VISSAGRAN

Laboratorio
FUNDACION
CIENCIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

ACERCAMIENTO FUNCIONAL

El mantenimiento de la actividad articular se halla indefectiblemente unido al uso de la misma: una fractura con impedimento de la movilidad prolongados generan un importante período de reactivación que se acrecienta con la edad. Esto se debe a que el movimiento ocasiona un constante recambio del líquido sinovial (LS) y de la matriz extracelular del cartílago articular (MEC).

1. DESCRIPCIÓN DE AMBAS ESTRUCTURAS

Líquido sinovial:

Su producción constante se da a partir de los sinoviocitos de la cápsula articular. Ejecuta varias funciones vitales para el resguardo articular:

a) Acción de nutrición y limpieza de la MEC. El cartílago articular es un tejido avascular que se encuentra en constante recambio y requiere ser nutrido y poder limpiar el detritus que produce. Esta función es ejercida en la parte más activa por el líquido sinovial y en el lado óseo es llevada a cabo por el hueso subcondral.

b) Lubricante de borde que impide el pellizcamiento de la cápsula articular provocado al flexionarse la articulación.

c) Mantenimiento de la luz articular, lo que evita en grandes presiones el impacto entre las carillas articulares.

El LS es rico en ácido hialurónico (AH) cuya propiedad de visco - elasticidad, basada principalmente en su concentración, polimerización y magnitud de su peso molecular, da las condiciones al líquido para ejercer dichos efectos (Gibbs D, et al., 1968; Hamerman D, et al., 1966).

d) Lubricante límite ejercido en conjunto con una delgada capa amorfa de un complejo proteico superficial del cartílago articular.

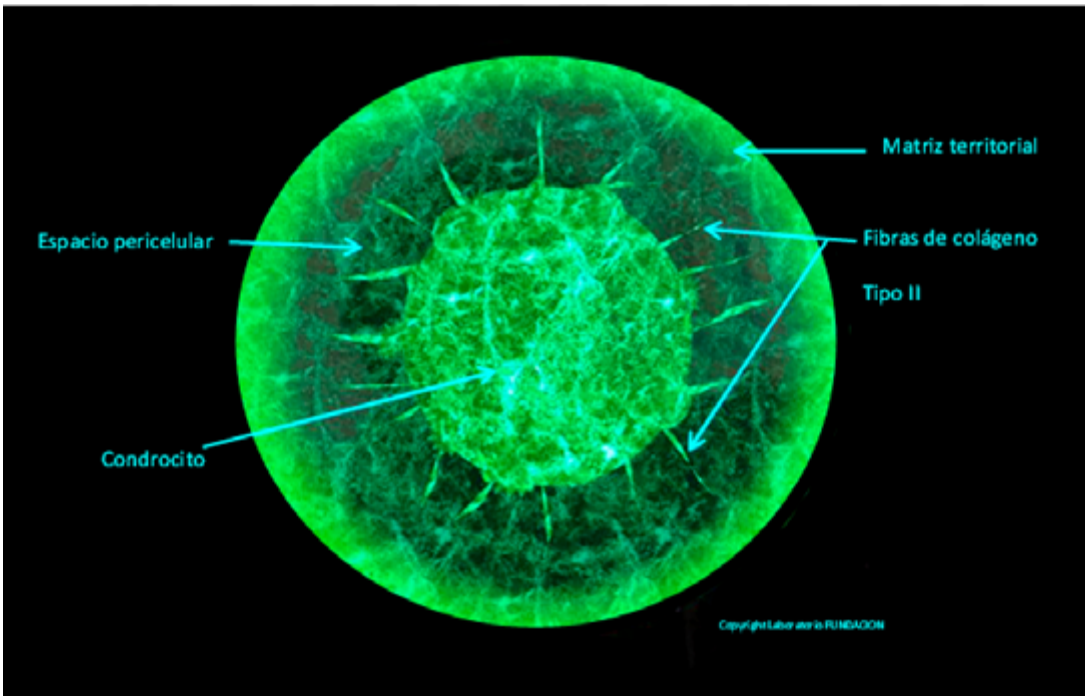
Esta asociación es la integración lubricina-AH. La misma tendría una función básica de los "lubricantes límite", que otorgan baja fricción y protegen las superficies del desgaste (Hui AY, et al., 2011).
Como se demostró experimentalmente en ratas, en el desgaste por cizallamiento ambos deben estar presentes, ya que solo el AH no cumple con dicha función (Teeple E, et al., 2011).
El enlace físico entre AH y lubricina es relativamente débil, se puede disociar bajo fuerzas normales de fricción y de cizallamiento. La compresión provoca la difusión del AH nominalmente libre a físicamente atrapado en la interface por la red de poros de colágeno cada vez más estrecha. El complejo de AH-lubricina atrapado mecánicamente actúa entonces como un lubricante eficaz químicamente unido, reduciendo ligeramente la fuerza de fricción; pero, lo que es más importante, eliminando el daño de desgaste a las superficies del cartílago (Greene, GW. et al., 2011).
Estudios en seres humanos y animales han determinado que el peso molecular del AH le confiere propiedades de visco - elasticidad que dependen de la concentración y del grado de polimerización dentro del fluido articular (Gibbs DA, et al.; 1968; Hamerman D, et al.; 1966).
El AH en el líquido sinovial varía entre 2-6 millones δ.
La concentración de líquido sinovial AH varían entre las especies y entre las articulaciones de un individuo (Balazs EA, 1967; Balazs EA, 1986; Auer JA, 1980).
Los valores de referencia del líquido sinovial equino normal varía en el rango de 0,33 a 1,5 mg / ml, dependiendo del investigador y de la técnica empleada.

