

# ARTROSI DEL CANE E STRESS OSSIDATIVO-INFIAMMATORIO: DALLA CLINICA AL MECCANISMO

**ALDA MIOLO**

*Centro di Documentazione e Informazione Scientifica (Ce.D.I.S.) - Innovet Italia Srl*

**CARLO MARIA MORTELLARO**

*Istituto di Clinica Chirurgica e Radiologia Veterinaria - Università degli Studi di Milano*

## Riassunto

Il presente articolo si propone di fornire una dettagliata rassegna in merito all'importanza dei radicali liberi nella patogenesi dell'artrosi del cane adulto/anziano.

In corso di artrosi, si assiste ad un aumento di tali sostanze reattive nel microambiente articolare, capaci di indurre ed amplificare quelle alterazioni degenerative e, successivamente, infiammatorie, tra loro strettamente associate nel termine di "stress ossidativo-infiammatorio". I radicali liberi sono, infatti, in grado di: a) avviare la condrodegenerazione per apoptosi dei condrociti e degradazione della matrice extracellulare; b) scatenare e perpetuare l'infiammazione sinoviale, in virtù della capacità di alterare il microcircolo, attivare i fattori preposti alla sintesi di mediatori pro-infiammatori, determinare la sensitizzazione delle fibre nervose periferiche, da cui dipende la comparsa del dolore; c) indurre alterazioni metaboliche a carico dell'osso subcondrale, per compromissione dell'equilibrio tra alterne fasi di deposizione e riassorbimento della matrice ossea.

## Summary

*This article gives a detailed overview on the pathogenetic relevance of free radicals in the osteoarthritis of the adult and/or aged dog. Free radicals have been shown to induce and amplify both the degenerative damage and the inflammatory response, which are collectively known as "oxidative-inflammatory stress". In canine osteoarthritis, the excessive production of free radicals within the articular microenvironment is able to: a) initiate the chondrodegeneration by chondrocyte apoptosis and extracellular matrix degradation; b) trigger and perpetuate the synovial inflammation through several mechanisms, including microvascular damage, increased synthesis of pro-inflammatory mediators, peripheral nervous sensitisation which is related to pain; c) induce metabolic changes in the subchondral bone because of an imbalance between deposition and reabsorption of the osseous matrix.*

## INTRODUZIONE

La Medicina Veterinaria sta vivendo un'epoca di intenso fervore per ciò che riguarda la ricerca sull'artrosi. Da un punto di vista clinico, una svolta decisiva è derivata dal definitivo accantonamento della concezione di artrosi come semplice forma di senescenza o di consumo articolare. Oggi, si parla di plurifattorialità eziologica ed il terreno di indagine si è spostato sull'individuazione di quei molteplici fattori di rischio - diversi a seconda dell'età

dell'animale - che possono avviare una complessa serie di eventi - meccanici, biochimici e molecolari - coinvolgenti tutti i tessuti articolari. Relativamente al cane in età adulta e/o anziana, altra pietra miliare nella definizione del profilo clinico dell'artrosi è stata la dimostrazione della concomitante presenza di alterazioni degenerative e di reazioni francamente infiammatorie, queste ultime correlate al viraggio algico, caratteristico, anche se non esclusivo, delle fasi avanzate.

Per quanto concerne la patogenesi, di sicuro lo spartiacque della ricerca tra passato e futuro ha coinciso con la dimostrazione che l'artrosi è una vera e propria "congiura di molti". Molti mediatori, cioè, a valenza distruttiva che, capaci di agire sinergicamente tramite complicati circuiti di

autoamplificazione, prendono il sopravvento sulle sostanze ad attività anabolica e riparativa, avviando conseguentemente alterazioni condrodegenerative, perturbazioni metaboliche dell'osso subcondrale ed infiammazioni reattive in seno alla membrana sinoviale.

Oggi, si può dire che non passa giorno senza che nuove sostanze si dimostrino implicate nel gioco antitetico di circuiti attivatori ed inibitori, dalla cui disregolazione dipende l'innescò e la perpetuazione della cascata artrosica. Tra questa congerie di mediatori, un posto di assoluto rilievo spetta ai radicali liberi che si sono dimostrati in grado di avviare e perpetuare, attraverso molteplici vie, le alterazioni, degenerative ed infiammatorie, tipiche dell'artrosi del cane adulto/anziano.<sup>1, 2</sup>

Dopo brevi cenni sulla caratterizzazione clinica di questa artropatia, sia da un punto di vista clinico che patogenetico, il presente articolo si propone di illustrare il ruolo svolto dai radicali liberi nella fisiopatologia dell'artrosi, con particolare riferimento ai danni messi in atto nei confronti dei tessuti articolari (cartilagine, membrana sinoviale, osso subcondrale), tutti in ugual misura interessati dal processo artrosico.

## PREMESSE CLINICHE

Il profilo clinico dell'artrosi nel cane ha subito negli ultimi tempi sostanziali modifiche, essenzialmente correlate all'evidenza che tale artropatia può interessare l'animale a qualsiasi età, essendo una degenerazione più strettamente associata all'età biologica dei tessuti articolari - cartilagine *in primis* -

che a quella cronologica del soggetto.<sup>3, 4</sup> Oggi, in aggiunta alla tradizionale distinzione tra artrosi primaria e secondaria, si riconoscono un'artrosi del cane giovane - prevalentemente secondaria ad artropatie congenite e/o dello sviluppo, conosciute con l'acronimo DOD (*Developmental Orthopaedic Disease*)<sup>5, 6, 7, 8</sup> - ed un'artrosi dell'età adulta/anziana.

Per quest'ultima - oltre al processo di involuzione senile chiamato in causa nelle varie forme di artrosi primaria, da usura o *wear and tear*, a carico di diversi distretti articolari - vengono invocati disparati fattori eziologici (Tab. 1), in grado di avviare quadri clinici di degenerazione articolare secondaria. Non è comunque pleonastico ricordare che le stesse DOD sopra citate rappresentano un'importante causa di artrosi anche nel cane adulto (Fig. 1), quando trattate in modo inadeguato e/o intempestivo in età giovanile o, ancor peggio, non diagnosticate o erroneamente interpretate.

Da un punto di vista clinico, si assiste alla comparsa di una sintomatologia algica e funzionale (dolore e zoppia), particolarmente grave durante i ricorrenti episodi (*poussées* o "*flare up*") di riacutizzazione flogistica (Fig. 2).<sup>9, 10, 11, 12, 13</sup>

Tabella 1

### Principali cause di artrosi secondaria nel cane adulto e/o anziano

#### Traumi

Lussazioni/sublussazioni  
Malallineamenti/deviazioni angolari  
Fratture intrarticolari  
Lesioni legamentose (distensioni, rotture, disinserzioni)  
Lesioni teno-muscolari (contratture, mineralizzazioni, metaplasie)  
Lesioni meniscali

#### Artropatie immunomediate

Erosive Artrite reumatoide  
Artrite-Periostite proliferativa  
Non erosive Lupus eritematoso sistemico  
Poliartrite/Polimiosite  
Poliartrite idiopatica

Gonite linfoplasmacitica

#### Artropatie infettive

Batteriche  
Protozoarie  
Micotiche  
Da Rickettsia  
Da Ehrlichia

#### Altre artropatie

Da cristalli  
Dismetabolismi  
Da farmaci  
Emartrosi



FIGURA 1 - Pastore tedesco maschio, quindici mesi, visione mediale di gomito destro e sinistro: reperto anatomopatologico di UAP (Non Unione Processo Anconeale) bilaterale, responsabile di gravissimi fenomeni artrosici.

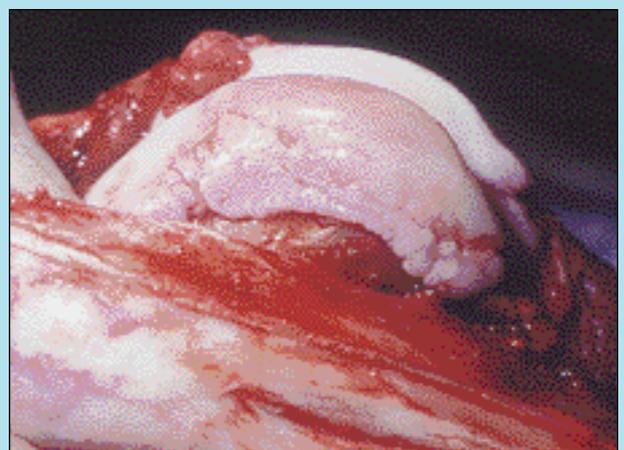


FIGURA 2 - Rottweiler femmina, tre anni e mezzo, ginocchio destro: artrosi secondaria a rottura del legamento crociato anteriore. L'immagine intraoperatoria evidenzia una notevole reattività sinoviale, più marcata a livello di EDPL (Extensor Digitorum Pedis Longus, che accompagna fenomeni francamente degenerativi a carico della cartilagine (discolorazione, erosioni). (da rif. 3)

Pur essendo nosograficamente ascritta al gruppo delle "artropatie degenerative non infiammatorie"<sup>11</sup>, l'artrosi dell'età adulta/anziana contempla, dunque, la corposa presenza di "innesti flogistici" che possono precedere, se non addirittura predire, le manifestazioni anatomo-cliniche di tipo degenerativo o, altresì, seguirle ed aggravarne il decorso.<sup>14, 15, 16, 17</sup>

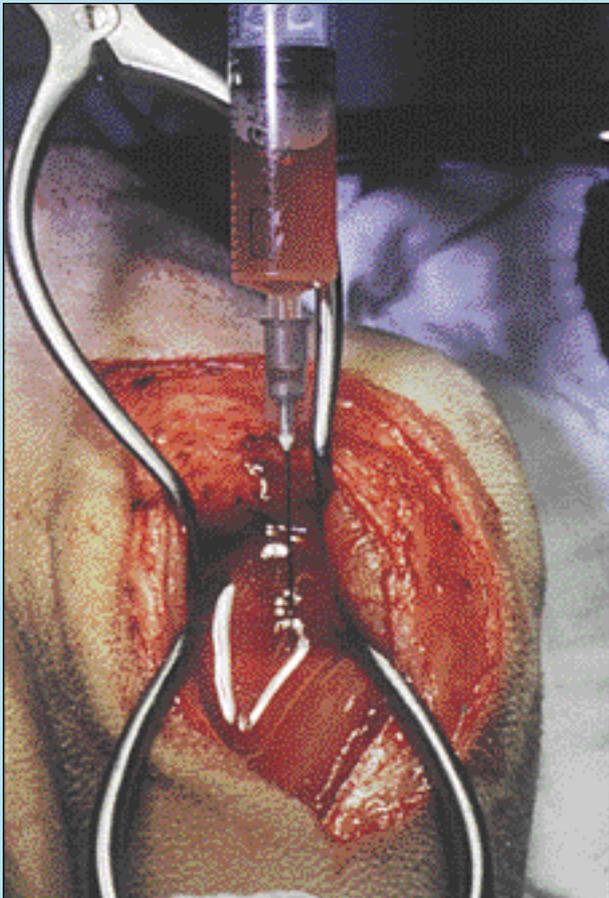


FIGURA 3 - Dogue de Bordeaux maschio, gomito sinistro: immagine intraoperatoria di artrosi secondaria a FCP/INC. Si noti l'abnorme quantità di liquido sinoviale aspirato, a testimonianza della forte componente infiammatoria presente.

