

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CONCENTRACIÓN DE NITRITO COMO DERIVADO DEL
ÓXIDO NÍTRICO EN FLUIDO SINOVIAL DE LA
ARTICULACIÓN METACARPOFALÁNGICA EQUINA
NORMAL Y ALTERADA**

JUAN PABLO SOLÍS REYES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: HÉCTOR ADARMES A.

SANTIAGO, CHILE
2004

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CONCENTRACIÓN DE NITRITO COMO DERIVADO DEL
ÓXIDO NÍTRICO EN FLUIDO SINOVIAL DE LA
ARTICULACIÓN METACARPOFALÁNGICA EQUINA
NORMAL Y ALTERADA**

JUAN PABLO SOLÍS REYES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : HÉCTOR ADARMES A.
PROFESOR CONSEJERO : MARCO GALLEGUILLOS C.
PROFESOR CONSEJERO : ENRIQUE PINTO P.

SANTIAGO, CHILE
2004

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios por regalarme esta vida; a mi padre Hernán y mi madre Carmen por enseñarme a vivirla; a mis hermanas Violeta y Carmen Gloria por compartirla, y a mi esposa Paola por acompañarme y ser mi vida.

También agradezco al Doctor Carlos Sandoval por enseñarme su amor a los caballos, a mis profesores de esta “la Universidad de Chile” por enseñarme el bello arte de sanarlos, y por último vuelvo a agradecer a Dios por permitirme dedicar mi vida a ello.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a todos quienes participaron en el proceso de mi formación Médico Veterinaria y que aportaron de muchas formas para este fin. A mi familia por ser constante apoyo, a mi esposa por ser fuente de motivación, a mis compañeros por serlo, a todos aquellos veterinarios que me entregaron sus conocimientos y criterios en las infinitas horas de práctica voluntaria que realicé junto a ellos , a saber, los doctores Carlos Sandoval, Enrique Pinto, Adolfo Godoy, Alejandro Kaiser, Gonzalo Auvrard y Arnaldo Croxatto.

Especial aporte en esta última etapa universitaria han tenido mis queridos profesores Héctor Adarmes, Ema González y Marco Galleguillos mentores de esta Memoria y dueños de una infinita paciencia y dedicación.

RESUMEN

La osteoartritis es la enfermedad articular más común en la especie equina, que provoca dolor y disminución de la movilidad articular, cuya consecuencia es la disminución del desempeño deportivo. La osteoartritis se caracteriza por la destrucción del cartílago articular, que se manifiesta por úlceras focales y fragmentación.

El óxido nítrico (NO) participaría como un importante mediador biológico en la patología articular, que podría alterar la homeostasis del cartílago conduciendo a su destrucción. El NO es un radical libre, gaseoso, sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, por una familia de isoenzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS). Se ha descrito que el NO participaría en una amplia variedad de procesos biológicos, siendo oxidado en el medio biológico a nitrito y nitrato, los que se han utilizado como marcadores de su biosíntesis. En las articulaciones diartrodiales los condrocitos son la principal fuente de NO.

Para desarrollar el presente trabajo, se obtuvo líquido sinovial de 110 articulaciones metacarpofalángicas de equinos mestizos de matadero, cuya selección se realizó de acuerdo al aspecto macroscópico (normal o alterado) del cartílago articular y de la membrana sinovial, generándose cuatro grupos de articulaciones: NN = cartílago y membrana normales (n = 47); NA = cartílago normal y membrana alterada (n= 25); AN = cartílago alterado y membrana normal (n = 23); AA = cartílago y membrana alterados (n = 15). Se determinaron las concentraciones de proteína y de nitrito por los métodos de Lowry y de Griess, respectivamente. Además, se determinó la edad de los animales por cronometría dentaria. Se aplicó análisis de varianza y una posterior prueba de Tukey para observar diferencias entre grupos articulares.

El promedio de edad de los equinos fue de 5.3 ± 3.6 años en el grupo NN, 4.4 ± 3.1 años en el grupo NA, 9.9 ± 4.2 años en el grupo AN y 10.7 ± 3.8 años en el

grupo AA. Los grupos NN y NA presentaron una edad significativamente menor ($p = 0.001$) que los grupos AN y AA.

La concentración de proteína en el líquido sinovial fue de 15.2 ± 6.3 mg/mL en las articulaciones NN, 13.4 ± 8.4 mg/mL en las articulaciones NA, 14.4 ± 7.4 mg/mL en las articulaciones AN y 10.8 ± 5.4 mg/mL en las articulaciones AA. No se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) de concentración de proteínas entre los grupos.

La concentración de nitrito en el líquido sinovial fue de 29.4 ± 27.9 μ M en las articulaciones NN, 44.4 ± 32.6 μ M en las articulaciones NA, 32.6 ± 27 μ M en las articulaciones AN y 26.3 ± 26.1 μ M en las articulaciones AA. No se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de nitritos entre los grupos de articulaciones.

Estos datos sugieren que las articulaciones normales (NN) especialmente en su cartílago son más frecuentes en equinos jóvenes, presentando una leve tendencia a tener un promedio de concentración de proteínas mayor y nitritos detectables en baja concentración, pero si la membrana sinovial se encuentra alterada (AN) se produce un aumento del promedio de los nitritos probablemente por la estimulación de la membrana sinovial al cartílago articular a través de citoquinas. Las articulaciones con mayor alteración (AA) fueron aquellas pertenecientes al grupo de mayor edad promedio y que presentó menor concentración promedio de proteínas y de nitritos, lo que se explicaría por la destrucción tanto de la membrana como del cartílago y por ende, menor cantidad y funcionalidad de los sinoviocitos y condrocitos.

SUMMARY

Osteoarthritis is the most common joint disease in horses that produce joint pain and loss of mobility which consequence is a poor performance in equine athletes. The osteoarthritis is characterized by articular cartilage destruction, with local splitting and fragmentation. Nitric oxide (NO) has been implicated as an important biological mediator in the articular pathology and can modify the homeostasis of the cartilage that promotes its destruction. NO is a free and gaseous radical, synthesized from the amino acid L-arginine by a family of isoenzymes called the nitric oxide synthases (NOS). NO can play a role in a variety of physiological processes and is oxidized to nitrite and nitrate in the biological medium that has been used as markers of the production of NO. Chondrocytes are the major source of NO in diarthrodial joints.