Cartílago articular:

Condrocito

Es la unidad celular del cartílago. Si bien representa un bajo porcentaje del tejido, es metabólicamente muy activo en forma individual.
Se halla suspendido en un espacio pericelular adherido a sus paredes (matriz territorial) por fibras de colágeno transmisoras de modificaciones físicas (mecánicas y eléctricas), además de influencias químicas que le llegan del medio. Esta información le permite mantener la MEC equilibrada en constante reemplazo (síntesis y degradación).
Se nutre por el líquido sinovial y el hueso subcondral.
Trabaja en estado casi de anaerobiosis.

Ver representación en la siguiente página.

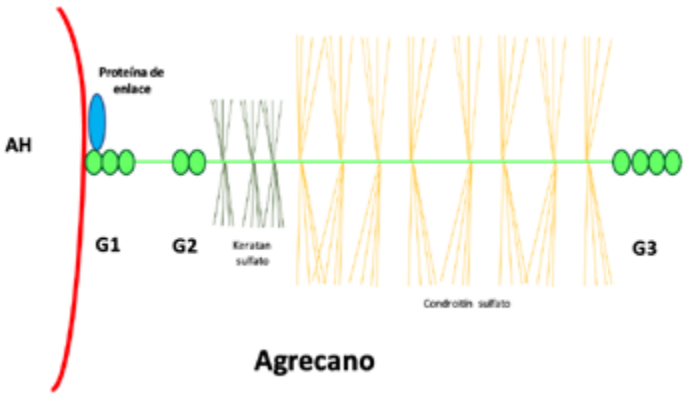


Matriz extracelular (MEC)

Esta conforma el espacio entre los condrocitos, y es variable en su composición en varios aspectos: la cercanía a las células, la profundidad, la articulación, la edad, entre otros. Los dos elementos más abundantes en su composición, y de los que depende su función, son el agua y los grupos macromoleculares que la contienen. Dos de estos componentes destacan en

1) Las fibras de colágeno forman el esqueleto de la matriz uniendo el condrocito con la misma, como se vio anteriormente.
2) Los proteoglicanos, que están conformados por la molécula de agrecano, la proteína de unión y una cadena de AH. Ensamblados fuera del condrocito, los complejos se intercalan con las fibras de colágeno (Wight T., 1987). Aportan a la matriz intensas cargas negativas que arrastran cationes del LS (principalmente Na) atrayendo el agua. Este gel hidratado y viscoso proporciona las propiedades osmóticas requeridas para la resistencia a la compresión (resiliencia[1]) que caracteriza al tejido (Kisiday, J. et al., 2002).

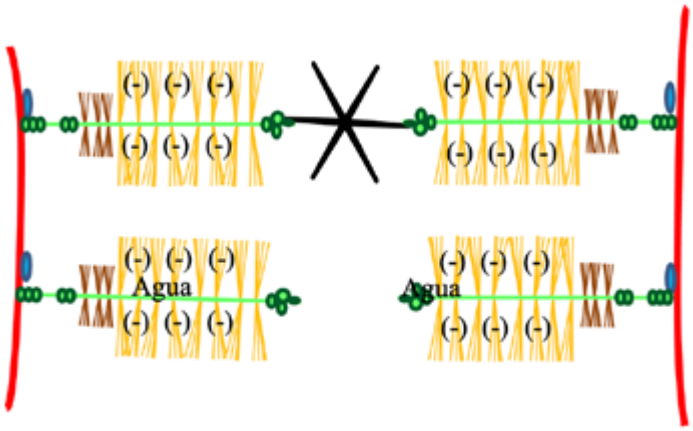
Figura 01



En la Figura 01, el AH se muestra en rojo (una línea roja única que forma la base). Los componentes del agrecano son: en verde, la proteína central con sus tres dominios (G1, G2 y G3), las cadenas de glicosaminoglicano en marrones a lo largo de la proteína central (entre G2 y G3). La proteína de enlace se ve azul. El agrecano se une al AH a través de su dominio G1 N-terminal en complejo ternario con la proteína de enlace (Inspirado en Aspberg A., 2012).

1. **Resilencia:** Se trata de la capacidad de recuperación de un cuerpo deformado, cuando cesa la fuerza que causa la deformación.