Si rivela, dunque, più che mai opportuno introdurre il concetto di artropatia su base combinata degenerativo/infiammatoria, in cui le alterazioni strutturali della cartilagine articolare, conseguenti al processo di condrodegenerazione, sono accompagnate da altre di natura flogistica, in prevalenza a carico della membrana sinoviale (Fig. 3), nonché da disordini morfologico-strutturali e metabolici coinvolgenti l'osso subcondrale ed il comparto mio-tenolegamentoso (Fig. 4).<sup>14, 18, 19</sup>

**PREMESSE PATOGENETICHE**

Definitiva conferma della coesistenza di tratti degenerativi ed infiammatori si è avuta dalla disamina dei principali meccanismi patogenetici sottostanti l'artrosi del cane adulto/anziano.<sup>18, 20</sup> Complessivamente, tali meccanismi si basano sulla riduzione età-dipendente delle riserve endogene atte a contrastare l'aumentata produzione di quei mediatori ad attività condrodegenerativa, algogena e pro-infiammatoria che caratterizzano l'artrosi. Non sufficientemente controllate dai corrispondenti inibitori, tali sostanze determinano il prevalere di fenomeni degenerativi e flogistici, da cui dipendono le alterazioni macroscopiche patognomoniche di artrosi.<sup>21</sup>

Sottoposti ad un surplus di stimoli disreattivi, meccanici e non, i condrociti rilasciano una serie di mediatori ad attività catabolica (es. citochine, metalloproteasi, metaboliti dell'acido arachidonico, radicali liberi) che, non correttamente contrastati dalle difese endogene (es. fattori di crescita, inibitori delle citochine e delle proteasi, antiossidanti) avviano la lisi della circostante matrice (condrolisi) e perturbano, altresì, l'equilibrio metabolico del sottostante osso subcondrale. Essi, inoltre, innescano una risposta infiammatoria a carico del limitrofo distretto sinoviale che diviene, conseguentemente, sede preferenziale di una "flogosi reattiva" (sinovite), amplificata anche da sollecitazioni meccaniche (es. anormali attriti intrarticolari) o irritative/

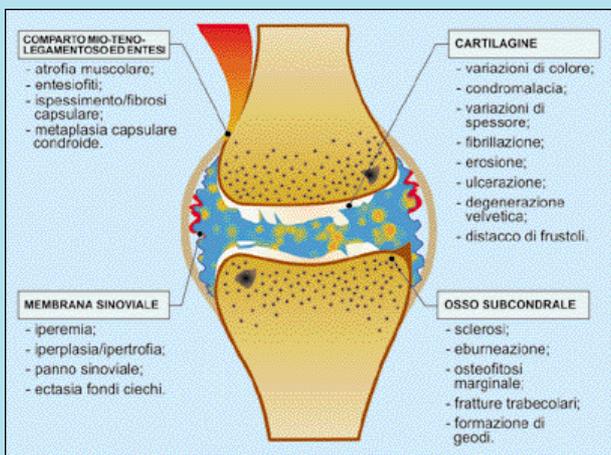


FIGURA 4 - Rappresentazione schematica delle principali alterazioni tissutali in corso di artrosi.

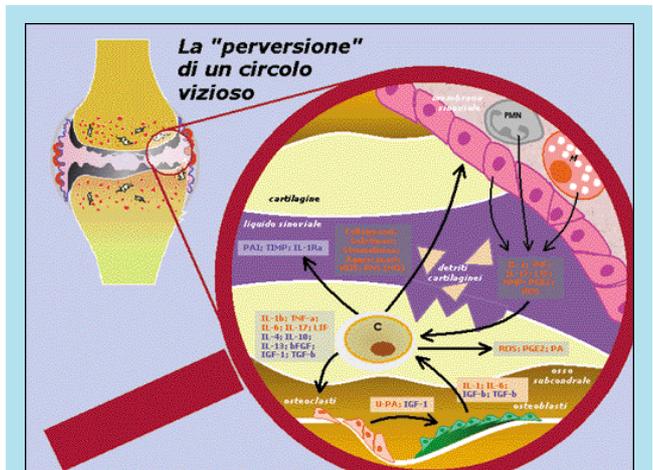


FIGURA 5 - I meccanismi molecolari nella patogenesi dell'artrosi. Molti mediatori a valenza distruttiva (in rosso) interagiscono tra loro in complicati circuiti di autoamplificazione del danno articolare e, prendendo il sopravvento su altre sostanze ad attività anabolica e riparativa (in blu), inducono degenerazione della cartilagine, alterano il turnover metabolico dell'osso subcondrale ed innescano la risposta infiammatoria della membrana sinoviale.

**Tabella 2**  
**Caratterizzazione chimica e meccanismi di produzione dei principali radicali liberi**

NATURA	ORIGINE	CATALIZZATORI
Anione superossido ( $O_2^-$ )	$NADPH + 2 O_2 \rightarrow NADP + H + 2 O_2^-$	NADPH ossidasi
	$O_2 \rightarrow O_2^-$	Xantina ossidasi
Perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ )	$2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Superossido dismutasi (SOD)
	$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ (2)	Catalasi; glutazione perossidasi
Radicale idrossilico ( $OH^\cdot$ )	$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH + OH^\cdot + O_2$	Ioni ferro e rame
	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH + OH^\cdot + Fe^{3+}$	
Acido ipocloroso (HOCl)	$H_2O_2 + 2 Cl^- \rightarrow 2 HOCl$	Mieloperossidasi (MPO)
Monossido di azoto (NO)	L-arginina + NADPH + $O_2 \rightarrow$ L-citrullina + NO + $H_2O$	NO sintetasi (NOS)
Perossinitrito ( $ONOO^-$ )	$NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$	NO sintetasi (NOS)

immunogeniche (es. frustoli osteocartilaginei). Nelle fasi conclamate dell'artrosi, tale processo è contraddistinto da tipiche alterazioni infiammatorie: ipertrofia/iperplasia della rete villosa, variazioni della microcircolazione locale (iperemia, proliferazione vasale ad ansa), imbibizione edematosa, accorsa di cellule infiammatorie, fino alla formazione del caratteristico "panno sinoviale" che va a ricoprire la cartilagine e ne accelera il "disfacimento" necrotico.<sup>18</sup>

Quello che si viene a creare è, in sostanza, un vero e proprio "circolo vizioso" di danno, basato sull'amplificazione di complicati circuiti molecolari a *feedback* che coinvolgono tutte le cellule presenti nel distretto articolare (Fig. 5).<sup>22</sup>

## I RADICALI LIBERI: DALLA TEORIA STOCASTICA ALLO STRESS OSSIDATIVO-INFIAMMATORIO

Una volta dimostrato che la patogenesi dell'artrosi si basa sull'azione sinergica di sostanze capaci di indurre la progressiva distruzione dei tessuti articolari, gran parte della ricerca si è concentrata nello sforzo di identificare i mediatori maggiormente responsabili di danni combinati degenerativi/infiammatori. Tra questi, un posto di rilievo spetta ai radicali liberi, iperprodotti dalle cellule articolari e non sufficientemente contrastati dal potenziale antiossidante endoarticolare.<sup>23</sup>

Identificati per la prima volta nel 1954,<sup>24</sup> i radicali liberi (Tab. 2) sono stati oggetto, soprattutto nell'ultimo decennio, di intensi studi, dapprima pressoché esclusivamente incentrati sull'affinamento delle tecniche adatte a quantificarli, e successivamente volti a definirne il coinvolgimento diretto in condizioni parafisiologiche (es. invecchiamento) e nell'eziopatogenesi di un ampio spettro di malattie (es. aterosclerosi, condizioni infiammatorie e degenerative croniche, neoplasie).<sup>25, 26</sup>

Fisiologicamente prodotti in piccole quantità dall'organismo - in quanto inevitabili tappe intermedie del metabolismo aerobico - i radicali liberi possiedono caratteristiche chimiche (elevata instabilità, emivita brevissima, diffusione

**Tabella 3**  
**Principali sistemi antiossidanti endogeni**

<b>ENZIMI</b>
Superossido dismutasi (SOD)
Catalasi (CAT)
Glutazione perossidasi (GSH-Px)
Glutazione reduttasi (GR)
<b>SOSTANZE RIDUCENTI</b>
Glutazione (GSH)
Acido ascorbico (vitamina C)
-tocoferolo (vitamina E)
<b>PROTEINE CHELANTI</b>
Ceruloplasmina
Transferrina
Ferritina

a breve distanza nell'ambiente circostante) che ne spiegano l'intrinseca tossicità.<sup>27, 28</sup>

In condizioni normali, questo potenziale tossico viene efficacemente neutralizzato da un *pool* di difese antiossidanti endogene (Tab. 3) che, operando di concerto, sono in grado di minimizzare gli effetti dell'insulto ossidativo, non solo intrappolando i radicali liberi (cosiddetta azione "*scavenger*"), ma anche catalizzandone la trasformazione e sequestrando ioni metallici - ferro e rame in particolare - necessari alla loro formazione.<sup>29</sup>

Si parla, in questa situazione, di "bilancia ossidativa", intendendo, con tale termine, il sofisticato e dinamico equilibrio biologico tra produzione di radicali liberi, da una parte, ed efficacia delle difese antiossidanti, dall'altra. In sostanza, un vero e proprio "paradosso della vita aerobica", tale per cui l'utilizzo dell'ossigeno necessariamente comporta la messa in atto di meccanismi che ne controllino la valenza tossica.<sup>30</sup>

Questo equilibrio può, d'altronde, essere turbato da una miriade di fattori - ambientali (es. raggi UV, inquinamento), parafisiologici (es. attività fisica, invecchiamento)

## BOX 1

## LA LETTERATURA CONFERMA...

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)... sono ora riconosciute come importanti molecole di segnale... Esse possono influenzare la proliferazione e la morte (sia per necrosi che per apoptosi) delle cellule...