Synovial fluids were collected from 110 metacarpophalangeal joints of crossbreed equine at slaughter-house. The selection of four articular groups: NN = cartilage and membrane normals (n = 47); NA = cartilage normal and membrane altered (n = 25); AN = cartilage altered and membrane normal (n = 23); AA = cartilage and membrane altered (n = 15); was determined by macroscopic appearance (normal or altered) of articular cartilage and synovial membrane. Concentrations of protein and nitrite were determined by Lowry and Griess colorimetric reactions, respectively. The age of equines was also determined by dental chronometry. ANOVA and Tukey test were applied to determine differences in the variables.

The age media were of 5.3 ± 3.6 years in NN joints, 4.4 ± 3.1 years in NA joints, 9.9 ± 4.2 years in AN joints and 10.7 ± 3.8 years in AA joints. The age of the groups NN and NA were significantly lower ($p = 0.001$) than AN and AA groups.

The synovial fluid protein concentration were of 15.2 ± 6.3 mg/mL in NN joints, 13.4 ± 8.4 mg/mL in NA joints, 14.4 ± 7.4 mg/mL in AN joints and 10.8 ± 5.4 mg/mL in AA joints. No significant differences ($p < 0.05$) of concentration of

proteins were found.

The synovial fluid nitrite concentration were of $29.4 \pm 27.9 \mu\text{M}$ in NN joints, $44.4 \pm 32.6 \mu\text{M}$ in NA joints, of $32.6 \pm 27 \mu\text{M}$ in AN joints and $26.3 \pm 26.1 \mu\text{M}$ in AA joints. No significant differences ($p < 0.05$) of concentration of nitrites were found between the groups.

This dates suggest than the normal joints (NN) in special its cartilage are more frequents in young equines, and presented a mild tendency in major concentration of proteins and nitrites detectables in low concentrations, but if the synovial membrane is injured (AN) was produced a tendency augment of nitrites probability for the stimulation mediated for citokines of the membrane to the articular cartilage. The joints with major alteration resulted to by the group than also presented a age major (AA) with mild minor concentration of proteins and nitrites, it can to by explicated for the destruction of the synovial membrane and cartilage and low cellularity and functionality of this tissues.

ÍNDICE

	Página
I.- Introducción	1
II.- Revisión Bibliográfica	3
III.- Objetivos	
Objetivo General.....	11
Objetivos Específicos.....	11
IV.- Materiales y Métodos	
Material biológico.....	12
Recolección de las muestras y procesamiento.....	12
Clasificación macroscópica	13
Medición de proteínas en el líquido sinovial equino.....	14
Método de medición de nitrito.....	16
Medición de nitrito en el líquido sinovial equino	
1.- Estandarización de la medición de nitrito.....	18
2.- Estabilidad de los nitritos en diferentes condiciones de manipulación.....	18
a) Estabilidad de nitrito a distinta temperatura.....	18
b) Estabilidad de nitrito en el tiempo.....	19
3.- Medición y comparación de la concentración de nitrito en el líquido sinovial....	19
Análisis de datos.....	19
V.- Resultados	
1.- Distribución de las edades entre los grupos articulares.....	20
2.- Distribución de la Concentración de proteínas en el líquido sinovial equino.....	21
3.- Estandarización de la medición de nitrito en el líquido sinovial equino	
a) Eliminación de proteínas del líquido sinovial.....	22
b) Curva de calibración de nitrito.....	22
c) Soluciones para preparar el reactivo de Griess.....	23
4.- Estabilidad de nitrito	
a) Estabilidad de nitrito a distintas temperaturas.....	24
b) Estabilidad de nitrito en el tiempo.....	25
5.-Determinación y comparación de la concentración de nitrito en el líquido sinovial equino de articulaciones metacarpogalángicas normales y alteradas.....	26
VI.- Discusión.....	28
VII.- Conclusiones	
Estandarización de la metodología.....	35
Determinaciones experimentales.....	35
VIII.Bibliografía.....	37

INTRODUCCIÓN

Las patologías que afectan al sistema músculo esquelético son responsables de un importante número de consultas dentro de la práctica de la clínica equina. Un gran porcentaje de ellas corresponde a problemas podales, especialmente aquellos que involucran a las articulaciones móviles o diartrodiales, constituyendo estas patologías una de las principales causas del bajo rendimiento físico de los equinos afectados. La osteoartritis (OA) o enfermedad degenerativa articular (EDA) es una de las patologías más importantes, tanto por su prevalencia como por sus consecuencias de tipo invalidante. El dolor articular y la pérdida de la movilidad causada por la OA son causas comunes del bajo rendimiento y del retiro prematuro de equinos desde las competencias (Todhunter y Lust, 1992).

La característica más relevante de esta patología, es la alteración estructural y funcional progresiva del cartílago articular, caracterizado por la aparición de úlceras locales y fragmentación, que termina por afectar a todos los tejidos y estructuras articulares, generando esclerosis del hueso subcondral y formación de osteofitos. La sinovitis e hidroartrosis se pueden asociar ocasionalmente con la enfermedad, generando dolor y disfunción de la articulación afectada.

Debido a las características antes mencionadas, la osteoartritis puede ser diagnosticada, clínica y radiológicamente, cuando ya tiene un curso prolongado. Los cambios radiológicos están ausentes en estados iniciales de la enfermedad. Las radiografías de contraste tienen utilidad limitada para demostrar erosión del cartílago articular (McIlwraith, 1982).

Los traumas mecánicos se han señalado como el origen común de la OA, que podría ser un evento traumático único suficiente para provocar daño de los tejidos articulares, o bien, eventos traumáticos repetitivos y de baja intensidad, igualmente nocivos para la articulación. El desarrollo de la OA en caballos ha sido asociado con el estrés de la carrera y el entrenamiento, lo que apoya la idea de que el estrés mecánico es la mayor causa de OA en esta especie (Cantley *et al.*, 1999).