Figura 02

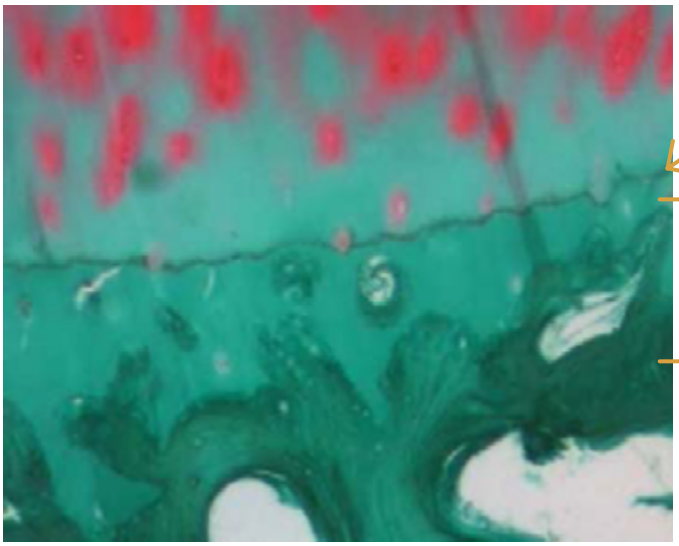


En la Figura 02: organización mediada por dominios G3 del agregado de la matriz extracelular. El modelo describe cómo la interacción con una proteína (la tenascina en negro), a través de los dominios G3, puede reticular los agregados de proteoglicanos y organizar la matriz extracelular. Las cargas (-) son las ejecutoras de la retención de cationes y agua (Inspirado en Aspberg A., 2012).

El peso molecular (tamaño) del AH en el cartílago disminuye con la edad, pero la cantidad aumenta. Esto también es percibido en los complejos de agregados de agrecano de la ME, aumentando del 1% en los neonatos al 10% en los animales adultos. Esto, posiblemente debido a la acumulación de residuos de agrecano (dominio G1) y proteínas de enlace (Holmes MW, et al., 1988).

Unión condro-ósea

En una breve descripción, esta zona de transición se conforma de:



TIDEMARK: línea basofílica que marca el frente de mineralización de la MEC.

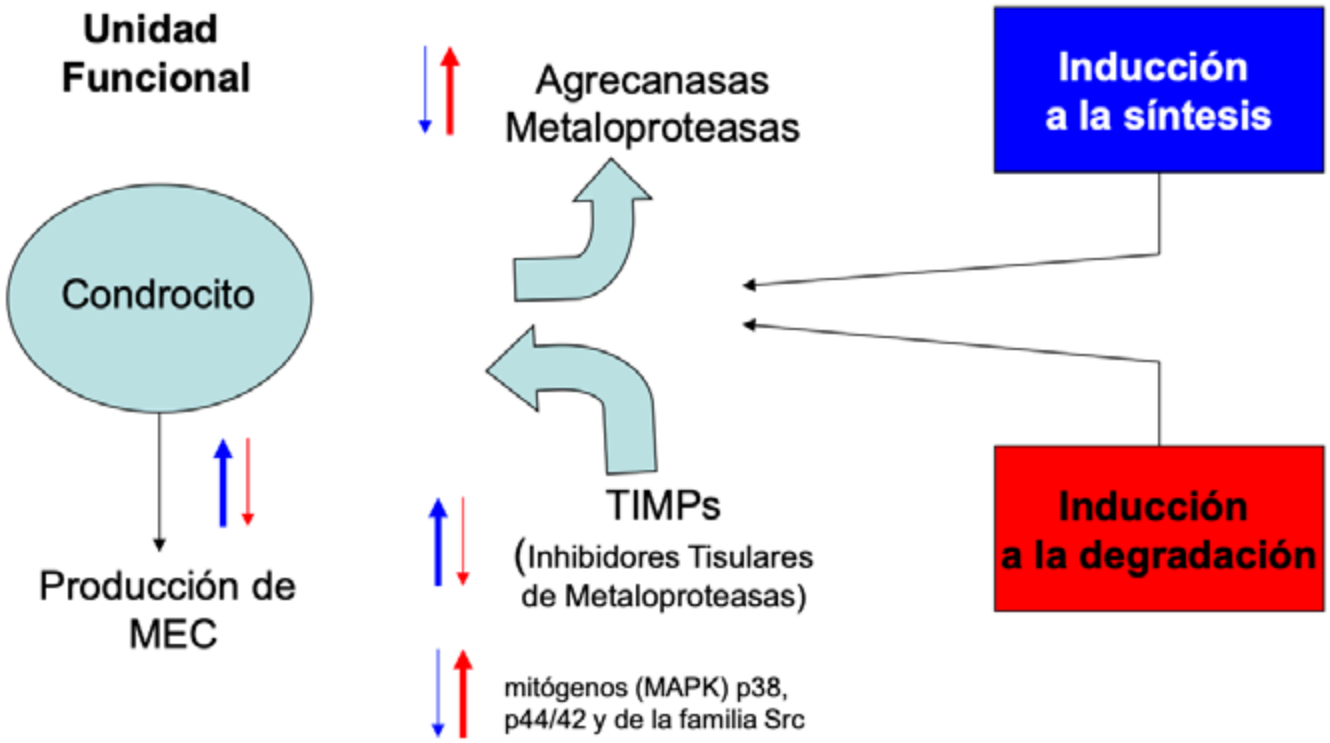
CAPA CALCIFICADA: son condrocitos en una MEC mineralizada. Su función es anclar el cartílago sinovial al hueso subcondral. Es 10 veces menos rígida que el hueso.

HUESO SUBCONDRAL: su función es absorber cargas mecánicas aplicadas a la articulación y suministrar al cartílago con nutrientes y oxígeno.