*Reactive oxygen species (ROS)... are now recognized as important signalling molecules... ROS may influence cell proliferation, cell death (either apoptosis or necrosis)...*

Hancock JT et al., 2001, Biochemical Society Transactions, 29(2): 345-350

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) funzionano come secondi messaggeri in grado di propagare segnali pro-infiammatori o di proliferazione cellulare. Diretta conseguenza di ciò è che lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica sono tra loro correlati, se non addirittura meccanismi inseparabili.

*Reactive oxygen species (ROS) function as messenger molecules to propagate pro-inflammatory or growth-stimulatory signals. With this knowledge has come the corollary realization that oxidative stress and chronic inflammation are related, perhaps inseparable phenomena.*

Hensley K et al., 2000, Free Radical Biology & Medicine, 28(10): 1456-1462

o francamente patologici (es. traumi, infezioni, infiammazioni) - che aumentano considerevolmente la formazione di radicali liberi e che, di pari passo, riducono l'efficienza delle difese antiossidanti (Fig. 6).<sup>31, 32, 33</sup> In questi casi, si instaura una condizione nota come "stress ossidativo", ad indicare l'alterato rapporto tra fattori pro-ossidanti e meccanismi di difesa antiossidante.<sup>34, 35, 36</sup> Presenti in eccesso, i radicali liberi agiscono da potenti "tossine endogene", capaci di danneggiare i costituenti ubiquitari dei tessuti (proteine, lipidi, acidi nucleici, carboidrati)<sup>37</sup>, alterare la permeabilità e l'approvvigionamento energetico delle cellule, attivare gli enzimi responsabili della morte cellulare per apoptosi<sup>38, 39</sup>.

Allo stato attuale, l'interpretazione dello stress ossidativo come "accidente", giocoforza connesso al metabolismo aerobico e da cui dipendono danni tissutali aspecifici (cosiddetta "teoria stocastica"), si è arricchita di nuovi ed importanti risvolti, grazie all'affermarsi di un nuovo paradigma. Tale paradigma si basa sostanzialmente sulla valutazione dei radicali liberi non solo come potenziali tossine, quanto piuttosto come "molecole di segnale" (*signaling molecules*), veri e propri "secondi messaggeri" che influenzano la proliferazione e la crescita cellulare ed attivano enzimi (es. ciclo-ossigenasi) e specifici fattori di trascrizione genica (es. NFκB, protein chinasi), direttamente implicati nell'innescò e nella propagazione di risposte immunitarie ed infiammatorie (Box 1)<sup>40, 41, 42, 43, 44</sup>

La conseguenza più immediata di questa recente rivisitazione dei radicali liberi è la loro ridefinizione biologica in termini di mediatori principali del cosiddetto "stress ossidativo-infiammatorio". L'accumulo incontrollato di radicali liberi è, cioè, responsabile, oltre che dei danni cellulari imputabili ad un alterato stato ossidativo, anche delle modifiche fisiopatologiche connesse all'attivazione della cascata infiammatoria (Fig. 6).<sup>45</sup>

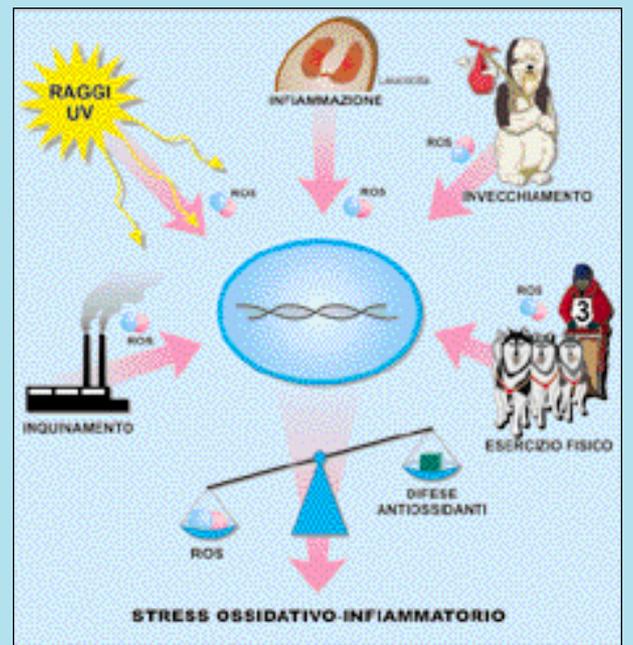


FIGURA 6 - Stress ossidativo-infiammatorio: molteplici fattori inducono un aumento della produzione radicalica e rendono insufficiente il potenziale di difesa antiossidante endogena.

## MECCANISMI DI IPERPRODUZIONE DEI RADICALI LIBERI IN CORSO DI ARTROSI

Una delle prime tessere a comparire nel complesso mosaico biologico relativo al ruolo dei radicali liberi nella patogenesi dell'artrosi è stata la dimostrazione delle molteplici vie attraverso cui essi vengono iperprodotti all'interno del microambiente articolare. Si è visto, in particolare, che queste specie reattive possono originare in seguito a:

### 1. Danno diretto

Carichi meccanici anomali e/o eccessivi o traumi diretti alle strutture articolari ingenerano un'immediata produzione radicalica, quale diretta conseguenza della rottura dei legami covalenti tra molecole.<sup>2, 46, 47</sup>

### 2. Ipossia/riperfusione

In condizioni normali, indipendentemente dal movimento o dal carico applicato all'articolazione, la pressione intrarticolare ha valori negativi subatmosferici, condizione essenziale per garantire sia la stretta contiguità anatomica tra membrana sinoviale e cartilagine, sia la pervietà dei vasi sinoviali da cui primariamente dipende l'apporto nutritivo al tessuto cartilagineo avascolare.<sup>48</sup> Ciò non accade quando compare uno stato infiammatorio articolare. In questa condizione, le alterazioni microcircolatorie, unitamente all'aumentata produzione di liquido sinoviale, determinano la variazione della pressione idrostatica intrarticolare che, durante il movimento, supera la pressione di perfusione dei capillari.<sup>49</sup> La conseguenza è l'instaurarsi di reiterati o protratti stati ipossici, durante i quali si determinano quelle variazioni metaboliche dei tessuti articolari da cui dipende, nel successivo periodo di riperfusione, un considerevole aumento della produzione di radicali liberi da parte delle cellule endoteliali (Fig. 7).<sup>50, 51, 52</sup>

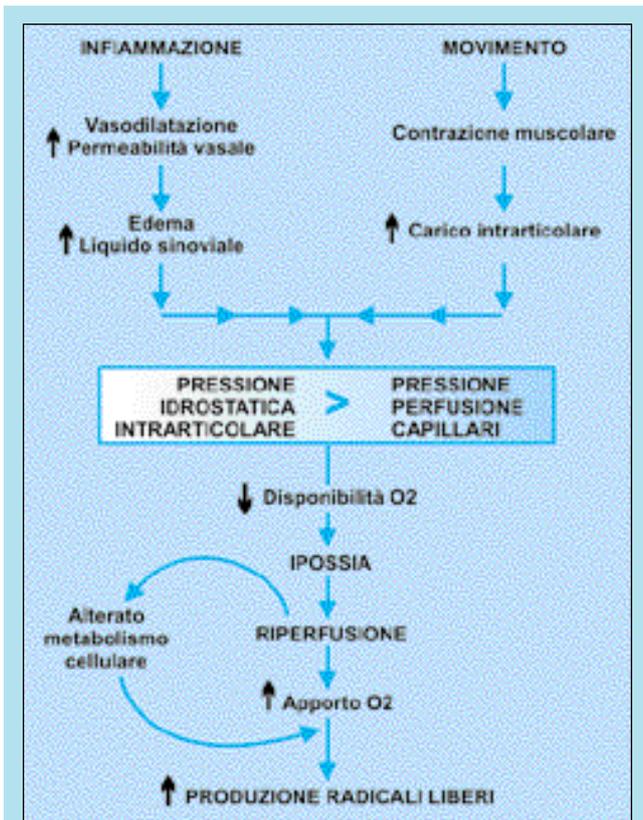


FIGURA 7 - La cascata di iperproduzione dei radicali liberi in condizioni di ipossia/riperfusione.

### 3. Microemorragie

Traumi ed infiammazioni si accompagnano molto spesso a microemorragie intrarticolari. L'emoglobina che, in questi casi, si deposita nei tessuti, agisce da potente fattore flogogeno, catalizzando - grazie agli ioni ferro in essa contenuti - la formazione di radicali idrossilici, potenti induttori di danni perossidativi a carico dell'endotelio, nonché di alterazioni del turnover osseo e della vitalità cellulare (condrociti in particolare).<sup>53, 54, 55</sup>

### 4. Infiammazione

In corso di infiammazione, i radicali liberi vengono iperprodotti non solo da cellule articolari residenti (sinoviociti, condrociti, fibroblasti, macrofagi, mastociti, cellule endoteliali), ma anche da elementi circolanti richiamati *in situ* dalla flogosi locale.<sup>33</sup> Tra questi, i polimorfonucleati neutrofili (PMN) - unitamente ai macrofagi concentrati nel panno sinoviale tipico delle fasi avanzate di artrosi - sono la fonte più conosciuta di radicali liberi, in grado, a loro volta, di amplificare e cronicizzare il danno infiammatorio in atto, inducendo il rilascio, da parte degli stessi neutrofili attivati, di mediatori flogistici, degradativi e chemotattici.<sup>2, 56, 57, 58, 59</sup>

## I DANNI INDOTTI DAI RADICALI LIBERI IN CORSO DI ARTROSI

### Cartilagine articolare: condrodegenerazione

È ormai pienamente dimostrato che i condrociti rappresentano una delle fonti più importanti di radicali libe-

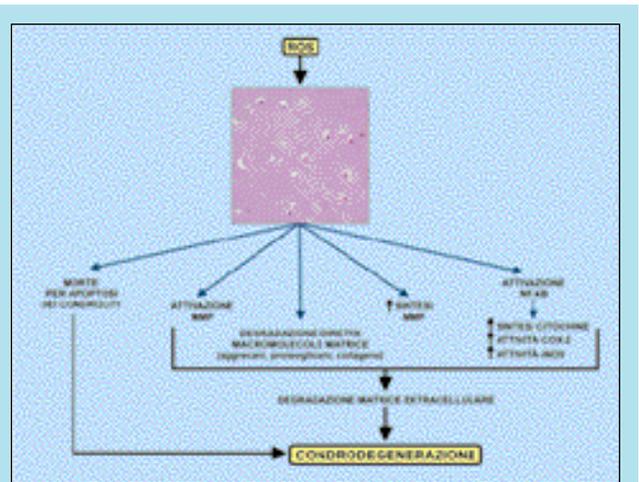


FIGURA 8 - I danni mediati dai radicali liberi nella cartilagine articolare. (Immagine istologica per gentile concessione di Research & Innovation S.c.a.r.l.)

ri, essendo in grado di produrne quantità limitate in condizioni fisiologiche, ma di aumentarne marcatamente il rilascio in svariate situazioni patologiche.<sup>60, 61, 62, 63</sup> È quanto accade in corso di artrosi, dove i condrociti, iperattivati da stimoli meccanici e da un surplus di citochine ad attività catabolica e pro-infiammatoria (IL-1, TNF), generano ingenti quantità di radicali liberi,<sup>64, 65, 66</sup> capaci di compromettere a più livelli l'omeostasi del tessuto cartilagineo (Fig. 8).