La articulación metacarpofalángica del equino es una de las más afectadas por esta patología, y por eso se ha utilizado como modelo de estudio en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Para los estudios se han utilizado equinos mestizos de matadero con el objetivo de caracterizar el daño provocado por esta patología a nivel de cartílago articular, a través de la medición de moléculas liberadas desde la matriz del cartílago hacia el líquido sinovial, las que eventualmente podrían ser utilizadas como indicadores del proceso degenerativo de este tejido.

En los últimos años, se ha descrito que el óxido nítrico (NO) sería un mediador local de la inflamación articular en la artritis reumatoídea (AR) y la osteoartritis (OA) en varias especies, postulándose que el NO y las enzimas proteolíticas conocidas como metaloproteinasas de matriz (MMP_s) jugarían un papel importante, tanto en la homeostasis del cartílago articular, como en la cascada de destrucción de éste (Goldring, 2000).

En esta Memoria de Título se buscó establecer la relación entre la concentración de nitrito como derivado del NO en el líquido sinovial y la alteración macroscópica del cartílago articular equino, de articulaciones metacarpofalángicas normales y alteradas, de equinos mestizos de matadero, como potencial indicador de daño articular, *in vivo*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El óxido nítrico (NO) es un radical libre capaz de reaccionar con una amplia variedad de moléculas y grupos químicos, tales como el hierro (Fe) del grupo hemo, grupos sulfhidrilos o tioles, anión superóxido (O_2^-) y oxígeno molecular (O_2). Debido a esta capacidad, el NO tiene una vida media corta (<15 segundos) en el medio biológico, ya que es una molécula gaseosa sin carga eléctrica y de pequeño tamaño, el NO tiene la capacidad de difundir libremente a través de la membrana celular y puede actuar en forma autocrina o paracrina (Jang y Murrell, 1998).

En solución acuosa, tal como es un medio biológico, el NO se oxida a nitrito (NO_2^-) por acción del O_2 (Ignarro *et al.*, 1993). En la sangre, el NO_2^- es rápidamente oxidado a nitrato (NO_3^-) por la oxihemoglobina (Jang y Murrell, 1998). *In vitro* el NO_2^- y el NO_3^- son metabolitos estables del NO y son usados como moléculas marcadoras para determinar indirectamente la presencia de NO.

Una cantidad significativa de NO_2^- puede acumularse y ser analizado en fluidos carentes de grupos hemo tales como el líquido cefalorraquídeo y sinovial (Green *et al.*, 1982).

En los vertebrados, el NO es sintetizado por una familia de isoenzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS), que están codificadas en genes distintos. Hasta la fecha se han descrito tres isoformas, las que utilizan el aminoácido L-arginina como sustrato. La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, NOS-III) (Lamas *et al.*, 1992) y la neuronal (nNOS, NOS-I) (Bredt *et al.*, 1991), llevan los nombres de las células de las cuales fueron aisladas por primera vez. Ambas enzimas son expresadas de manera constitutiva, es decir, siempre se encuentran presentes en la mayoría de los tejidos en las que se han descrito, y para su actividad requieren de Ca^{+2} -calmodulina.

La eNOS es sintetizada en el endotelio vascular y el NO producido por ella está involucrado en la vasodilatación regulando la presión del flujo sanguíneo, el control de la agregación plaquetaria y la regulación de la contractilidad del miocardio (Schulz *et al.*, 1992), siendo el producto derivado de esta enzima denominado originalmente como factor relajador derivado del endotelio (EDRF) (Furchgott y Zawadski, 1980). El NO derivado del endotelio difunde en las células musculares adyacentes e interactúa con el grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa soluble, estimulando la producción del mensajero intracelular guanosinamonofofato cíclico (GMPc), que produce relajación de la musculatura lisa. Las funciones de la vía de transducción de la señal NO-GMPc han sido estudiadas en muchos sistemas orgánicos, incluyendo el sistema nervioso central donde éste puede actuar como un neurotransmisor involucrado en la memoria (Jang y Murrell, 1998) y en la función motora (Moroz *et al.*, 1993) no descartándose la existencia de otras vías dependientes de NO. En el sistema nervioso periférico el NO está involucrado en la modulación o relajación del tracto gastrointestinal (Ward *et al.*, 1992), la modulación de los cuerpos cavernosos y del glándulo siendo el NO el mediador final común de la erección (Moncada y Higgs, 1993)

Debido a la participación del NO en numerosas vías de regulación intracelular y el gran interés que provocó en el medio científico, se le proclamó como la “molécula del año” por la prestigiosa revista *Science* en 1992 (Koshland, 1992).

Se ha descrito que, a diferencia de las NO sintasas constitutivas, la enzima NO sintasa inducible (iNOS, NOS-II) (Xie *et al.*, 1992), normalmente se encuentra ausente en las células, pero que puede ser expresada en respuesta a citoquinas, tales como interleuquina 1- β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interferón γ . Las endotoxinas bacterianas o lipopolisacáridos (LPS) también pueden estimular la expresión de iNOS, y muchas veces actúan en forma sinérgica con citoquinas para expresar iNOS *in vitro* (Jang y Murrell, 1998).

Muchas células tienen la capacidad de expresar iNOS, entre las cuales se incluyen macrófagos, neutrófilos, hepatocitos, células musculares lisas y condrocitos (Jang y Murrell, 1998). La actividad de la iNOS es independiente de Ca^{+2} -calmodulina y una vez expresada, es capaz de generar NO de manera sostenida. El exceso de NO puede ser potencialmente citotóxico, razón por la cual se ha asociado a la iNOS con una acción antimicrobiana y antitumoral en la respuesta inmune del huésped así como en la generación de daño tisular (Nathan y Hibbs, 1991).

Existen trabajos realizados durante la última década, que relacionan al NO con enfermedades articulares, en los que no se ha podido establecer cuál es su verdadero papel en estas patologías. Distintos grupos de trabajo han presentado al condrocito como el mayor productor de NO en articulaciones diartrodiales, estableciéndose que expresan la isoforma iNOS. La membrana sinovial también tiene la capacidad de expresar iNOS, presumiblemente por sinoviocitos tipo A o tipo macrófago (Jang y Murrell, 1998).