(Tomado de: Pesesse L et al. ; Osteochondral plate angiogenesis; Joint Bone Spine; 78 144–149; (2011))

1. FISIOLOGÍA DEL CONTINUO RECAMBIO DEL TEJIDO:

El equilibrio entre dos fuerzas, la síntesis (anabolismo) y la destrucción (catabolismo), se establece por la suma de información física y química que recibe el condrocito.



En este aspecto, factores como IGF-1 (factor parecido a la Insulina1), TGF-β (factor de crecimiento transformador) como muchos otros, estimulan la producción de MEC. Por otro lado, el VEGF (factor derivado del endotelio), Interleuquinas 1 (β; α), el TNF- α y otros, provocan los efectos contrarios. (Carlevaro MF et al., 2000; Troeberg L and Nagase H, 2012).

ACERCAMIENTO A LA COMPRENSIÓN DEL DESARROLLO DE LA OSTEOARTRITIS/OSTEOARTROSIS (OA)

En un taller auspiciado por la American Academy of Orthopaedic Surgeons, el Instituto Nacional de artritis y otras instituciones, se redefinió la OA (osteoartritis) como:

> **"Grupo de distintas enfermedades que pueden tener diversas etiologías, pero con resultados similares biológicos, morfológicos y clínicos".**

El proceso de la enfermedad no solo afecta el cartílago articular, sino también involucra a toda la articulación. Brandt KD et al. (2008) también consideran a la artrosis como el resultado de una disparidad entre la carga o tensión aplicada al cartílago articular y la capacidad del cartílago para soportar dicha carga. Esto puede deberse a:

- **Un aumento de la carga.**
- **Debilitamiento del cartílago.**
- **Hueso subcondral defectuoso**

Cabe mencionar, lo aplicable de esta visión al aspecto de los animales deportivos. Los mismos autores mencionan que la molestia fundamental durante el proceso de artrosis es el dolor y la restricción de los movimientos debido al dolor, considerando un origen aparente en la neo - inervación acompañante de la neo vascularización del hueso subcondral.

Desde un punto de vista bioquímico-celular, los procesos llevarían a un desacuerdo funcional entre la síntesis y la degradación. En el desarrollo del proceso se generan clones condrocíticos que, a medida que la información recibida —vía físico – química— mantiene el desacuerdo (originado en procesos físicos por ejemplo, aplomos deficientes, traumas no recuperados con nueva exigencia articular, excesivo estrés articular o enfermedades específicas) van transformándose.

Así tenemos:

a. **Etapa de síntesis:** donde, en forma temprana, el condrocito trata (acompañado en parte por el sinoviocito) de producir más de lo necesario. El ejemplo es el aumento del líquido sinovial, pero de mayor fluidez por la disminución de AH en cantidad y calidad.
b.**Etapa fibroblástica:** donde se incrementa la producción de colágeno (en parte defectuoso).
c. **Etapa degradativa:** se produce exceso de metaloproteasas. Primero se expresan las que atacan principalmente al agrecano, para luego incrementarse las colagenasas, que agravan notoriamente la situación.

Un grupo de condrocitos ubicado a lo largo del Tidemark (ver unión condro-ósea) provoca la duplicación de la misma y acelera la calcificación de la MEC. La neo vascularización y neo inervación del hueso subcondral y de la membrana sinovial son complicaciones tempranas consideradas base causal del dolor (Brandt, KD et al., 2008). En resumen, el cambio funcional de los condrocitos del programa de síntesis y el fenotipo anti-angiogénesis hacia el programa catabólico y fenotipo pro-angiogénesis es característico de la patología osteoartrósica y del envejecimiento de los condrocitos (Gerber HP et al., 1999; Harper J and Kalgsbrun M., 1999; Thomas M H., 1999; Zhang E et, 2013). Los factores de estrés articular y la edad también repercuten con cambios en la membrana sinovial (Sagiroglu A O, 2012).

IDEA TERAPÉUTICA

En un cuestionario administrado a profesionales de la salud especialistas en rodilla, se pudieron establecer, sobre la base de las evidencias obtenidas, tres premisas que debe cubrir un fármaco intraarticular para osteoartrosis:

- **Aumento de la función lubricante.**
- **Freno inflamatorio.**
- **Recuperación del daño.**

La analgesia, por su parte, debe obtenerse en forma duradera cumpliendo con estos tres objetivos.

DESCRIPCIÓN

VISSAGRAN es una solución acuosa de hialuronato sódico altamente purificado. Su peso molecular es de 2.4 m δ. En el mismo, se encuentra integrado el estanozolol micronizado (principio activo del ESTROMBOL®). Cada mililitro contiene: estanozolol micronizado 5 mg; Hialuronato sódico 5 mg; excipientes y agua para Inyección q.s. 1 ml.

CONCEPTO FARMACOLÓGICO

Integrar el principio activo estanozolol a una matriz natural de los componentes sinoviales; para ello se elige el ácido hialurónico. El primero cumple con las tres premisas, mientras que el ácido hialurónico se prepara para que cumpla con los siguientes puntos:

a) Ser un vehículo que internaliza al polvo amorfo que, si bien es micronizado, amortiguaría cualquier impacto erosivo hasta la absorción del activo en la articulación.