In particolare, si è dimostrato che essi inducono:

#### 1. Apoptosi dei condrociti

Le ricerche più recenti hanno definitivamente confermato il ruolo dello stress ossidativo nella catena di eventi che conducono alla morte cellulare programmata (apoptosi).<sup>67, 68</sup> In tale processo, i radicali liberi inducono, infatti, quelle modifiche perossidative a carico di lipidi e proteine, tappa obbligata per avviare le alterazioni di membrana e la successiva frammentazione cellulare. I condrociti si sono rivelati tra le cellule più vulnerabili all'azione citotossica dei radicali liberi (ROS e NO) che sono in grado di comprometterne rapidamente il potenziale proliferativo e la produzione energetica<sup>69, 70</sup> e decretarne, infine, la morte per apoptosi.<sup>71, 72</sup>

#### 2. Degradazione della matrice extracellulare

I radicali liberi hanno la capacità di degradare le principali macromolecole della matrice cartilaginea (aggrecani, collagene, acido ialuronico), innescando diversi meccanismi di danno litico:

- ❑ rottura diretta (*cleavage*) di aggrecani, collagene di tipo II ed acido ialuronico;<sup>73, 74, 75</sup>
- ❑ inibizione della sintesi dei proteoglicani<sup>76, 77</sup> ed alterazione della composizione qualitativa dei glicosaminoglicani;<sup>78</sup>
- ❑ attivazione delle proteasi, principali enzimi responsabili della lisi della matrice cartilaginea (es. metalloproteasi, cisteinoproteasi, serinoproteasi ed aggregasi).<sup>79, 80</sup>

Ai radicali liberi è stata, in particolare, attribuita un'influenza progressivamente più vasta sul poten-

ziale litico delle metalloproteasi (MMP), essendo in grado di attivarne le forme latenti<sup>81, 82</sup> e di antagonizzare, nel contempo, l'azione dei corrispondenti inibitori (es. TIMP);<sup>83</sup>

- induzione della sintesi di enzimi proteolitici: è recente la dimostrazione che i radicali liberi iperprodoti intervengono anche nei meccanismi di attivazione di specifici fattori (NF- $\kappa$ B, protein chinasi), preposti alla sintesi degli enzimi ad attività condrolitica (es. collagenasi, gelatinasi).<sup>84, 85, 86</sup> Ciò costituisce un tassello essenziale per allargare a dismisura il ruolo centrale dei radicali liberi nel "circolo vizioso" della condrodegenerazione, in quanto molecole capaci non solo di mediare il danno ai condrociti ed ai componenti di matrice, ma anche di amplificare, e sostenere nel tempo, l'insulto tissutale.

Un discorso a parte merita uno specifico radicale libero, il monossido di azoto o NO (*nitric oxide*), recentemente chiamato in causa quale responsabile di danno artrosico, così come illustrato nel Box 2.

## Membrana sinoviale: infiammazione reattiva

Dagli anni Novanta ai giorni nostri, si è assistito ad un enorme proliferare di ricerche che hanno definitivamente dimostrato l'esistenza di un legame funzionale diretto tra danno ossidativo, infiammazione sinoviale e dolore articolare.<sup>111, 112</sup>

Iperprodotto da numerose cellule del comparto sinoviale come mastociti (Box 3), fibroblasti, sinoviociti di tipo A e cellule endoteliali, i radicali liberi agiscono, infatti, a più livelli nell'ambito della cascata infiammatoria ed algogena che accompagna l'artrosi (Fig. 9).

Essi, in particolare, sono in grado di indurre:

### 1. L'attivazione di fattori preposti alla sintesi di mediatori pro-infiammatori

Uno dei più importanti meccanismi alla base dell'infiammazione è sicuramente l'attivazione di fattori cellulari specifici (NF- $\kappa$ B e protein chinasi) da cui dipende la sintesi di un composito spettro di sostanze direttamente coinvolte nella genesi e nella progressione della risposta

## BOX 2

### MONOSSIDO DI AZOTO (NO): DA MODULATORE FISIOLÓGICO A MARKER DI ARTROSI

Il monossido di azoto (NO) - una piccola molecola gassosa chimicamente semplice, ma altamente reattiva - può contare su una mole di studi scientifici veramente impressionante, che dalla metà degli anni Ottanta ad oggi, ne hanno radicalmente mutato il profilo biologico. Sintetizzato a partire dall'aminoacido L-arginina per azione di un enzima - la NO-sintetasi (NOS) - presente costitutivamente nelle cellule endoteliali e nervose, NO ha nel tempo assunto il ruolo di messaggero biologico multifunzionale, in grado di esercitare attività omeostatiche essenziali, come la regolazione del flusso sanguigno, l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, la modulazione del sistema immunitario e la trasmissione neuronale.<sup>87</sup>

Parimenti, è stato dimostrato che NO può essere iperprodotto in diverse condizioni patologiche - infiammazione *in primis* - grazie all'induzione di un'altra forma di NOS - la NOS inducibile - espressa da numerosi stipti cellulari.<sup>88</sup>

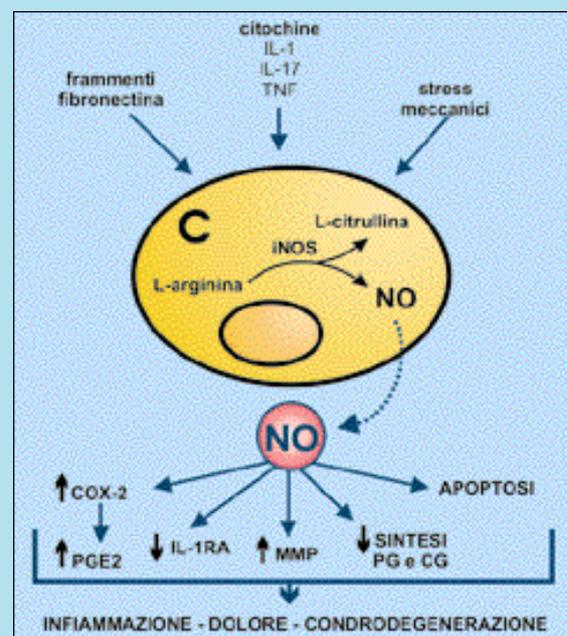
Tra le malattie caratterizzate da accumulo patologico di NO, figurano anche specifiche artropatie, come l'artrite reumatoide e l'artrosi<sup>89, 90</sup>, in cui sono stati definitivamente accertati - nell'uomo,<sup>91</sup> nel cane<sup>92</sup> e nel cavallo<sup>93</sup> - l'aumento dell'attività NO-sintetasi e la correlazione tra elevati livelli di questo radicale e gravità del processo patologico in atto.<sup>94, 95</sup>

In corso di artrosi, la fonte cellulare più importante di NO è rappresentata dai condrociti,<sup>96</sup> attivati da mediatori pro-infiammatori (es. IL-1, IL-17, TNF), da frammenti di matrice in degenerazione o da stress meccanici.<sup>97, 98</sup> Prodotto in concentrazioni superiori a quelle compatibili con le attività di modulazione fisiologica, NO reagisce con altri radicali liberi e, dopo trasformazione in molecole estremamente tossiche, come i perossinitriti e i radicali idrossilici, diventa mediatore di danno a carico della cartilagine articolare tramite disparati meccanismi pro-catabolici:

- induce la morte per apoptosi dei condrociti<sup>99, 100, 101</sup> dai cui residui situati nelle zone marginali sottoposte a maggior stress meccanico, prenderanno origine, in seguito ad un processo di ossificazione encondrale, gli osteocondrofiti patognomonicamente di artrosi;<sup>102, 103</sup>
- inibisce la sintesi delle macromolecole di matrice (proteoglicani e collagene di tipo II)<sup>104</sup>, e ne altera le caratteristiche qualitative (es. grado di solfatazione);<sup>105</sup>
- aumenta la produzione e l'attività delle metalloproteasi (MMP);<sup>106</sup>
- inattiva sostanze ad azione inibente le metalloproteasi (es. TIMP);<sup>107</sup>
- diminuisce la produzione di fattori che agiscono da antagonisti di alcune citochine, in particolare l'IL-1RA.<sup>108</sup>

D'altra parte, NO è direttamente coinvolto anche nella genesi dell'infiammazione articolare. Iperprodotto anche da sinoviociti di tipo A, mastociti<sup>109</sup>, macrofagi e fibroblasti, questo importante radicale favorisce l'innesto flogistico dell'artrosi stimolando l'attività della cicloossigenasi di tipo 2 (COX-2),<sup>110</sup> l'enzima preposto alla produzione dei mediatori infiammatori per eccellenza, come prostaglandine e trombossani.

Allo stato attuale, NO si può a buon diritto considerare protagonista del danno artrosico, capace cioè, una volta prodotto in eccesso, di potenziare le vie degradative ed innescare simultaneamente quelle classiche dell'infiammazione.