Existe evidencia de que el NO es un modulador del proceso inflamatorio, con propiedades proinflamatorias tales como promover la vasodilatación y permeabilidad capilar, promover la hipotensión o colapso vascular en la sepsis, generar efectos citotóxicos, activar la ciclooxigenasa, reaccionar con O_2^- para formar el tóxico peroxinitrito (ONOO⁻). Por otra parte, se le han atribuido propiedades antiinflamatorias por medio de la inhibición de los procesos de: adhesión de leucocitos al endotelio, expresión de la P-selectina en endotelio y plaquetas evitando la trombosis microvascular, la proliferación de linfocitos, degranulación de las células mastocíticas, producción de oxidantes en fagocitos y la inhibición de la ciclooxigenasa (Clancy *et al.*, 1998).

Por lo tanto, hasta la fecha no existe consenso sobre el papel del NO en el proceso inflamatorio, por lo que resulta interesante reconocer la presencia y medir la concentración de nitrito en el fluido sinovial equino, *in vivo*, considerando alteraciones articulares macroscópicas.

Se ha descrito un gran número de mediadores químicos que participan en la degeneración del cartílago articular, tales como prostaglandinas, leucotrienos, radicales libres, proteasas y NO (Goldring, 2000).

Farrell *et al.* (1992) demostró la existencia de niveles elevados de NO_2^- en suero y fluido sinovial en pacientes humanos que padecían de artritis reumatoídea (AR) y osteoartritis (OA). La producción de NO y la expresión de iNOS en pacientes humanos con AR fueron detectadas en la membrana sinovial y el cartílago por técnicas de inmunodetección y por transcripción reversa por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Jang y Murrell, 1998).

Se ha descrito que el cartílago humano afectado por osteoartritis es capaz de generar espontáneamente una cantidad sustancial de NO_2^- por sobre las 72 hrs. en cultivos celulares *in vitro*. En estas mismas condiciones, pero en presencia de inhibidores de NOS se reducen los niveles basales de NO_2^- y al adicionar citoquinas o LPS se incrementa la producción de NO_2^- (Jang y Murrell, 1998).

Otros estudios han presentado que el NO es producido sólo en niveles basales en la membrana sinovial equina, pero su producción es considerablemente más alta en explantes de cultivos de cartílagos articulares equinos (Frean *et al.*, 1997; Rechenberg *et al.*, 1997).

Tung *et al.* (2002), describieron que la interleuquina 1 β recombinante equina (IL-1 β re), incrementa la expresión de la iNOS en cultivos de cartílago articular equino de una manera dosis dependiente con un aumento paralelo de la concentración de NO $_2^-$ en el medio de cultivo. Además se determinó que la dexametasona y los glicosaminoglicanos polisulfatados disminuyen significativamente, tanto la expresión génica de la iNOS como la concentración de NO $_2^-$ en el sobrenadante del medio del cultivo estimulado con IL-1 β re. Por otra parte se encontró que la fenilbutazona y el ácido hialurónico no tuvieron efectos consistentes en la expresión de la iNOS y tampoco una influencia significativa en el contenido de NO $_2^-$ en el medio de cultivo estimulado con IL-1 β re.

Rechenberg *et al.* (2000), realizaron un estudio con explantes de cartílago articular y membrana sinovial de equino, encontrando concentraciones de NO $_2^-$ mayores en explantes de cartílago comparado con explantes de membrana sinovial. Además, se encontró que la mayor concentración de NO $_2^-$ es producida por cartílago con OA moderada, seguida por articulaciones normales con concentraciones de NO $_2^-$ intermedias y finalmente, el cartílago con OA severa con menor concentración. Además, determinaron que tanto el cartílago como la membrana sinovial osteoartrítica, expresan la iNOS y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) que catalizan la síntesis de NO y de prostaglandina E $_2$ (PGE $_2$), respectivamente.

Se ha establecido que el NO, la PGE $_2$ y las MMP $_s$ tienen un papel en la cascada de degradación del cartílago, como también en la homeostasis del cartílago articular (MacIlwraith, 1996; Platt, 1996). La producción endógena de NO puede suprimir la síntesis de la matriz y además existe evidencia que puede inducir la apoptosis de los condrocitos (Goldring, 2000).

Muchas enzimas incluidas la iNOS, la COX-2 y la fosfolipasa A $_2$, modulan las funciones de los condrocitos durante la osteoartritis. Los condrocitos son capaces de expresar estas enzimas cuando son estimuladas sólo por la IL-1 β o en combinación con el TNF- α . (Rechenberg *et al.*, 2000).

En distintos modelos animales de artritis experimental, la administración de inhibidores de NOS suprime o disminuye los signos y síntomas de la enfermedad. Esto sugiere que *in vivo* existe una relación entre el NO y la artritis, especialmente en el modelo de artritis inflamatoria (Jang y Murrell, 1998). Esto se hace más consistente con el trabajo de Pelletier *et al.* (2000), quienes constataron una reducción significativa de la progresión de la OA por inhibidores específicos de la iNOS en un estudio *in vivo*.

Otro estudio *in vitro* ha mostrado que el NO inhibe la síntesis de proteoglicanos, demostrado por la menor incorporación metabólica de sulfato (SO_4^{2-}) dentro de los glicosaminoglicanos, y que puede ser revertida por inhibidores de la NOS (Jang y Murrell, 1998).

Algunos estudios prueban que el NO incrementa la actividad de las MMP_S en el cartílago y que los inhibidores de NOS bloquean el incremento de actividad. El NO activa a las MMP_S en condrocitos de cartílago bovino. Se demostró que la actividad metaloproteinasa también es dependiente de NO en condrocitos de conejo estimulados con IL-1. En condrocitos de cartílago bovino, el NO estimulado por IL-1 aumentó la producción de PGE-2, un efecto que pudo ser revertido con adición de inhibidores de NOS (Jang y Murrell, 1998).