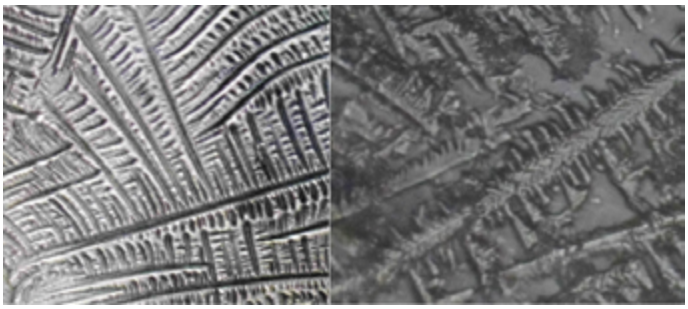


Imagen del Hialuronato antes (a) y despues (b) de la internalización del principio activo (Vista 40x)

b) Mejorar en forma inmediata las funciones reológicas del líquido sinovial, hasta que se restaure la actividad normal del sinoviocito.
c) Desempeñar cierta acción antiinflamatoria.

En relación al cumplimiento de las tres premisas por parte de los principios activos, la bibliografía menciona: el Hialuronato de sodio ha sido clasificado como un SYSADOA (symptomatic slow acting drugs for treatment of osteoarthritis) por organismos internacionales especializados como el OARSI (Osteoarthritis Research Society International), la ACR (American College of Rheumatology) y la ILAR (International League of Associations for Rheumatology).
Las soluciones visco - elásticas de AH tienen como objetivo la recuperación de las propiedades reológicas (elasticidad y viscosidad) del líquido sinovial alterado, restableciendo la homeostasis en la articulación artrósica, aliviando el dolor y proporcionando una mayor movilidad a la articulación.
El AH tiene actividades bioquímicas que son distintas de sus propiedades físicas. Es un potente inhibidor de la actividad leucocitaria, e impide la formación de exceso de tejido fibroso.
Los efectos antiinflamatorios del AH se han demostrado en una serie de estudios in vitro e incluyen inhibición de la quimiotaxis de granulocitos, macrófagos y migración de linfocitos, así como la reducción de la fagocitosis por granulocitos y macrófagos (Ghosh P 1993; Balazs EA et al.;1973; Brandt KD,.1974; Forrester JB et al., 1980; Partsch G et al., 1989).
Se ha demostrado un efecto reducido en la interacción de enzimas, antígenos o citoquinas con las células diana (Forrester JV et al., 1981; Ogston AG et al., 1961).
El AH inhibió la degradación mediada por neutrófilos; y se ha demostrado que es eficaz para reducir la producción de prostaglandina E2 por los condrocitos de conejo estimulados con interleucina-1 (Tamoto K et al., 1993; Akatsuka M et al., 1993).
En un ensayo clínico controlado, el tratamiento con AH redujo los niveles de PGE2 y de AMP cíclico del fluido sinovial. Estos estudios sugieren que las propiedades antiinflamatorias de AH pueden atribuirse en parte a su capacidad para reducir la producción de mediadores inflamatorios solubles (Punzi L et al.; 1989).
El estanozolol muestra un efecto antiinflamatorio, inhibiendo la producción de mediadores pro-inflamatorios en condrocitos normales y tratados con IL-1β (Tung JT et al.; 2002).
Se demostró también en condrocitos cultivados, una expresión significativamente reducida de los genes catabólicos (ARNm) MMP-13, MMP-1, IL-6, y COX-2 tanto con o sin presencia de un inductor (interleuquina IL-1β) en comparación con los controles (Richadson CW and Dodge GR; 2000).

Un estudio actual demuestra que el estanozolol tiene efectos condroprotectores a través de la regulación a la baja de genes para citoquinas pro-inflamatorias; enzimas catabólicas y enzimas asociadas a la OA (Martins MC et al.; 2018).
El estanozolol reduce la apoptosis en condrocitos equinos in vitro al reducir la producción de óxido nitroso y estimular la producción de IGF-1 (Saleri et al., 2004). Ello concuerda con las evidencias vistas sobre músculo.
El estanozolol protege contra el estrés oxidativo agudo inducido por el ejercicio al reducir la producción de especies oxígeno reactivas mitocondrial (EROs), en asociación con una preservación de las propiedades de la membrana mitocondrial. En conclusión, el efecto protector del estanozolol no se debió a un aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes mitocondriales, sino más bien a una disminución de la generación de EROs mitocondrial (Saborido,A et al.,2011; Saleri et al., 2004).
Sobre el hueso, induce un aumento significativo de la actividad osteoblástica, de la producción de la matriz osteoide y de los factores de crecimiento óseo (Colvard DS, et al; 1989; Ghiacci G et al., 2017; Kasperk CH, 1989; Kasperk C, et al.;1990; Orwoll ES, et al.; 1991).
Se ha demostrado que el estanozolol induce la regulación al alza de la proliferación de osteoblastos (Ghiacci G et al., 2019), la síntesis de colágeno y la secreción de condrocitos a través de la actividad transformadora del factor de crecimiento-β1 (TGF- β1). Estos efectos estimulantes del estanozolol parecen ser específicos ya que la testosterona provoca un efecto negativo (Falanga V et al.; 1998).