BOX 3

IL MASTOCITA SINOVALE

Nel cane, come nell'uomo, si è inequivocabilmente dimostrata l'esistenza di mastociti sinoviali, preferenzialmente situati nello strato subintimale, a stretto contatto con microvasi e terminazioni nervose.<sup>121, 122</sup> Intorno alla loro biologia, sono nati specifici filoni di ricerca che ne hanno messo in evidenza le straordinarie potenzialità, da una parte definendone il ruolo di "regolatori omeostatici" dell'ambiente articolare e, dall'altra, decretandone il coinvolgimento diretto nell'artrite reumatoide e nell'artrosi.<sup>123, 124, 125</sup> In tali artropatie, i mastociti - aumentati di numero in special modo nelle zone di giunzione tra i diversi tessuti articolari, dove maggiore è l'entità del danno combinato flogistico e degenerativo<sup>126, 127</sup> - vengono iperattivati da un ampio ventaglio di stimoli agonisti. Citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-10, TNF), fattori di crescita (TGF, SCF), neuropeptidi (sostanza P, CGRP, NGF), enzimi litici (triptasi, chimasi) e frammenti di macromolecole di matrice convergono sulle cellule mastocitarie avviando il rilascio per degranolazione di un'enorme pletora di mediatori a significato proteolitico, vasoattivo, chemotattico e pro-infiammatorio.<sup>128, 129, 130, 131</sup> Il risultato finale è l'amplificazione dei danni degenerativi ed infiammatori a carico dei diversi tessuti articolari:

- **cartilagine:** enzimi litici (triptasi, chimasi), citochine (IL-6, TNF) e radicali liberi (ROS, NO) di provenienza mastocitaria attivano le forme latenti di specifiche metalloproteinasi (collagenasi, stromelislina)<sup>132, 133, 134</sup> o ne inattivano i corrispondenti inibitori,<sup>135</sup> contribuendo, in tal modo, ad amplificare la distruzione della matrice.<sup>136</sup> Inoltre, mediatori come TNF ed istamina stimolano direttamente i condrociti a produrre altri metaboliti pro-infiammatori (prostaglandine, leucotrieni), destinati ad alimentare il "circolo vizioso" del danno artrosico;
- **osso subcondrale:** l'iperdegranolazione mastocitaria compromette seriamente l'omeostasi della matrice ossea, a causa del rilascio di sostanze che ne accelerano il riassorbimento e ne ritardano la deposizione (es. IL-6, TNF, PGE<sub>2</sub>);
- **membrana sinoviale:** le sostanze contenute nei mastociti (amine vasoattive, citochine e fattori chemotattici) influenzano direttamente i microvasi sinoviali, innescando le caratteristiche alterazioni infiammatorie dell'ambiente endoteliale: vasodilatazione ed aumento di permeabilità, aumentata espressione delle molecole di adesione, chemiotassi e diapedesi leucocitaria. Prostaglandine e radicali liberi rilasciati dai mastociti attivati agiscono anche sulla rete nervosa locale, abbassando la soglia di sensibilità dei nocicettori periferici e stimolando la liberazione di neuropeptidi capaci, a loro volta, di evocare la risposta infiammatoria delle cellule limitrofe.
- **capsula articolare:** la produzione di sostanze cosiddette "profibrotiche" (bFGF, IL-4) assegna ai mastociti un ruolo chiave anche nell'induzione della fibrosi capsulare che contraddistingue le forme più avanzate di artrosi.

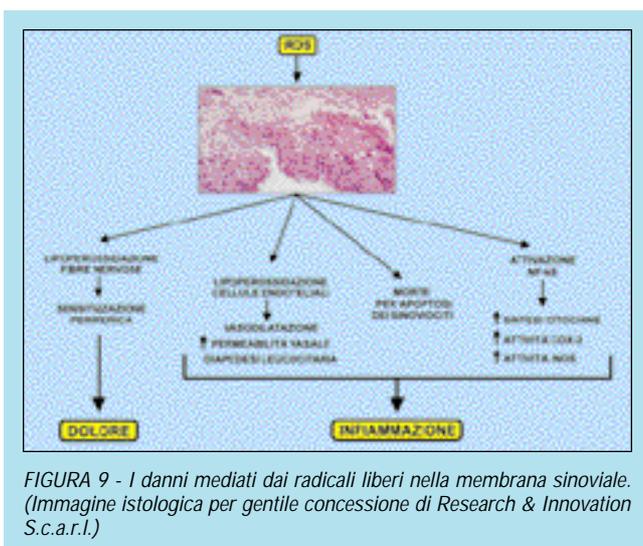
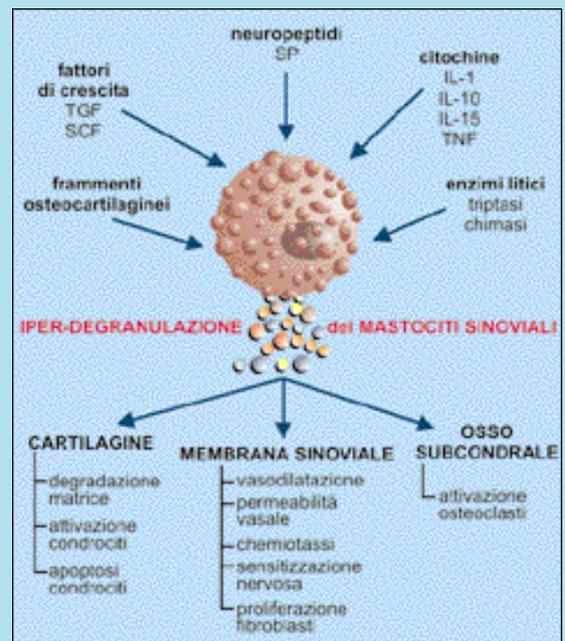


FIGURA 9 - I danni mediati dai radicali liberi nella membrana sinoviale. (Immagine istologica per gentile concessione di Research & Innovation S.c.a.r.l.)

flogistica.<sup>113</sup> I radicali liberi agiscono da "segnali intracellulari" per l'attivazione dell'NF-κB in numerosi stipiti cellulari,<sup>114, 115, 116</sup> con conseguente induzione della sintesi di un variegato ventaglio di sostanze pro-infiammatorie, come citochine (es. IL-1, TNF, IL-6, IL-8), molecole di

adesione, enzimi litici (MMP) ed enzimi a chiara impronta flogistica (es. ciclo-ossigenasi e NO-sintetasi).<sup>117, 118</sup>

2. Le alterazioni microcircolatorie

Oltre ad indurre apoptosi delle cellule endoteliali,<sup>119</sup> i radicali liberi danneggiano le componenti lipoproteiche delle pareti vasali, avviando la classica risposta vascolare dell'infiammazione: vasodilatazione ed aumento di permeabilità, espressione di molecole di adesione, migrazione e conseguente infiltrazione nei tessuti periarticolari di cellule infiammatorie circolanti (monociti, linfociti e leucociti polimorfonucleati), a loro volta fonte inesauribile di radicali liberi ad attività degradativa e flogistica.

3. Danni alle terminazioni nervose

I radicali liberi inducono gravi alterazioni perossidative a carico delle guaine mieliniche che avvolgono le fibre nervose periferiche. Ciò comporta gravi modifiche nell'elettrofisiologia dei nervi deputati alla trasmissione dolorifica (fibre di tipo C e A ), con abbassamento della soglia di eccitabilità (sensibilizzazione), esagerata percezione degli stimoli dolorosi (iperalgesia) e comparsa di dolore ad andamento cronicizzante.<sup>120</sup>

BOX 4

LE VIE DEL DOLORE NELL'ARTROSI

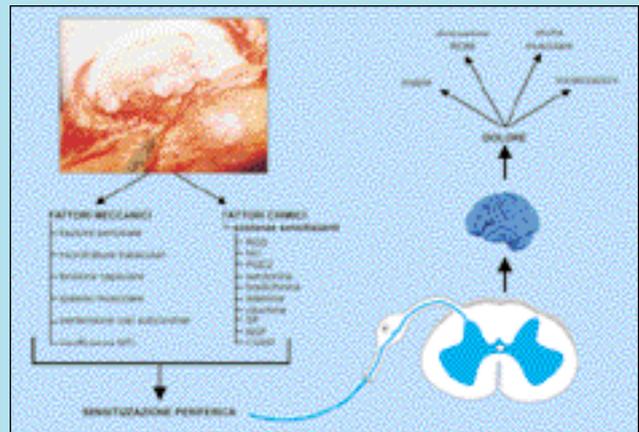
Le cause che scatenano il dolore nell'artrosi sono riconducibili essenzialmente a fattori di natura meccanica e chimica che coinvolgono i tessuti articolari, con esclusione della cartilagine, in quanto trattasi di tessuto aneurale, cioè, privo di innervazione.

■ Fattori meccanici.

Abnormi sollecitazioni meccaniche alterano i normali meccanismi di ricezione dei nocicettori periferici sinoviali ed ossei, generando una prolungata ed esagerata risposta delle fibre nervose afferenti a livello centrale, con conseguente percezione di dolore cronico. Tra gli stimoli meccanici di più frequente riscontro in corso di artrosi, si ritrovano lo stiramento delle terminazioni nervose periosteali, provocato dagli osteocondrofiti con meccanismo di trazione capsulare, l'eccessiva distensione della capsula articolare, l'inefficienza delle strutture mio-teno-legamentose di contenimento e la conseguente instabilità dell'articolazione, gli spasmi muscolari, l'ipertensione midollare dovuta alle variazioni di flusso ematico a livello delle trabecole dell'osso subcondrale sclerotico, le microfrazture ossee.<sup>138</sup>

■ Fattori chimici.

