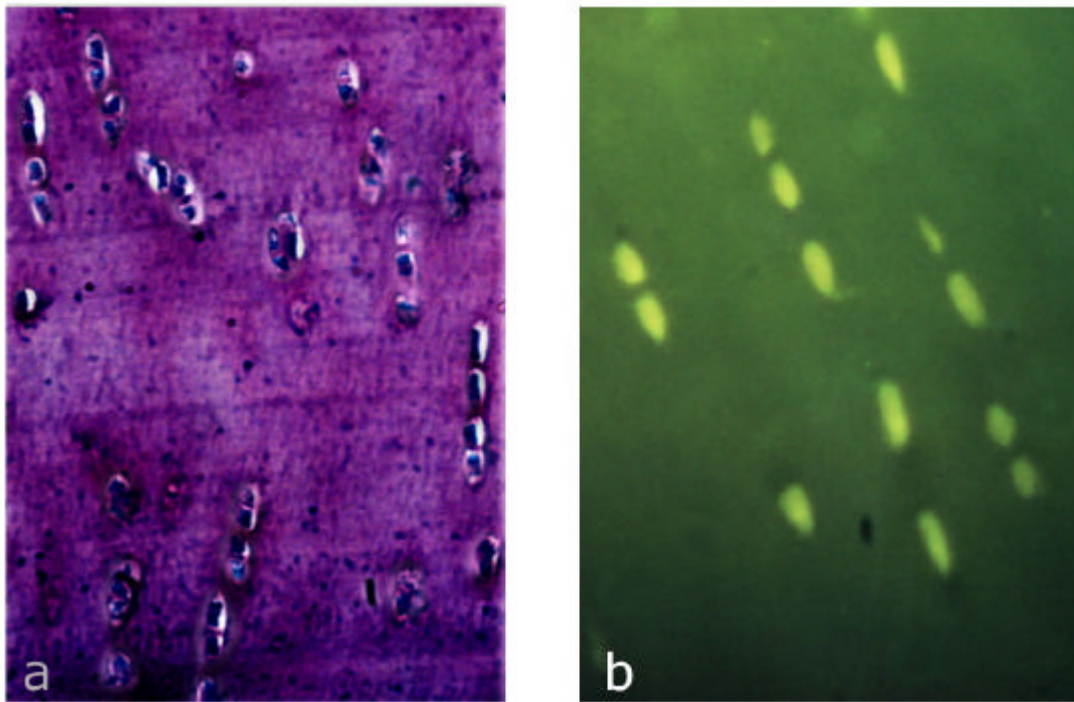


Figura 2. Histología teñida con azul de toluidina **(a)** e inmunolocalización de catepsina B **(b)** en condrocitos de la zona profunda o hipertrófica (X 400) de una muestra de cartílago normal tomada de la cresta lateral de la tróclea del fémur de un caballo de cinco años.

Figure 2. Histology with toluidine blue stain **(a)** and immunolocalization of cathepsin B **(b)** in chondrocytes from the deep or hypertrophic zone (X 400) of a sample of normal cartilage taken from the lateral crest of the femoral trochlea of a five year old horse.