Tomando una técnica mundialmente aceptada para la investigación experimental de OA (Oakley et al. (2004), se ha demostrado el efecto intra-articular del estanozolol en reducir la formación de osteofitos y la reacción del hueso subcondral y promover la regeneración del cartílago articular (Spadari et al.; 2013).
La densidad mineral del hueso y las propiedades biomecánicas son fuertemente afectadas por el efecto de osteoporosis inducida por los glucocorticoides.

En un ensayo donde se tratan ratas con acetato de prednisona crónicamente, inducen a una disminución en la densidad del hueso del orden del 20% ($P<0.01$ a $P<0.05$), y las propiedades biomecánicas se ven afectadas en un 17.1% ($P<0.05$). Esto es evaluado por densitometría en ambos fémures y en la quinta vértebra lumbar. El tratamiento con estanozolol revierte este cuadro, superando en más del 70% ($P<0.05$) la reversión del problema tanto de densidad como de parámetros biomecánicos (Liao et al., 2003).

En resumen, la integración de los dos componentes del **VISSAGRAN**® cumple con las tres premisas:

- **Aumento de la función lubricante.**
- **Freno inflamatorio.**
- **Recuperación del daño.**

En forma indirecta, provocando la analgesia requerida.

Laboratorio FUNDACION
CIENCIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

BIBLIOGRAFÍA

Akatsuka M**, Yamamoto** Y**, Tobetto** K, et al. In vitro effects of hyaluronan on prostaglandin E2 induction by interleukin-1 in rabbit articular chondrocytes; Agents Actions;38:122–125; (1993).

Aspberg A The Different Roles of Aggrecan Interaction Domains; J. Histochemistry and cytochemistry; 60(12): 987– 996; (2012).

Auer JA**, Fackelman** GF**, Gingerich** DA**, Fetter** AW. Effect of hyaluronic acid in naturally occurring and experimental osteoarthritis. **Am J Vet Res** 1980;41:568–574.

Balazs EA**, Darzynkiewiez** Z. The effect of hyaluronic acid on fibroblasts, mononuclear phagocytes and lymphocytes. In: Kulonen E, Pikkarainen JPKK, eds. Biology of fibroblasts. Pag 237.London: Academic Press, (1973).

Brandt KD. The effect of synovial fluid hyaluronate on the ingestion of monosodium urate crystals by leukocytes; Clin Chem Acta; 55:307–315; (1974).

Brandt KD, Dieppe P, Radin EL; Etiopathogenesis of osteoarthritis; Rheum Dis Clin N Am 34:531–559; (2008)

Carlevaro MF**, Cermelli** S**, Cancedda** R**, Cancedda** FD- Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation; 113, 59-69, J Cell Sci; (2000).

Castro Martins M, **Peffers** M.J , **Lee** K and **Rubio Martinez** LM. Effects of stanozolol on normal and IL-1ß-stimulated equine chondrocytes in vitro; BMC Veterinary Research; 14:103 (2018).

Chopra R, **Anastassaiades** T. Specificity and synergism of poplypeptide growth factors in stimulating the synthesis of proteoglycanas and an novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures; J Reumatol; 25:1578-84; (1998).

Clarck JM, Coutts The structure of vascular channels in the subchondral plate; J. Anat.; 17:105-115; (1990).

Colvard DS, **Eriksen** EF, **Keeting** PE, et al.; Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells; Proc Natl Acad Sci; 86:854-857; (1989).

Coutts RD, **Sah** RL, **Amiel** D. Effects of growth factors on cartilage repair; Instr Course Lect;46:487-94; (1997).

Ellis AJ, **Wright** JK, **Cawston** TE, **Hazleman** BL.; The differential responses of human skin and synovial fibroblasts to stanozolol in vitro: production of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases; Agents Actions;35(3-4):232-7; (1992).

Falanga V, **Greenberg** AS, **Zhou** L, **Ochoa** SM, **Roberts** AB, **Falabella** A, et al. Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol; J Invest Dermatol; 111:1193–7; (1998).

Forrester JB, **Balazs** EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate; Immunol ; 40:435–446; (1990).

Forrester JV, **Wilkinson** PC. Inhibition of leukocyte locomotion by hyaluronic acid; J Cell Sci; 48:315–330; (1981).

Fraser JR, **Kimpton** WG, **Pierscionek** BK, **Cahill** RNP. The kinetics in normal and acutely inflamed synovial joints: Observations with experimental arthritis in sheep; Sem Arth Rheum ;22:9–17; (1993).

Gerber HP, **Vu** TH, **Ryan** AM, et al.; VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation; Nat Med; 5:623-8; (1999).

Ghiacci G, **Lumettis** S, **Manfredie** E, **Mori** D, **Macaluso** GM, **Sala** R; Stanozolol promotes osteogenic gene expression and apposition of bone mineral in vitro; J Appl Oral Sci;27:1 (2019).

Ghiacci G ,**Graiani** G, **Cacchioli** G ,**Galli** C, **Lumetti** S , **Ravanetti** S , **Elviri** L , **Manfredi** M , **Macaluso** GM and **Sala** R, Stanozolol-soaked grafts enhance new bone formation in rat calvarial critical-size defects; Biomed. Mater.; 12:1-14; (2017).