L'infiammazione è direttamente chiamata in causa nella genesi del dolore artrosico, a causa di quel pool di "mediatori algogeni", rilasciati dalle cellule articolari, da elementi circolanti o dalle locali terminazioni nervose, che nel loro insieme sono stati definiti "the peripheral jungle" dagli anglosassoni o "la soupe peripherique" dai francesi. Bradichinina, istamina, serotonina, prostaglandine, ROS ed NO fanno tutti parte di questo pool. Si tratta di sostanze chimiche rilasciate in eccesso da diversi stipiti cellulari (mastociti, sinoviociti, PMN, piastrine e macrofagi) ed implicate nelle modifiche nocicettive tipiche dell'artrosi, in quanto in grado di sovrastimolare le fibre dolorifiche o, altresì, di sensitizzarle nei confronti di stimoli di altra natura (es. meccanici, termici).<sup>139, 140, 141, 142</sup> Nell'"organigramma" dei trasmettitori implicati nella nocicezione, un posto di riguardo spetta anche ai mediatori del dolore cosiddetti "neurogenici" (neuropeptidi come sostanza P, neurochinine, CGRP) che, liberati dalle stesse fibre nocicettive, sono suscettibili di prolungare lo stato di iperalgesia periferica<sup>143</sup> e di evocare, a loro volta, una risposta infiammatoria circostante (infiammazione neurogenica). Tra questi, un cenno particolare merita la sostanza P, per la quale è stata dimostrata, almeno nell'uomo, una concentrazione significativamente maggiore nelle articolazioni a più alto rischio artrosico (es. ginocchio)<sup>144</sup> accompagnata da una selettiva distribuzione nelle zone specificatamente interessate da fenomeni erosivi e di rimodellamento (osteofitosi).<sup>145</sup> Questo neuropeptide, oltre ad indurre vasodilatazione ed aumento di permeabilità vasale, stimola i sinoviociti A e B, nonché i macrofagi a produrre prostaglandine e radicali liberi<sup>146</sup>, causando, nel contempo, l'attivazione neurogenica dei mastociti sinoviali ed il conseguente rilascio di altri mediatori a valenza algogena e pro-infiammatoria (istamina, serotonina, interleuchine, prostaglandine, ROS, NO, NGF, TNF).<sup>147, 148</sup>



L'importanza dei radicali liberi nella genesi del dolore artrosico (Box 4) è dovuta anche ad un'azione sensitizzante diretta sui nocicettori periferici, nonché alla capacità di potenziare l'effetto algogeno di altri mediatori (bradichinina, PGE<sub>2</sub>) e di stimolare il rilascio di neuropeptidi da parte delle fibre nervose sovrastimate (Box 4).<sup>137</sup>

Osso subcondrale: alterazione del rimodellamento

L'alterato ambiente ossidativo influenza negativamente anche il metabolismo dell'osso subcondrale. Iperprodotti dagli osteoblasti e dagli osteoclasti<sup>149</sup>, a loro volta attivati dal surplus di citochine pro-infiammatorie, i radicali liberi rappresentano, infatti, fattori locali decisivi nell'avviare un disequilibrio progressivo tra riassorbimento e deposizione di matrice ossea. È stato, infatti, dimostrato che i radicali liberi favoriscono, in particolar modo, la comparsa di manifestazioni di tipo erosivo per esaltazione dell'attività degli osteoclasti (Fig. 10).<sup>150</sup>

Un discorso a parte spetta, in questo campo, al monossido di azoto (NO), in virtù del comportamento bifasico che esercita su questo tessuto.<sup>151</sup> Infatti, bassi livelli di questo radicale gassoso aumentano il riassorbimento osteoclastico della matrice ossea. Viceversa, concentrazioni maggiori di NO inibiscono l'attività sia degli osteoclasti che

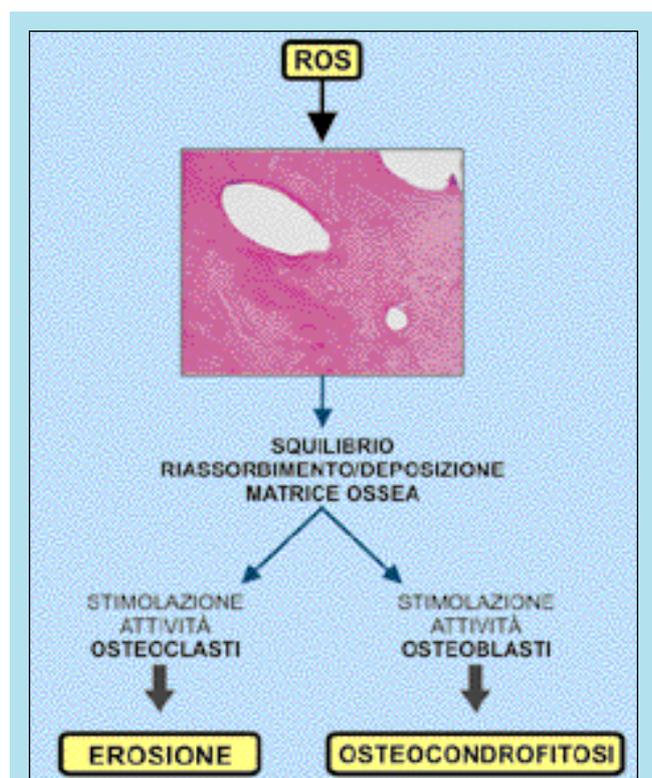


FIGURA 10 - Attività dei radicali liberi sulle cellule ossee. (Immagine istologica per gentile concessione di Research & Innovation S.c.a.r.l.)

degli osteoblasti, compromettendo gravemente il turnover di matrice.<sup>152, 153</sup> È stato ipotizzato che questa potrebbe essere la spiegazione della limitatezza dei fenomeni erosivi che si riscontrano in molte artropatie, artrosi compresa. La produzione di NO potrebbe, in sostanza, rappresentare la messa in atto di un meccanismo protettivo innescato in condizioni patologiche ed incentrato sulla regolazione dell'attività osteoclastica.<sup>154</sup>

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

La ricerca di base nel campo della biologia dei radicali liberi ha generato, negli ultimi anni, risultati di primaria importanza per la comprensione dei complicati meccanismi patogenetici dell'artrosi. Considerati in passato semplici composti "di scarto" del metabolismo aerobico, oggi i radicali liberi sono stati ridefiniti come veri e propri induttori di danno artrosico, capaci, cioè, di innescare alterazioni, degenerative ed infiammatorie, in virtù della triplice potenzialità di:

- attuare la degradazione diretta dei costituenti macromolecolari dei tessuti articolari, in primo luogo della cartilagine;
- attivare una serie di sostanze ad azione degenerativa e pro-infiammatoria;

## ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

<b>bFGF</b>	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
<b>C</b>	Condrocita
<b>CG</b>	Collagene
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonin Gene-Related Protein</i>
<b>COX-2</b>	Ciclo-ossigenasi 2
<b>IGF</b>	<i>Insulin Growth Factor</i>
<b>IL-1</b>	Interleuchina-1
<b>IL-1Ra</b>	<i>Interleukin-1 Receptor antagonist</i>
<b>IL-4</b>	Interleuchina-4
<b>IL-6</b>	Interleuchina-6
<b>IL-8</b>	Interleuchina-8
<b>IL-10</b>	Interleuchina-10
<b>IL-13</b>	Interleuchina-13
<b>IL-15</b>	Interleuchina-15
<b>IL-17</b>	Interleuchina-17
<b>iNOS</b>	NO-sintetasi inducibile
<b>LIF</b>	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
<b>M</b>	Mastocita
<b>MMP</b>	<i>Matrix MetalloProteinases</i>
<b>MTL</b>	unità Mio-Teno-Legamentosa
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor-kappa Beta</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve Growth Factor</i>
<b>NO</b>	<i>Nitric oxide</i> (monossido di azoto)
<b>NOS</b>	NO-sintetasi
<b>PA</b>	<i>Plasminogen Activator</i>
<b>PG</b>	Proteoglicani
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina2
<b>PMN</b>	Leucociti PoliMorfoNucleati
<b>RNS</b>	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Specie reattive dell'azoto)
<b>ROM</b>	<i>Range of motion</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Specie reattive dell'ossigeno)
<b>SCF</b>	<i>Stem Cell Factor</i>
<b>SP</b>	Sostanza P
<b>TGF</b>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<b>TIMP</b>	<i>Tissue Inhibitor MetalloProteinases</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>u-PA</b>	<i>urokinase-Plasminogen Activator</i>

c. agire da "segnali intracellulari" che danno il via ai meccanismi molecolari responsabili della risposta infiammatoria ed immunitaria.

Non c'è dubbio che, grazie alle numerose evidenze scientifiche che hanno portato alla dimostrazione del ruolo centrale dei radicali liberi nello stress ossidativo-infiammatorio, si siano aperti nuovi orizzonti nello studio e nella terapia dell'artrosi. Ad una fase in cui le strategie di ricerca si sono focalizzate sull'utilizzo di sostanze in grado di contrastare esclusivamente i fenomeni condrodegenerativi, è destinata a succedere una fase in cui vengono privilegiate le indagini volte a valutare, sia *in vivo* che *in vitro* (es. colture cellulari), il ripristino del corretto ambiente ossidativo endoarticolare e, attraverso questo, il controllo dei risvolti degenerativi, infiammatori ed algogeni associati al suo disequilibrio.

## Ringraziamenti

*Si ringrazia il Dr. Pietro Riecaboni della Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano per aver fornito il preparato di cui alla Figura 1.*

## Parole chiave

*Artrosi, cane, radicali liberi, stress ossidativo, infiammazione.*

## Key words

*Osteoarthritis, dog, free radicals, oxidative stress, inflammation.*

## Bibliografia

- Greenwald RA: Oxygen radicals, inflammation and arthritis. Pathophysiological considerations and implications for treatment. *Sem Arth Rheum* 20: 219-240, 1991.
- Milam SB, Zardeneta G, Schmitz JP: Oxidative stress and degenerative temporomandibular joint disease: a proposed hypothesis. *J Oral Maxillofac Surg* 56: 214-223, 1998.
- Mortellaro CM, Petazzoni M, Miolo A: L'artrosi nel cane. *Veterinaria Suppl.* 1: 1-39, 1999.
- Mortellaro CM: Dall'età dello sviluppo all'articolazione anziana: inquadramento clinico dell'artrosi. *Inn Vet Med* 1(4): 2-3, 2001.
- Martinez SA: Congenital conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 27(4): 735-758, 1997.
- Bennett D: Developmental joint disease, in: "Aspects of arthrology", Proceedings of the FECAVA Continuing Education Course, Lillehammer Norway, 11-14 March, 1999, pp.7-13.
- Cook JL: Forelimb lameness in the young patient. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 31(1): 55-83, 2001.
- McLaughlin RM: Hindlimb lameness in the young patient. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 31(1): 101-123, 2001.
- Martinez SA, Coronado GS: Acquired conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 27(4): 759-775, 1997.
- Muir P: L'esame clinico del cane con zoppia. *Veterinaria* 12(6): 75-84, 1998.
- Pedersen NC, Morgan JP, Vasseur PB: Joint diseases of dogs and cats. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ed by SJ Ettinger, EC Feldman. Philadelphia, WB Saunders Co, 2000, pp 1862-1886.