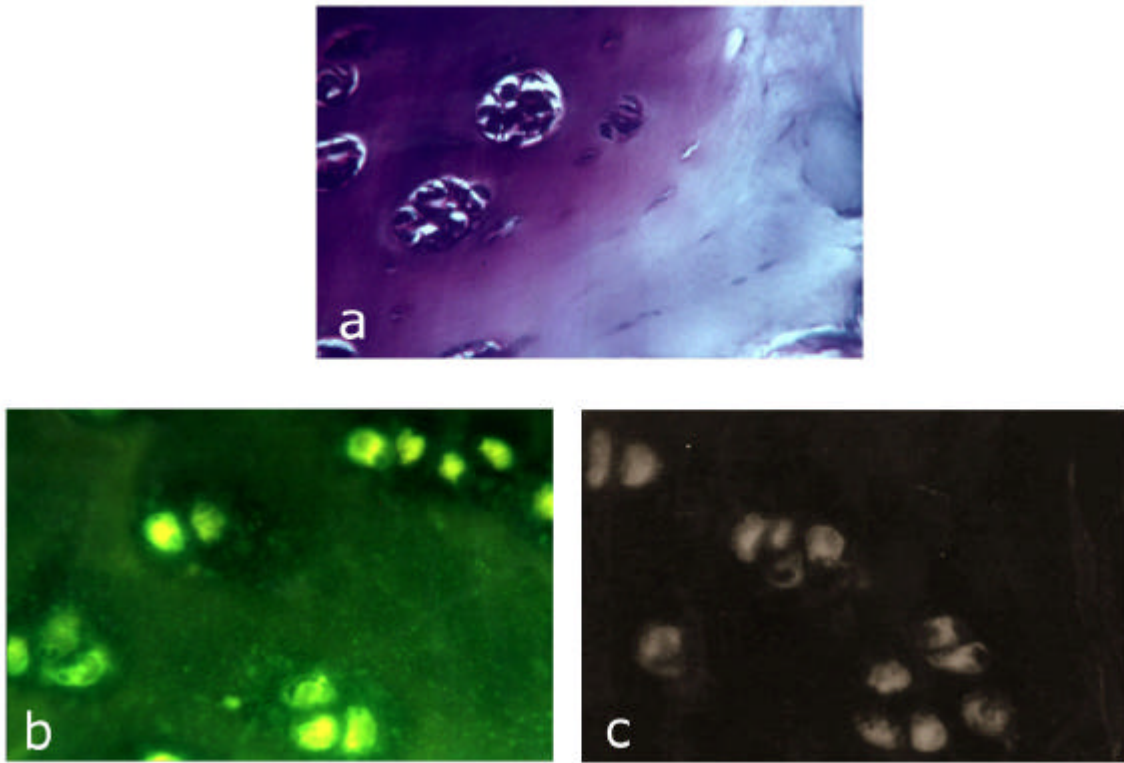


Figura 3. Histología e inmunolocalización de catepsina B en los condrocitos de la zona profunda o hipertrófica (X 400) de una muestra de cartílago discondroplásico tomada de la cresta lateral de la tróclea del fémur de un caballo de cuatro años.

a) Sección teñida con azul de toluidina en donde se observa la agrupación de los condrocitos en la zona profunda o hipertrófica, que contrasta con la organización normal en columnas como se aprecia en la Figura 2a.

b) Sección incubada con suero de ovino antihumano (s? h, U554/4) diluido 1:50 y con IgG de conejo antiovino conjugadas con FITC diluidas 1:100. Se observa claramente la reacción inmunopositiva indicando la presencia de la catepsina B en los condrocitos.

c) Testigo en donde el suero de ovino antihumano (s? h, U554/4) fue sustituido por suero normal de ovino diluido 1:50. Se observa una reacción inmunonegativa hacia la presencia de la catepsina B.

Figure 3. Histology and immunolocalization of cathepsin B in chondrocytes from the deep or hypertrophic zone (X 400) or a sample of dyschondroplastic cartilage taken from the lateral crest of the femoral trochlea of a four year old horse.

a) Section stained with toluidine blue: note the group of chondrocytes in the deep or hypertrophic zone which contrasts with the normal columnar grouping seen in Figure 2a.

b) Section incubated with antihuman ovine serum (s a h, U554/4) 1:50 dilution and conjugated anti-ovine rabbit IgG with FITC in a 1:100 dilution. The immunopositive reaction can be clearly seen, indicating the presence of cathepsin B in the chondrocytes.

c) Control sample in which the antihuman ovine serum (s a h, U554/4) was substituted by normal ovine serum in a 1:50 dilution. An immunonegative reaction against cathepsin B can be observed.

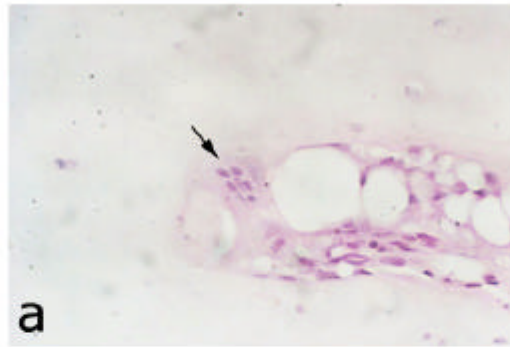


Figura 4. Morfología e inmunolocalización de catepsina B en osteoclastos (X 400) de la cresta lateral de la tróclea del fémur de un caballo de dos años.

a) Histología del osteoclasto (flecha) teñido con H & E, se observan claramente seis núcleos.

b) Sección de hueso subcondral incubada con suero de ovino antihumano (s? h, U554/4) diluido 1:50 y con IgG de conejo antiovino conjugadas con FITC diluidas 1:100. Se observa claramente la reacción inmunopositiva, que indica la presencia de la catepsina B en los núcleos del osteoclasto.

c) Testigo en donde el suero de ovino antihumano (s? h, U554/4) fue sustituido por suero normal de ovino diluido 1:50. Se observa una reacción inmunonegativa hacia la presencia de la catepsina B.