Ghosh P.; Osteoarthritis and hyaluronan—palliative or disease-modifying treatment?; Sem Arth Rheum; 22:1–3; (1993).

Greene GW, **Banquy** X, **Lee** DW, **Lowrey** DD, **Yu** J, **Israelachvili** JN. Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints; Proc Natl Acad Sci U S A; 108:5255; (2011).

Gibbs DA, **Merrill** EW, **Smith** KA. Rheology of hyaluronic acid; Biopolymers; 6:777–791; (1968).

Grecomoro G, **Martorana** U, **DiMarco** C.; Intra-articular treatment with sodium hyaluronate in gonarthrosis: A controlled clinical trial versus placebo; Pharmatherapeutica ;5:137–141; (1987).

Kisiday, J.; **Jin**, M.; **Kurz**, B.; **Hung**, H.H.; **Semino**, C **Zhang**, S; **Grodzinsky**, A.J; **Proc**. Nat. Acad. Sci. 99, 9996-10001; (2002),.

Kopesky PW, **Lee** H-Y, **Vanderploeg** EJ, **Kisiday** JD, **Frisbie** DD, et al. Adult equine bone marrow stromal cells produce a cartilage-like ECM mechanically superior to animal-matched adult chondrocytes. Matrix Biol.; 29:427–438; (2010).

Hamerman D, **Rojkind** M, **Sandson** J. Protein bound to hyaluronate: Chemical and immunological studies; Fed Am Soc Exp Biol ; 25:1040–1045; (1966).

Hakansson L, **Hallgren** R, **Benge** P.; Effect of hyaluronic acid on phagocytosis of opsonized latex particles; Scand J Immunol; 11:649–653; (1990).
Harper J, **Kalgsbrun** M.; Cartilage to bone — angiogenesis leads the way; Nat Med; 5:617-8; (1999).
Hilbert BJ, **Rowley** G, **Antonas** KN, et al.; Changes in the synovia after the intra-articular injection of sodium hyaluronate into normal horse joints and after arthrotomy and experimental cartilage damage; Aust Vet J; 62:182– 184; (1985).
Hill DJ, **Logan** A.; Peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis; Prog Growth Factor Res; 4:45-68 (1992).
Holmes MWA, **Bayliss** MT; **Muir** H, Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size; Biochem. J.; 250 (2):435–441; (1988).
Hui AY, **McCarty** WJ, **Masuda** K, **Firestein** GS, **Sah** RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury,and disease; Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med; (2011).
Kasperk CH, **Wergedal** JE, **Farley** JR, et al.; Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. Endocrinology; 124:1576-1578; (1989).
Kasperk C, **Fitzsimmons** R, **Strong** D.; Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells; J Clin Endocrinol Metab; 71:1322-1329; (1990).
Keyszer GM, **Lee** AH, **Gay** S; Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis; Stem Cells; 12:75-86; (1994).
Laurent UBG, **Fraser** JRE, **Engstrom-Laurent** A, et al.; Catabolism of hyaluronan in the knee joint of the rabbit; Matrix; 12:130–136; (1992).
Liao J.M., **Wu** T., **Li** Q.N., **Hu** B., **Huang** L.F., **Li** Z.H., **Yuan** L., **Zhong** S.Z.;; Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao; Effects of stanozolol on bone mineral density and bone biomechanical properties of osteoporotic rats (abstr);Rev; 23:1117-1120; (2003).
Martins MC , **Peffers** MJ, **Lee** K and **Rubio-Martinez** RM; Effects of stanozolol on normal and IL-1β-stimulated equine chondrocytes in vitro; BMC Veterinary Research; 14:103; (2018).
Malemud CJ; The role of growth factors in cartilage metabolism; Reum Dis Clin North Am;19:569-80; (1993).
McKinney A.R; **Suann** C.J., **Dunstan** A.J., **Mulley** S.L., **Ridley** D.D.; **Stenhouse** A.M.; Detection of stanozolol and its metabolites in equine urine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry; J. Chromatography B. Technol Biomed Life Sci; 811:75-83; (2004).
Muck, W.M., **Henion** J.D.; High-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry: its use for the identification of stanozolol and its major metabolites in human and equine urine; Biomed. Environ. Mass Spectrom; 19:37; (1990).
Oakley, P., **Lassere**, M.N., **Portek**, I., **Ghosh**, P., **Kirkham**, B.W., **Murrel**, G.A., **Wulf**, S., **Appleyard**, R.C; Biomechanical, histologic and macroscopic assessment of articular cartilage in a sheep model of osteoarthritis; Osteoarthritis and Cartilage; 12, 667–679; (2004).
Ogston AG, **Sherman** TF. Effects of hyaluronic acid upon diffusion of solutes and flow of solvent. J Physiol; 156: 67–74; (1961).
Orwoll ES, **Stribrska** L; **Ramsey** EE, **Keenan** EJ; Androgen receptors in osteoblast-like cell lines; CalcifTissue Int.; 49:182-187; (1991).
Partsch G, **Schwarzer** C, **Neumuller** J, et al.; Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells for hyaluronic acid; (abstr); J Rheumatol; 48:123–128; (1989).
Persson L. On the synovial in horses: A clinical and experimental study. Acta Vet Scand 1971;35:29–43.
Pesesse L, **Sanchez** Ch, **Henrotin** Y; Osteochondral plate angiogenesis; Joint Bone Spine 78 144–149; (2011)
Punzi L, **Schiavon** F, **Cavasin** F, et al.; The influence of intra-articular hyaluronic acid on PGE2 and cAMP of synovial fluid; Clin Exp Rheumatol; 7:247–250; (1989).
Richardson DW, **Dodge** GR; Effects of interleukin-1β and tumor necrosis factor-α on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes; Am J Vet Res; 61:624–30; (2000).
Romagnoli N, **Zaghini** A, Fedrizzi G, Sala S, Babbini S, Barbarossa A; Disposition of Stanozolol in Plasma After Intra- articular Administration in the Horse; J Equine Vet Science; 47:16–19; (2016).
Saborido,A, **Naudí**,A, **Portero-Otín**,M, **Pamplona**,R, and **Megías**, A; Stanozolol treatment decreases the mitochondrial ROS generation and oxidative stress induced by acute exercise in rat skeletal muscle; J Appl Physiol 110:661–669; (2011).
Sagiroglu A O; Age-associated structural changes in synovial membranes of rabbits and dogs: a comparative review; J Anim. Vet. Advances; 11:4283-4287; (2012).