Se ha presentado que el TNF- α estimula al sinoviocito a producir NO en OA (Hilliquin *et al.*, 1997), y que este a su vez se ha relacionado con la producción de estromelisinina (MMP-3) en caninos con OA (Kammermann *et al.*, 1996). El TNF- α también estimula la producción de gelatinasa (otra MMP) en combinación con IL-1 (Stadler *et al.*, 1991).

Además, otros estudios sugieren que el NO generado por la iNOS podría inducir la apoptosis en cultivos de explantes de condrocitos y sinoviocitos humanos normales estimulados con citoquinas o extraídos de pacientes con AR (Blanco *et*

al., 1995; Hof *et al.*, 2000). Recientemente se ha presentado a la apoptosis como la principal vía de la muerte condrocitaria en OA humana (Blanco *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 1998).

Kim *et al.*, (2003) trabajando con cartílago articular equino normal y osteoartrítico, demostró que la distribución topográfica de la apoptosis condrocitaria, la degradación de la matriz del cartílago y la producción de NO se sobreponían casi completamente en las áreas de lesiones de cartílagos articulares equinos con OA, sugiriendo que estos fenómenos patológicos están íntimamente relacionados.

Stadler *et al.* (1991), describió *in vitro* que el NO_2^- representa un 51.5% del total de NO producido desde condrocitos articulares.

De acuerdo a los antecedentes presentados, es posible señalar que el NO podría tener participación en la fisiopatología de la OA, y una manera de detectarlo es determinando la concentración de su producto final estable, el nitrito (NO_2^-). Por lo tanto, la medición de su concentración en el fluido sinovial, podría ser útil para detectar en forma precoz la OA equina, o evaluar el tratamiento.

A diferencia de los estudios revisados, en esta Memoria se propone detectar el NO_2^- directamente desde el líquido sinovial, lo que permitirá evaluar su concentración *in vivo*.

En el siguiente esquema se resumen los procesos hasta ahora conocidos en que participa el NO dentro de las articulaciones diartrodiales de acuerdo a las investigaciones revisadas (figura 1).

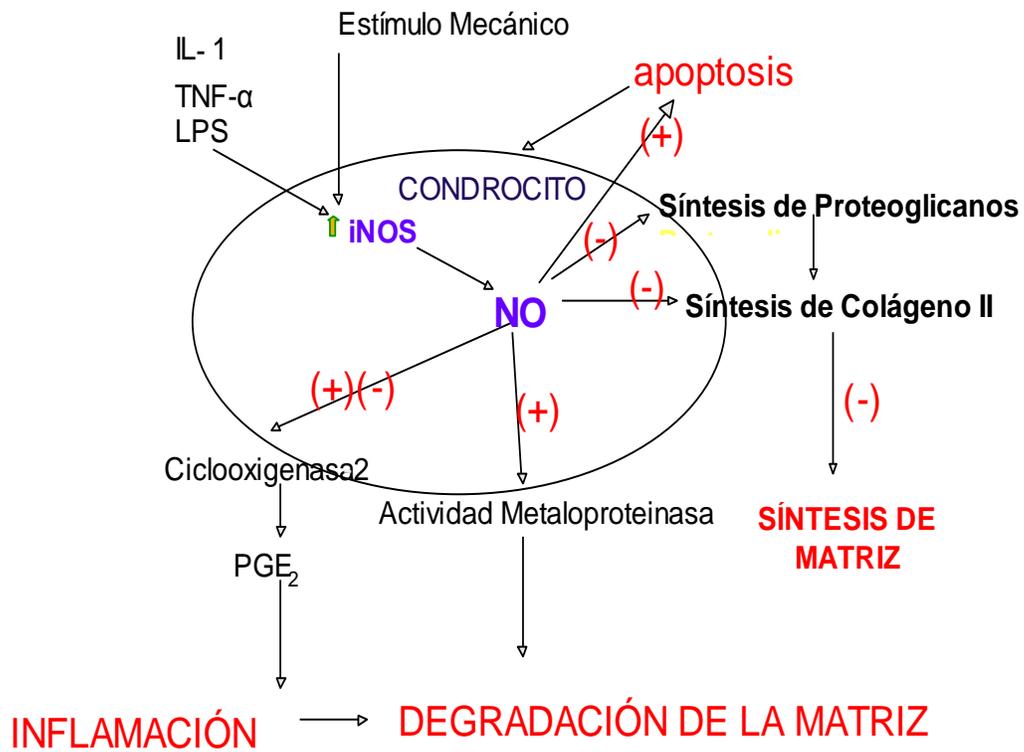


Figura 1: efectos del NO sobre el condrocito y el cartílago articular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comparar la concentración de NO_2^- del líquido sinovial proveniente de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada macroscópicamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar un método colorimétrico para la determinación de la concentración de NO_2^- en el líquido sinovial equino.
2. Determinar la estabilidad del NO_2^- en el líquido sinovial a distintas temperaturas de conservación y a través del tiempo.
3. Determinar y comparar la concentración de NO_2^- en el líquido sinovial proveniente de la articulación metacarpofalángica normal y alterada macroscópicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico:

Se recolectaron en total 120 articulaciones metacarpofalángicas de equinos mestizos, en ayuno de 24 horas, beneficiados en el matadero Municipal de La Pintana, en alrededor de 15 visitas a esta planta faenadora, identificándose la edad según cronometría dentaria (Richardson, 1997). Del total de articulaciones, se descartaron 10 por pérdidas accidentales o debido a recolección de datos insuficientes, seleccionándose finalmente 110 articulaciones para desarrollar el trabajo.

Recolección de las muestras y procesamiento:

Las muestras recolectadas, se trasladaron embaladas en bolsas de polietileno a temperatura ambiente a la Facultad; allí se procedió a debridar la piel sobre la articulación metacarpofalángica y se desinfectó con alcohol yodado la zona de los sacos volares, por donde se procedió a realizar la artrocéntesis de esta articulación con aguja 21 G x 1½” y jeringa de 5 mL. Una vez obtenido el líquido sinovial se mantuvo en baño de hielo, mientras se terminaba todo el proceso (Figura 2).



Figura 2: artrocéntesis de la articulación metacarpofalángica a nivel de los sacos volares.