Figure 4. Morphology and immunolocalization of cathepsin B in osteoclasts (X 400) from the lateral crest of the femoral trochlea of a two year old horse.

a) Histology of an osteoclasts (arrow) stained with H & E, six nuclei can be seen clearly.

b) Section of subchondral bone incubated with antihuman ovine serum (s a h, U554/4) 1:50 dilution and conjugated anti-ovine rabbit IgG with FITC in a 1:100 dilution. The immunopositive reaction can be clearly seen, indicating the presence of cathepsin B in the nuclei of the osteoclasts.

c) Control sample in which the antihuman ovine serum (s a h, U554/4) was substituted by normal ovine serum in a 1:50 dilution. An immunonegative reaction against cathepsin B can be observed.

Referencias

1. Lillich JD, Bertone AL, Malemud CJ, Weisbrode SE, Ruggles AJ, Stevenson S. Biochemical, histochemical, and immunohistochemical characterisation of distal tibial osteochondrosis in horses. *Am J Vet Res* 1997;58:89-98.
2. Olsson SE, Reiland S. The nature of osteochondritis in animals. *Acta Radiol* 1978;358 (Suppl):299-306.
3. Pool RR. Difficulties in definition of equine osteochondrosis; differentiation of developmental and acquired lesions. *Equine Vet J* 1993;16:5-12.
4. Stromberg B, Rejno S. Osteochondrosis in the horse. I. A clinical and radiologic investigation of osteochondritis dissecans of the knee and hock joints. *Acta Radiol* 1978;358 (Suppl):139-152.
5. Savage CL, McCarthy RN, Jeffcott LB. Effects of dietary energy and protein on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine Vet J* 1993;16:74-79.
6. Henson FMD, Davies ME, Jeffcott LB. Equine dyschondroplasia (osteochondrosis)-histological findings and type VI collagen localisation. *Vet J* 1997;154:53-63.
7. Jeffcott LB. Osteochondrosis in the horse-searching for the key to pathogenesis. *Equine Vet J* 1991;23:331-338.
8. Sires UI, Schmid TM, Fliszar CJ, Wang ZQ, Gluck SL, Welgus HG. Complete degradation of type X collagen requires the combined action of interstitial collagenase and osteoclast-derived cathepsin-B. *J Clin Invest* 1995;95:2089-2095.
9. Sasaki T, Ueno-Matsuda E. Cysteine-proteinase localization in osteoclasts: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 1993;271:177-179.
10. Morris EA, Treadwell BV. Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res* 1994;55:138-146.
11. Roughley PJ, Nguyen Q, Mort JS, Hughes CE, Caterson, B. Proteolytic degradation in human articular cartilage: its relationship to stromelysin. In: Van der Berg WB, Van der Kraan, PM, Van Lent P.L.E.M, editores. *Joint destruction in arthritis and osteoarthritis*. Basel Switzerland. Birkhäuser, 1993:149-159.
12. Koolwijk P, Miltenburg AMM, Van Erck MGM, Oudshoorn M, Niedbala MJ, Breedvel FC, Van Hinsbergh VWM. Activated gelatinase-B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation. *J Rheumatol* 1995; 22:385-393.
13. Van Noorden CJF, Smith RE, Rasnick D. Cysteine proteinase activity in arthritic rat knee joints and the effects of a selective systemic inhibitor, Z-Phe-Ala-CH₂F. *J Rheumatol* 1988;15:1525-1535.
14. Buttle DJ, Handley CJ, Ilic M, Saklatvala J, Murata M, Barret AJ. Inhibition of cartilage proteoglycan release by a specific inactivator of cathepsin B and inhibitor of matrix metalloproteinases: evidence for two converging pathways of chondrocyte-mediated proteoglycan degradation. *Arth Rheumatol* 1993;36:1709-1717.
15. Buttle DJ, Bramwell H, Hollander AP. Proteolytic mechanisms of cartilage breakdown: a target for arthritis therapy. *J Clin Mol Pathol Pathol*: 1995;48:M167-M177.
16. Morrison RIG, Barret AJ, Dingle JT, Prior D. Cathepsins B1 and D. Action on human cartilage proteoglycan. *Biochim Biophys Acta* 1973;302:411-419.
17. Hernández-Vidal G, Jeffcott LB, Davies ME. Immunolocalization of cathepsin B in equine dyschondroplastic growth cartilage. *Vet J* 1998;156:193-201.
18. Goto T, Tsukuba T, Kiyoshima Y, Kato K, Yamamoto K, Tanaka T. Immunohistochemical localization of cathepsin B, D and L in the rat osteoclast. *Histochemistry* 1993;99:411-414.
19. Soderstrom M, Salminen H, Glumoff V, Kirschke H, Aro H, Vuorio E. Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim Biophys Acta* 1999;7;1446(1-2):35-46.

20. Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ. Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem J* 1990;266:569-573.
21. Burleigh MC, Barret AJ, Lazarus GS. Cathepsin B1: A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem J* 1974;137:387-398.
22. Maciewicz RA, Wotton SF, Etherington DJ, Duance VC. Susceptibility of the cartilage collagens type II, IX and XI to the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS Letters* 1991;269:189-192.
23. Esser RE, Angelo RA, Murphey MD, Watts LM, Thornburg LP, Palmer JT, *et al.* Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:236-247.
24. Mort JS, Recklies AD, Poole AR. Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arthritis Rheum* 1984;27:509-515.
25. Baici A, Hörler D, Lang A, Merlín C, Kissling R. Cathepsin B in osteoarthritis: zonal variation of enzyme activity in human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* 1995;54:281-288.
26. Hernández-Vidal G, Davies ME, Jeffcott LB. Localization of cathepsin B and D in equine articular cartilage. *Pferdeheilkunde* 1996;12:371-373.
27. Hernández-Vidal G. Immunolocalization and modulation of lysosomal enzymes in normal and dyschondroplastic equine cartilage (Ph.D. thesis). Cambridge (UK):University of Cambridge, 1997.
28. Hernández-Vidal G, Jeffcott LB, Davies ME. Cellular heterogeneity in cathepsin D distribution in equine articular cartilage. *Equine Vet J* 1997;29:267-273.
29. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227:680-685.
30. Buttle DJ, Bonner BC, Burnet D, Barrett AJ. A catalytically active high M_r form of human cathepsin B from sputum. *Biochem J* 1988;254:693-699.
31. Humanson GL editor. *Animal tissue techniques*. 4th ed. San Francisco, California: WH Freeman and company, 1979.
32. Mankin HL, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. *J Bone Joint Surg Br.* 1970;52A:424-434.
33. Poole CA, Matsuoka A, Schofield JR. Chondrons from articular cartilage III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1991;34:22-35.
34. Pool RR, Meagher DM. Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1990;6:1-30.
35. Baici A, Lang A, Hörler D, Kissling R, Merlin C. Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* 1995;54:289-297.
36. Dodge GR, Poole AR. Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilage and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest.* 1989;83:647-661.
37. McDevitt CA, Miller RR. Biochemistry, cell biology and immunology of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1989;1:303-314.
38. Ali SY. The presence of cathepsin B in cartilage. *Biochem J* 1967;102:10-11.
39. Ali SY, Bayliss MT. Enzymes involved in degradation of cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1975;34(2):65-66.
40. Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. *J Orthop Res* 1990;8:336-344.
41. Trabandt A, Gay RE, Fassbender HG, Gay S. Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:1444-1451.
42. Gabrijelcic D, Annan-Prah A, Rodic B, Rozman B, Cotic V, Turk V. Determination of cathepsin B and H in sera and synovial fluids of patients with different joint disease. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28:149-153.

43. Henderson B, Blake S. Connective tissue destruction in rheumatoid arthritis: therapeutic potential of selective metalloproteinase inhibitors. In: Davies ME, Dingle JT editores. Immunopharmacology of joints and connective tissue. London: Academic Press 1994:199-223.
44. McDevitt CA, Pahl JA, Ayad S, Miller RR, Uratsuji M, Andrich JT. Experimental osteoarthritic articular cartilage is enriched in guanidine-soluble type VI collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:250-255.
45. Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992;25:155-163.
46. Bonaldo P, Russo V, Buccioti F, Doliana R, Colombatti A. Structural and functional features of the α_3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochem J* 1990;29:1245-1254.
47. Stallcup WB, Dahlin K, Healy P. Interaction of the NG2 chondroitin sulphate proteoglycan with type VI collagen. *J Cell Biol* 1990;111:3177-3188.
48. Kominami E, Ueno T, Muno D, Katunuma N. The selective role of cathepsin B and D in the lysosomal degradation of endogenous and exogenous proteins. *FEBS Letters* 1991;287:189-192.