Sah RD, **Amiel** RL; Effects of growth factors on cartilage repair; Instr Course Lect; 46:487-94; (1997).
Saleri R, **Dondi** M, **Bianchi** E; Stanozolol inhibits nitric oxide production by horse chondrocyte cell culture; Bone; 34(suppl 1): 34–73; (2004).
Scarth, J., **Spencer**, H., **Hudson**, S., **Gray**, B., **Teale**, P. and **Hillyer**, L. The application ofin vitro technologies to study the metabolism of the androgenic/anabolic steroid stanozolol in the equine; Steroids 75, 57-69; (2010b).
Schänzer W., **Opferman** G., **Donike** M., Metabolism of stanozolol: identification and synthesis of urinary metabolites, J. Steroid Biochem.; 36:153–174, (1990).
Schänzer W.; Metabolism of anabolic androgenic steroids; Clinical Chemistry; 42:1001-1020; (1996)
Spadari A., **Romagnolia** R, **Predierib** PG, **Borghettic** P, **Cantonic** AM, **Corradic** A; Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis; Research in Veterinary Science; 94: 379–387; (2013).
Spadari A, **Rinnovati** R, **Babbini** S, **Romagnoli** N; Clinical Evaluation of Intra-articular Administration of Stanozolol to Manage Lameness Associated With Acute and Chronic Osteoarthritis in Horses; J. Equine Veterinary Science 35:105–110; (2015).
Tamoto K, **Tada** M, **Shimada** S, et al.; Effects of high molecular weight hyaluronates on the functions of guinea pig polymorphonuclear leukocytes; Sem Arth Rheum; 22:4–8; (1993).
Teeple E, **Elsaid** KA, **Jay** GD, **Zhang** L, **Badger** GJ, **Akelman** M, et al. Effects of supplemental intra-articular lubricin and hyaluronic acid on the progression of posttraumatic arthritis in the anterior cruciate ligament-deficient rat knee. Am J Sports Med; 39:164; (2011).
Thomas M Hering; Regulation of chondrocyte gene expression; Front Biosci; 4:743-61; (1999).
Treadway WJ, **Sederstrom** LP, **Turner** RA, et al.; The role of hyaluronic acid flux on modulation of neutrophil function; Arth Rheum; 24(Suppl):94; (1981).
Trippel SB; Growth factor actions on articular cartilage; J Rheumatol Suppl; 43:129-32; (1995).
Troeberg L, **Nagase** N; Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis; Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics; 1824:133–145; (2012)
Tung JT, **Fenton** JI, **Arnold** C, et al.; Recombinant equine interleukin-1ß induces putative mediators of articular cartilage degradation in equine chondrocytes; Can J Vet Res; 66:19–25; (2002).
Vaishnav R, **Beesford** JN, **Gallacher** JA, **Russell** RG; Effects of the anabolic steroid stanozolol on cells derived from human bone; Clinical Science; 74:455-460; (1988).
Wright JK, **Smith** AJ, **Cawston** TE, **Hazleman** BL; The effect of the anabolic steroid, stanozolol, on the production of procollagenase by human synovial and skin fibroblasts in vitro; Agents and Actions; 28:3; (1989).
Wight, T.; **Mecham**, R.; Biology of Proteoglycans (Biology of Extracellular Matrix); Academic, New York; (1987).
Zhang E, **Yan** X, **Zhang** M, **ChangX**, **Bai** Z, He , **Yuan** Z; Aggrecanases in the human synovial fluid at different stages of osteoarthritis Clinical Rheumatology; 32: 797-803; (2013).
Zhu SY, **Li** YH, **Ma** HM, **Pan** SN, **Chen** HS, **DU** ML; Stanozolol activates the cross-talk of estrogen receptor alpha-insulin-like growth factor-1 receptor-extracellular-signal regulated kinase 1/2 in the growth plate chondrocytes of estrogen-inhibited adolescent rats in vitro; Chinese J Pediatrics ;47(10):774-8, (2009).