Luego, se realizó la diéresis de las articulaciones metacarpofalángicas para observarlas y clasificarlas en normales o alteradas según sus características macrocópicas.

El líquido sinovial obtenido fue centrifugado a 1000 x g por 20 minutos para eliminar células y restos de tejido. El sobrenadante fue alicuotado y congelado a -20°C, para luego realizar la medición de proteínas y de NO_2^- .

Clasificación macroscópica:

Se consideró **normal** aquella articulación que presentó su membrana sinovial no congestiva, su cartílago articular con su superficie lisa, brillante y de color blanco nacarado (figura 3A), cuyo líquido sinovial era de color amarillo claro translúcido.

Se consideró **alterada** aquella articulación cuyo cartílago presentó líneas de roce y/o focos de necrosis o de erosión, y cambio de coloración. En la membrana sinovial se observó la presencia de congestión (figura 3B), siendo descartados los líquidos que presentaban sangre.

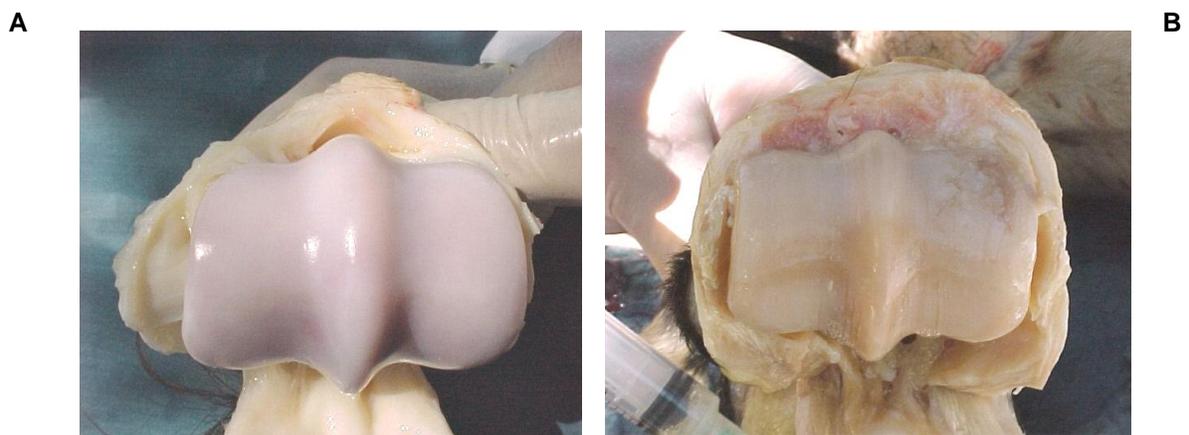


Figura 3: fotografía que muestra una articulación macroscópicamente normal (A) y una articulación alterada (B).

Las muestras se clasificaron de acuerdo a la normalidad y alteración macroscópica de cartílago articular y membrana sinovial, con lo que se generaron cuatro grupos:

NN: cartílago normal y membrana sinovial no congestiva	n: 47
NA: cartílago normal y membrana sinovial congestiva	n: 25
AN: cartílago alterado y membrana sinovial no congestiva	n: 23
AA: cartílago alterado y membrana sinovial congestiva	n: 15
total :	110

Estos grupos se analizaron según edad, concentración de proteína y concentración de nitrito.

Medición de proteínas en el líquido sinovial equino

La medición de proteínas en el líquido sinovial, se realizó para tener un parámetro adicional conocido que permitiera evaluar normalidad o alteración de cada articulación.

El líquido sinovial se descongeló a temperatura ambiente y diluyó 1:10 con agua destilada.

Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Lowry *et al.* (1951), usando seroalbúmina de bovino (BSA) como estándar, en un rango entre 5 µg y 50 µg de BSA leyendo la absorbancia a 750 nm., en un espectrofotómetro UNICAM UV/Vis Spectrometer. A cada una de las muestras se le midió la concentración de proteínas por triplicado, calculándose el promedio para cada determinación.

Se utilizaron las siguientes soluciones para la reacción de Lowry:

Solución ABC, formada por:

A: carbonato de sodio al 2 %: 9.8 mL

B: tartrato de sodio al 1 % : 100 µL

C: sulfato de cobre al 1 % : 100 µL

Reactivo de Folin diluido 1:1 en agua destilada.

En la tabla 1 se muestra el esquema de trabajo para la medición de proteínas en el líquido sinovial.

Tabla 1: protocolo para la medición de proteína. Cada muestra fue analizada por triplicado y cada fila indica lo que se agrega a cada tubo eppendorf y el orden en que se realiza.

Estándar o muestra	BSA 1µg/1µL (µL)	H₂O c.s.p. 200µL	Líquido sinovial 1:10(µL)	Solución ABC (µL) x 15 min.	Reactivo Folin 1:1(µL) x 30 min.	Absorbancia a 750 nm.
S1	5	195	-	1000	100	
S2	10	190	-	1000	100	
S3	15	185	-	1000	100	
S4	25	175	-	1000	100	
S5	30	170	-	1000	100	
S6	50	150	-	1000	100	
Muestra	-	190	10	1000	100	
Muestra	-	190	10	1000	100	
Muestra	-	190	10	1000	100	
Blanco	-	200	-	1000	100	
Blanco	-	200	-	1000	100	
Blanco	-	200	-	1000	100	

Método de medición de nitritos:

El método aplicado más frecuentemente en la detección de NO_2^- es la reacción colorimétrica de Griess (Green *et al.*, 1982), la cual forma un cromóforo a partir de la diazonización de sulfanilamida (SULF) por NO_2^- en medio ácido, seguido por el acoplamiento con aminas bicíclicas tal como la N-1 (naftil) etilendiamina (NEDD), como se muestra en la figura 4.