12. Schulz KS: Forelimb lameness in the adult patient. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 31(1): 85-99, 2001.
13. Roush JK: Hind limb lameness in the mature dog. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 31(1): 125-141, 2001.
14. Tajana G, Parente C: Anatomia patologica dell'artrosi. In: L'artrosi. Ed. R. Marcolongo R. Milano, Modern srl, 1996
15. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J: Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Disease Clin North Am* 19(3): 545-568, 1993.
16. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB: Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthr Rheum* 44(6): 1237-1247, 2001.
17. Ayril X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M: Synovitis predicts the arthroscopic progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis. *Osteoarthritis & Cartilage* 9(Suppl. B): S2, 2001.
18. Mortellaro CM, Miolo A: Patogenesi dell'artrosi: da cosa nasce cosa. *Inn Vet Med* 1(4): 4-6, 2001.
19. Loneux M, Balligand M: L'osteoarthrose chez le chien. I. Pathophysiologie et diagnostic. *Ann Med Vet* 143: 153-160, 1999.
20. Malesud CJ: Fundamental pathways in osteoarthritis: an overview. *Frontiers in Bioscience* 4: d659-d661, 1999.
21. Brandt KD, Myers SL, Burr D, Albrecht M: Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthr Rheum* 34(12): 1560-1570, 1991.
22. Martel-Pelletier J, Alaeddine N, Pelletier JP: Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience*, 4: d694-d703, 1999.
23. Dimock AN, Siciliano PD, McIlwraith CW: Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. *Equine Vet J* 32(5): 439-443, 2000.
24. Commoner B, Townsend J, Pake GE: Free radicals in biological materials. *Nature* 174: 689-691, 1954
25. Liu TZ, Stern A: Assessment of the role of oxidative stress in human diseases. *J Biomed Lab Sci* 10(1): 12-18, 1998.
26. Spector A: Review: oxidative stress and disease. *J Ocular Pharmacol Ther* 16(2): 193-201, 2000.
27. Kehrer J: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 21: 21-48, 1993.
28. Ignatowicz E, Rybczynska M: Some biochemical and pharmacological aspects of free radical-mediated tissue damage. *Polish J Pharmacol* 46: 103-114, 1994.
29. Mates JM, Sanchez-Jimenez F: Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience*, 4: 339-345, 1999.
30. Davies KJA: Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61: 1-31, 1995.
31. Obra R, Harper EJ, Lunec J: Exercise in healthy adult dogs increase plasma TBARS - an indicator of oxidative stress. *Faseb J* 13(4): 446, 1999.
32. Fielding RA, Meydani M: Exercise, free radical generation and aging. *Aging Clin Exp Res* 9: 12-18, 1997.
33. Li LJ, Leichtweis S: Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age* 20: 91-106, 1997.
34. Betteridge DJ: What is oxidative stress? *Metabolism* 49(2) Suppl.1: 3-8, 2000.
35. Sayre LM, Smith MA, Perry G: Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8: 721-738, 2001.
36. Cizewski Culotta V: Superoxide dismutase, oxidative stress and cell metabolism. *Curr Top Cell Reg* 36: 117-132, 2000.
37. Cochrane CG: Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 91(Suppl 3C): 23S-30S, 1991.
38. Saini KS, Walker NI: Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Mol Cell Biochem* 178: 9-25, 1998.
39. Nakamura T, Sakamoto K: Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochem Biophys Res Comm* 284(1): 203-210, 2001.
40. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad Biol Med* 22: 269-285, 1997.
41. Hensley K, Robinson KA, Gabbita P, Salsman S, Floyd RA: Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Rad Biol Med* 28(10): 1456-1462, 2000.
42. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ: Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29(2): 345-350, 2001.
43. Schreck R, Albermann K, Baeuerle P: Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Rad Res Comm* 17: 221-237, 1992.
44. Carmody RJ, Cotter TG: Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Report* 6(2): 77-90, 2001.
45. Basu S, Whiteman M, Matthey DL, Halliwell B: Raised levels of F2-isoprostanes and prostaglandin F2alpha in different rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 60: 627-631, 2001.
46. Milam SB, Schmitz JP: Molecular biology of temporomandibular joint disorders: proposed mechanisms of disease. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 1448-1454, 1995.
47. Haskin CL, Milam SB, Cameron IL: Pathogenesis of degenerative joint disease in the human temporomandibular joint. *Crit Rev Oral Biol Med* 6(3): 248-277, 1995.
48. Mapp PI, Grootveld MC, Blake DR: Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 51(2): 419-436, 1995.
49. Blake DR, Winyard PG, Marok R: The contribution of hypoxia-reperfusion injury to inflammatory synovitis. *Ann NY Acad Sci* 723: 308-317, 1994.
50. Fairburn K, Stevens CR, Winyard PG, Kus M, Ward RJ, Cunningham J, Zaidi M, Blake DR: Oxidative stress and its control. A pathogenetic role in inflammatory joint disease. *Biochem Soc Trans* 371-375, 1993.
51. Bauerova K, Bezek S: Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* 18: 15-20, 1999.
52. Brisson BA, Miller CW, Chen G, McCutcheon LJ, Janzen EG: Detection of free radicals in ischemic and reperfused canine gracilis muscle flaps by use of spin-trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Am J Vet Res* 62(3): 384-388, 2001.
53. Zardeneta G, Milam SB, Schmitz JP: Iron-dependent generation of free radicals: plausible mechanisms in the progressive deterioration of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 302-308, 2000.
54. Hooiveld MJ, Roosendaal G, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW: Joint bleeding increases oxidative stress in articular cartilage and causes chondrocyte apoptosis. 47th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, 2001, p. 0455.
55. Kawai Y, Kubota E, Okabe E: Reactive oxygen species participation in experimentally induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. *J Dent Res* 79(7): 1489-1495, 2000.
56. Odeh M: New insights into the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 83(2): 103-116, 1997.
57. Moore AR, Iwamura H, Larbre JP, Scott DL, Willoughby DA: Cartilage degradation by polymorphonuclear leucocytes: in vitro assessment of the pathogenic mechanisms. *Ann Rheum Dis* 52: 27-31, 1993.
58. Davies JMS, Horwitz DA, Davies KJA: Potential roles of hypochlorous acid and N-chloroamines in collagen breakdown by phagocyte cells in synovitis. *Free Radic Biol Med* 15: 637-643, 1993.
59. Derevianko A, Graeber T, D'Amico R, Simms HH: The role of neutrophil-derived oxidants as second messengers in interleukin-1beta stimulated cells. *Shock* 10: 54-61, 1998.
60. Henrotin Y, Deby-Dupont G, Deby C, De Bruyn M, Lamy M, Franchimont P: Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. *Br J Rheum* 32: 562-567, 1993.
61. Hiran TS, Moulton PJ, Hancock JT: In situ detection of superoxide anions within porcine articular cartilage. *Br J Biomed Sci* 55: 199-203, 1998.
62. Tiku ML, Yan YP, Chen KY: Hydroxyl radical formation in chondrocytes and cartilage as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy using spin trapping reagents. *Free Rad Res* 29: 177-187, 1998.
63. Panasyuk AF, Frati E, Ribault D: Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans. *Free Rad Biol Med* 16: 157-167, 1994.
64. Rathakrishnan C, Tiku K, Raghavan A, Tiku ML: Release of oxygen radicals by articular chondrocytes: a study of luminol-dependent chemiluminescence and hydrogen peroxide secretion. *J Bone Miner Res* 7(10): 1139-1148, 1992.
65. Tiku ML, Liesch JB, Robertson FM: Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *J Immunol* 145(2): 690-696, 1990.
66. Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K: Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Sem Arthr Rheum* 27: 392-399, 1998.
67. Anderson KM, Seed T, Ou D, Harris JE: Free radicals and reactive oxygen species in programmed cell death. *Med Hypotheses* 52(5): 451-463, 1999.
68. Hickey EJ, Rajee RR, Reid VE, Gross SM, Ray SD: Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Rad Biol Med* 31(2): 139-152, 2001.
69. Vincent F, Corral M, Defer N, Adolphe M: Effects of oxygen free radicals on articular chondrocytes in culture: C-myc and C-HA-ras messenger RNAs and proliferation kinetics. *Exp Cell Res* 192: 333-339, 1991.
70. Fragonas E, Pollesello P, Mlinarik V, Toffanin R, Grando C, Godeas C, Vittur F: Sensitivity of chondrocytes of growing cartilage to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1425: 103-111, 1998.
71. Asada S, Fukuda K, Nishisaka F, Matsukawa M, Hamanishi C: Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes: involvement of calcium

- ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res* 50(1): 19-23, 2001.
72. Blanco FJ, Guitian R, Vasquez-Martul E, de Toro F, Galdo F: Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthr Rheum* 41: 284-289, 1998.
  73. Burkhardt H, Schwingel M, Menninger H, Macartney HW, Tschesche H: Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. *Arthr Rheum* 29(3): 379-387, 1986.
  74. Tiku ML, Gupta S, Deshmukh DR: Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Rad Res* 30: 395-405, 1999.
  75. Tiku ML, Shah R, Allison GT: Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. *J Biol Chem* 275(26): 20069-20076, 2000.
  76. Kvam BJ, Fragonas E, Degrossi A, Kvam C, Matulova M, Pollesello P, Zanetti F, Vittur F: Oxygen-derived free radical (ODRF) action on hyaluronan (HA), on two HA ester derivatives, and on the metabolism of articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 218: 79-86, 1995.
  77. Baker MS, Feigan J, Lowther DA: The mechanism of chondrocyte hydrogen peroxide damage. Depletion of intracellular ATP due to suppression of glycolysis caused by oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Rheumatol* 16: 7-14, 1989.
  78. Moseley R, Waddington R, Evans P, Halliwell B, Embery G: The chemical modification of glycosaminoglycan structure by oxygen-derived species in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1244: 245-252, 1995.
  79. Dean DD: Proteinase-mediated cartilage degradation in osteoarthritis. *Sem Arthr Rheum* 20(6, Suppl. 2): 2-11, 1991.
  80. Cawston T: Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today* 4: 130-137, 1998.
  81. Ehrlich W, Huser H, Kroger H: Induction and activation of procollagenase in rabbit synovial fibroblasts after treatment with active oxygen released by xanthine/xanthine oxidase. *Rheumatol Int* 15: 131-136, 1995.
  82. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H: Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem* 276(31): 29596-29602, 2001.
  83. Shabani F, McNeil J, Tippett L: The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HO-CL) is suppressed by anti-rheumatic drugs. *Free Rad Res* 28: 115-123, 1998.
  84. Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J: Amplification of IL-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF- $\kappa$ B and Activating Protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* 165: 5788-5797, 2000.
  85. Bertelli A: Resveratrolo e quercetina: polifenoli ad attività antinfiammatoria ed antiossidante. *Veterinaria, Suppl.* (Aprile), 16: 27-37, 2002.
  86. Lo YY, Cruz TF: Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 270(20): 11727-11730, 1995.
  87. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
  88. Cannon GW, Openshaw SJ, Hibbs JB, Hodial JR, Huecksteadt TP, Griffiths MM: Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. *Arthr Rheum* 39: 1677-1684, 1996.
  89. Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans CH: Nitric oxide and arthritis. *Arthr Rheum* 36(8): 1036-1044, 1993.
  90. Murrell GAC, Dolan MM, Jang D, Szabo C, Warren RF, Hannafin JA: Nitric oxide: an important articular free radical. *J Bone Joint Surg* 78-A: 265-274, 1996.
  91. Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K: Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 96: 2357-2363, 1996.
  92. Spreng D, Sigrist N, Jungi T, Busato A, Lang J, Pfister H, Schawalder P: Nitric oxide metabolite production in the cranial cruciate ligament, synovial membrane and articular cartilage of dogs with cranial cruciate ligament rupture. *Am J Vet Res* 61(5): 530-536, 2000.
  93. Simmons EJ, Bertone AL, Hardy J, Weisbrode SE: Nitric oxide synthase activity in healthy and interleukin-1 $\beta$ -exposed equine synovial membrane. *Am J Vet Res* 60(6): 714-716, 1999.
  94. Spreng D, Sigrist N, Schweighauser A, Busato A, Schawalder P: Endogenous nitric oxide production in canine osteoarthritis: detection in urine, serum and synovial fluid specimens. *Vet Surg* 30(2): 191-199, 2001.
  95. Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J: Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheum* 26: 2002-2014, 1999.
  96. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzi RM, Uguccioni M, Facchini A: Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthr Rheum* 41: 2165-2174, 1998.
  97. Jang D, Murrell AC: Nitric oxide in arthritis. *Free Rad Biol Med* 24(9): 1511-1519, 1998.
  98. Howe LM, Boothe HW: Nitric oxide: a review for veterinary surgeons. *Vet Surg* 30: 44-57, 2001.
  99. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 146(1): 75-85, 1995.
  100. Conrozier Th: La mort des chondrocytes articulaires. Mécanisme et protection. *Presse Med* 36: 1859-1861, 1998.
  101. Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J: Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol* 28(11): 2509-2519, 2001.
  102. Nishida K, Doi T, Matsuo M, Ishiwari Y, Tsujigawa H, Toshida A, Shibahara M, Inoue H: Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis & Cartilage* 9: 232-237, 2001.
  103. Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, Seegmiller JE, Terkeltaub R, Lotz M: Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci* 95(6): 3094-3096, 1998.
  104. Amin AR, Abramson SB: The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 10: 263-268, 1998.
  105. Hickery MS, Bayliss MT: Interleukin-1 induced nitric oxide inhibits sulphation of glycosaminoglycan chains in human articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1425: 282-290, 1998.
  106. Murrell GAC, Jang D, Williams RJ: Nitric oxide activates metalloproteinase activity in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Comm* 206: 15-21, 1995.
  107. Lotz M: The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 25(2): 269-282, 1999.
  108. Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardiff G, Martel-Pelletier J: The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1 $\alpha$  synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritis cartilage degradation. *Arthr Rheum* 38(Suppl): S313, 1996.
  109. Bidri M, Feger F, Varadaradjalou S, ben Hamouda N, Guillosson JJ, Arock M: Mast cells as a source and target for nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 1(8): 1543-1558, 2001.
  110. Needleman P, Manning PT: Interactions between the inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) pathways: implications for therapeutic intervention in osteoarthritis. *Osteoarthritis & Cartilage* 7: 367-370, 1999.
  111. Moulton PJ: Inflammatory joint disease: the role of cytokines, cyclooxygenases and reactive oxygen species. *British J Biomed Sci* 53: 317-324, 1996.
  112. Fairburn K, Stevens CR, Winyard PG, Kus M, Ward RJ, Cunningham J, Zaidi M, Blake DR: Oxidative stress and its control: a pathogenetic role in inflammatory joint disease. *Biochem Soc Trans* 371-375, 1993.
  113. Tak PP, Firestein GS: NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7-11, 2001.
  114. Schett G, Tohidast-Akrad M, Steiner G, Smolen J: The stressed synovium. *Arthr Res* 3: 80-86, 2001.
  115. Kohler HBK, Knop J, Martin M, de Bruin A, Huchzermeyer B, Lehmann H, Kietzmann M, Meier B, Nolte I: Involvement of reactive oxygen species in TNF- $\alpha$  mediated activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B in canine dermal fibroblasts. *Vet Immunol Immunopathol* 71: 125-142, 1999.
  116. Kohler HBK, Huchzermeyer B, Martin M, De Bruin A, Meier B, Nolte I: TNF- $\alpha$  dependent NF- $\kappa$ B activation in cultured canine keratinocytes is partly mediated by reactive oxygen species. *Vet Derm* 12: 129-137, 2001.
  117. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB: Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95: 1669-1675, 1995.
  118. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM: New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 45: 7-17, 1999.
  119. Warren MC, Bump EA, Medeiros D, Braunhut SJ: Oxidative stress-induced apoptosis of endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 29(6): 537-547, 2000.
  120. Woolf CJ, Doubell TP: The pathophysiology of chronic pain. Increased sensitivity to low threshold A-fibre inputs. *Curr Biol* 4: 525-534, 1994.
  121. Schumacher HR: Ultrastructure of the synovial membrane. *Ann Clin Lab Sci* 5(6): 489-498, 1975.
  122. Heppelmann B, Messlinger K, Neiss WF, Schmidt RF: Fine sensory innervation of the knee joint capsule by group III and group IV nerve fibers in the cat. *J Comp Neurol* 351(3): 415-428, 1995.

123. Dean G, Hoyland JA, Denton J, Donn RP, Freemont AJ: Mast cells in the synovium and synovial fluid in osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 32(8): 671-675, 1993.
124. Arnason JA, Malone DG: Role of mast cells in arthritis. *Chem Immunol* 62: 204-238, 1995.
125. Marone G: Mast cells in rheumatic disorders. *Clin Exp Rheum* 16: 245-249, 1998.
126. Tetlow LC, Woolley DE: Distribution, activation and tryptase/chymase phenotype of mast cells in the rheumatoid lesion. *Ann Rheum Dis* 54: 549-555, 1995.
127. Bromley M, Fisher WD, Woolley DE: Mast cells at sites of cartilage erosion in the rheumatoid joint. *Ann Rheum Dis* 43: 76-79, 1984.
128. Renoux M, Hilliquin P, Galoppin L, Florentin J, Menkes CJ: Cellular activation products in osteoarthritis synovial fluid. *Int J Clin Pharm Res* XV(4): 135-138, 1995.
129. Woolley DE, Tetlow LC: Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. *Arthritis Res* 2(1): 65-74, 2000.
130. Brooks AC, Whelan CJ, Purcell WM: Reactive oxygen species generation and histamine release by activated mast cells: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Br J Pharmacol* 128: 585-590, 1999.
131. Wolfreys K, Oliveira DBG: Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *Eur J Immunol* 27: 297-306, 1997.
132. Yoffe JR, Taylor DJ, Woolley DE: Mast cell products stimulate collagenase and prostaglandin E production by cultures of adherent rheumatoid synovial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 122(1): 270-276, 1984.
133. Gruber BL, Schwartz LB, Ramamurthy NS, Irani AM, Marchese MJ: Activation of latent rheumatoid synovial collagenase by human mast cell tryptase. *J Immunol* 140: 3936-3942, 1988.
134. Lees M, Taylor DJ, Woolley DE: Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. *Eur J Biochem* 223: 171-177, 1994.
135. Frank BT, Rossall JC, Caughey GH, Fang KC: Mast cell tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by alpha-chymase. *J Immunol* 166(4): 2783-2792, 2001.
136. Kanbe N, Tanaka A, Kanbe M, Itakura A, Kurosawa M, Matsuda H: Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol* 29: 2645-2649, 1999.
137. Creamer P: Osteoarthritis pain and its treatment. *Curr Opin Rheumatol* 12: 450-455, 2000.
138. Kyles AE, Ruslander D: Chronic pain: osteoarthritis and cancer. *Sem Vet Med Surg* 12(2): 122-132, 1997.
139. Dray A: Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 75: 125-131, 1995.
140. Herbert MK, Schmidt RF: Activation of normal and inflamed fine articular afferent units by serotonin. *Pain* 50: 79-88, 1992.
141. Carlton SM, Coggeshall RE: Nociceptive integration: does it have a peripheral component? *Pain Forum* 7: 71-78, 1998.
142. Dray A: Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Pharmacol* 75: 704-712, 1997.
143. Lamont LA, Tranquilli WJ, Grimm KA: Physiology of pain. *Vet Clin North Am* 30(4): 703-728, 2000.
144. Levine JD, Moskowitz MA, Basbaum AI: Meccanismi neuroimmunologici nell'artrite. *Progr Neuroimmunol* 1(2): 16-19, 1988.
145. Fortier LA, Nixon AJ: Distributional changes in substance P nociceptive fiber patterns in naturally osteoarthritic articulations. *J Rheumatol* 24: 524-530, 1997.
146. Tanabe T, Otani H, Mishima K, Ogawa R, Inagaki C: Mechanisms of oxyradical production in substance P stimulated synovial cells. *Rheumatol Int* 16: 159-167, 1996.
147. Hukkanen M, Gronblad M, Rees R, Kottinen YT, Gibson SJ, Hietanen J, Polak JM, Brewerton DA: Regional distribution of mast cells and peptide containing nerves in normal and adjuvant arthritic rat synovium. *J Rheumatol* 18(2): 177-183, 1991.
148. Iwasaki A, Inoue K, Hukuda S: Distribution of neuropeptide-containing nerve fibers in the synovium and adjacent bone of the rat knee joint. *Clin Exp Rheumatol* 13(2): 173-178, 1995.
149. Lewis DD, Church DF, Hosgood G, van Ee RT: Investigation of oxygen-derived free radical generation in cancellous bone specimens obtained from dogs. *Am J Vet Res* 55(11): 1608-1612, 1994.
150. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC: Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85: 632-639, 1990.
151. Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, Bang BG, Kim HR: Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol* 49: 897-902, 1997.
152. Van'tHof RJ, Ralston SH: Nitric oxide and bone. *Immunology* 103(3): 255-261, 2001.
153. Ralston SH, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS: Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology* 135: 330-336, 1994.
154. Lowik CWGM, Nibbering PH, van de Ruit M, Papapoulos SE: Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J Clin Invest* 93: 1465-1472, 1994.