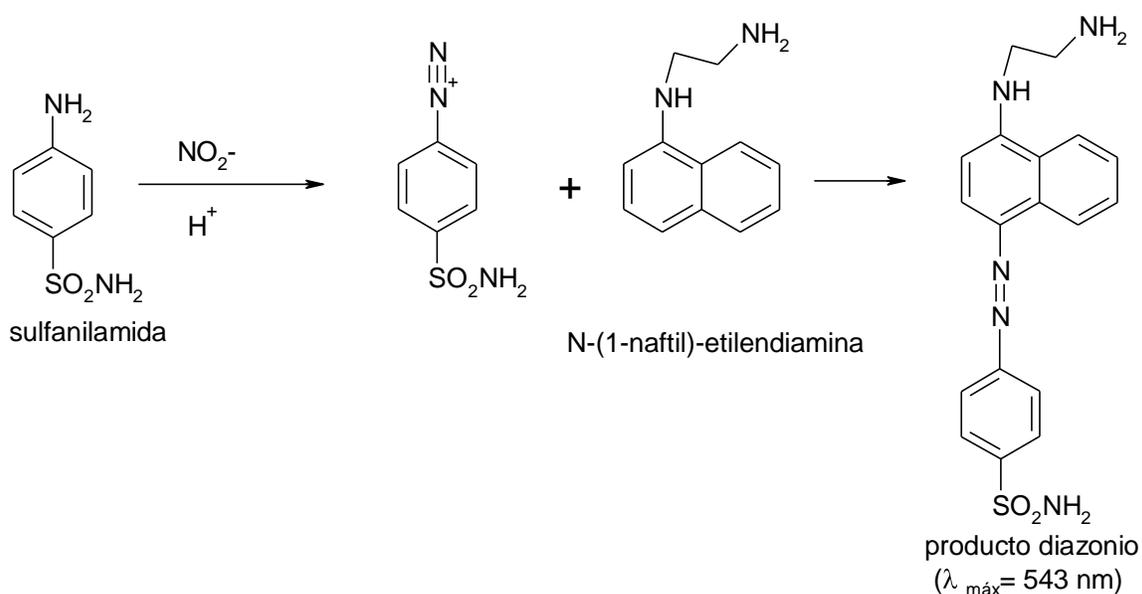


Figura 4: reacción colorimétrica de Griess

Para el análisis de NO_2^- , el líquido sinovial se descongeló a temperatura ambiente y fue diluido 1:7 en etanol absoluto para precipitar las proteínas y luego se centrifugó a $1000 \times g$ por 20 min para obtener el sobrenadante que se utilizó para la reacción colorimétrica de Griess, leyendo la absorbancia a 540 nm a los 15 minutos, en un espectrofotómetro UNICAM UV/Vis Spectrometer.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- NaNO₂ 0.1 mM, para la curva de calibración de NO₂⁻ en un rango entre 0.9 μmoles a 10 μmoles de NaNO₂.

- Reactivo de Griess: fue preparado con una solución de NEDD (0.1 % p/v en 5 % HCl) y otra de SULF (2 % p/v en 5 % de HCl). Ambas soluciones son estables por varios meses almacenadas a 4°C protegidas de la luz y fueron descartadas si aparecía coloración. Se adoptó como protocolo, mezclar ambas soluciones para formar el reactivo de Griess, minutos antes de su utilización (no más de 30 min.). En la tabla 1 se muestra el esquema de trabajo para la medición de NO₂⁻.

Tabla 2: protocolo para la medición de nitrito. Cada muestra fue analizada por triplicado y cada fila indica lo que se agrega a cada tubo eppendorf y el orden en que se realiza. S1 a S5 son cantidades crecientes de NaNO₂ (curva estándar).

Estándar o muestra	NaNO ₂ 0.1mM (μmoles)	Muestra 1:7 en etanol (μL)	H ₂ O c.s.p. 600 μL	Reactivo de Griess (μL) x 15 min.	Absorbancia 540 nm.
S1	0.9	-	591	300	
S2	1.8	-	582	300	
S3	2.7	-	573	300	
S4	7.2	-	528	300	
S5	10	-	500	300	
Muestra	-	300	300	300	
Muestra	-	300	300	300	
Muestra	-	300	300	300	
Blanco	-	-	600	300	
Blanco	-	-	600	300	
Blanco	-	-	600	300	

Medición de nitrito en el líquido sinovial equino

1.- Estandarización de la medición de nitrito:

Con el fin de precipitar y eliminar las proteínas del líquido sinovial que interfieren con la reacción colorimétrica de Griess, se probó la dilución con etanol absoluto 1:7, y con acetonitrilo a diluciones 1:3 y 1:7; luego los líquidos se centrifugaron a 1000 x g por 20 min para separar el sobrenadante.

El reactivo de Griess, se preparó con sulfanilamida (SULF) al 2 % en solución de ácido clorhídrico (HCl) al 5 % o con SULF en solución de ácido fosfórico (H₃PO₄) al 5 %. Se realizaron ensayos con el fin de probar ambas soluciones en nuestro modelo de trabajo.

2.- Estabilidad de los nitritos en diferentes condiciones de manipulación:

Se realizaron mediciones de NO₂⁻ en el líquido sinovial a distintos tiempos y temperaturas de conservación para determinar si estas variables afectaban su concentración.

a) Estabilidad de nitrito a distinta temperatura:

Se midió la concentración de NO₂⁻ en el líquido sinovial de cuatro articulaciones metacarpofalángicas normales (NN) para determinar si se producían cambios en la concentración de NO₂⁻ atribuibles a la temperatura. De cada líquido sinovial se obtuvieron nueve alícuotas que se mantuvieron en triplicado y durante una hora, en un baño de hielo, a temperatura ambiente y a 50 °C.

b) Estabilidad de nitrito en el tiempo:

Se utilizaron tres alicuotas provenientes de la mezcla de líquidos sinoviales recién obtenidos de articulaciones normales (NN), a las que se les midió la concentración de NO_2^- en el siguiente orden: la primera alicuota se midió inmediatamente luego de realizada la mezcla de los líquidos sinoviales y las otras dos fueron almacenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$; la segunda fue descongelada y medida a la cuarta semana y la tercera alicuota fue descongelada y medida su concentración de NO_2^- a la octava semana.

3.- Medición y comparación de la concentración de nitrito en el líquido sinovial:

Una vez estandarizada la técnica y establecidas las condiciones de medición, se midió la concentración de NO_2^- mediante la reacción de Griess, en los líquidos sinoviales recolectados de articulaciones normales y alteradas, por triplicado a cada una de ellas.

Análisis de datos:

Para el análisis estadístico de las concentraciones de proteína, concentraciones de NO_2^- de los líquidos sinoviales, y de la edad de los equinos donantes de estas, se aplicó primero un Análisis de Varianza para determinar la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey.

RESULTADOS

1.- Distribución de las edades entre los grupos articulares:

Se estableció el promedio de edad (años), la desviación estándar (DE), y el error estándar (SEM) para cada uno de los cuatro grupos de articulaciones (NN, NA, AN, AA). Se encontró que las muestras provenientes de equinos con su cartílago articular normal (NN y NA), presentaron promedios de edad semejantes entre ellos, pero significativamente menores con respecto a las muestras de equinos con cartílagos alterados (AA y AN) los que fueron semejantes también entre ellos presentando un promedio mayor de edad.

Se encontró diferencia altamente significativa ($p = 0.0001$) para la edad entre los grupos NN y NA con los grupos AN y AA (Tabla 3).

Tabla 3: Tabla de distribución de la edad para los cuatro grupos de articulaciones metacarpofalángicas. $p = 0.0001$. Las medias de letras iguales no son significativamente diferentes.

Articulaciones	Edad (años) promedio \pm DE	Error estándar medio (SEM)	n
NN	5,3 \pm 3,6 (a)	0.50	47
NA	4,4 \pm 3,1 (a)	0.67	25
AN	9,9 \pm 4,2 (b)	0.94	23
AA	10,7 \pm 3,8 (b)	1.16	15

2.- Distribución de la Concentración de proteínas en el líquido sinovial equino:

A los cuatro grupos de articulaciones se les calculó el promedio de concentración de proteína (mg/mL), desviación estándar (DE), y su error estándar (SEM). Se observó un promedio mayor en el grupo NN seguido por el grupo AN luego, las articulaciones NA y por último las del grupo AA. Se encontró una leve tendencia a la disminución de la concentración de proteínas a medida que aumentaba la alteración articular. No se encontró diferencia significativa entre los grupos, apreciándose además altas desviaciones estándares en los cuatro grupos de articulaciones (tabla 4).

Tabla 4: Tabla de distribución de la concentración de proteínas del fluido sinovial para los cuatro grupos de articulaciones metacarpofalángicas.

Articulaciones	Proteína (mg/mL) promedio \pm DE	SEM	n
NN	15.2 \pm 6.3	0.92	47
NA	13.4 \pm 8.4	1.75	25
AN	14.4 \pm 7.4	1.65	23
AA	10,8 \pm 5.4	1.50	15

3.- Estandarización de la medición de nitrito en líquido sinovial equino:

a) Eliminación de proteínas del líquido sinovial:

Las proteínas del líquido sinovial interfieren con la reacción colorimétrica de Griess. Se utilizaron dos agentes precipitantes de proteínas del líquido sinovial a distintas diluciones. Se comparó la concentración de NO_2^- en el líquido sinovial de articulaciones metacarpofalángicas NN y NA utilizando diluciones 1:7 con etanol, y 1:7 y 1:3 con acetonitrilo, medidas por duplicado (tabla 5). Estos resultados demuestran que con etanol 1:7, se logró una mayor diferencia en la concentración de NO_2^- entre las articulaciones NN y NA.

Tabla 5: Concentración de nitrito en el líquido sinovial diluido con diferentes agentes precipitantes de proteínas y a distintas diluciones.

Nitritos $\mu\text{M} \pm \text{DE}$			
Muestra	Etanol 1:7	Acetonitrilo 1:7	Acetonitrilo 1:3
NN	14.8 ± 3.3	9.2 ± 1.4	5.4 ± 0.4
NA	51.4 ± 1.1	13.5 ± 1.9	6.1 ± 0.7

b) Curva de calibración de nitrito:

Se probaron distintas concentraciones de la solución estándar utilizada (NaNO_2 a 1mM y 0.1mM), determinándose que la concentración apropiada era de 0.1 mM, y con un rango entre 0.9 a 10 μmoles , ya que está permitió un rango más cercano a la concentración de NO_2^- detectada en el fluido sinovial en nuestros ensayos.

Además, para determinar el tiempo mínimo de reacción de la solución estándar con el reactivo de Griess, se realizó la lectura de la absorbancia de una curva estándar a distintos tiempos de reacción. No se observó diferencias al realizar las lecturas a 15 y a 30 minutos de la reacción colorimétrica de Griess (Tabla 6). Con este antecedente se decidió mantener un tiempo de reacción de 15 minutos para la reacción de Griess.

Tabla 6: Absorbancia de la curva estándar a distintos tiempos para la reacción de Griess (15 y 30 minutos).

	NaNO₂ 0.1mM(μL)	NaNO₂ μmoles	H₂O (μL)	Abs. 15' 540 nm	Abs. 30' 540 nm
S1	15	1	985	0.156	0.159
S2	30	2	970	0.233	0.233
S3	45	3	955	0.240	0.235
S4	90	6	910	0.391	0.384
S5	120	8	880	0.435	0.433
S6	150	10	850	0.533	0.527
B	-	-	1000	0	0

c) Soluciones para preparar el reactivo de Griess:

Existen dos maneras descritas de preparar el reactivo de Griess por lo que se compararon dos curvas de calibración con NaNO₂ (0.1 mM) utilizando sulfanilamida al 2% en HCl al 5% y sulfanilamida al 2% en H₃PO₄ al 5%, no encontrándose diferencias entre ambas curvas. Debido a esto, en nuestros ensayos posteriores se utilizó Sulfanilamida al 2% en HCl al 5% ya que es de menor costo.

4.- Estabilidad de nitrito:

Existe la posibilidad de que los NO_2^- se oxiden a NO_3^- por el oxígeno, por lo tanto, se estudió su estabilidad en diferentes condiciones de manipulación como son la temperatura y el tiempo de almacenamiento o conservación de la muestra.

a) Estabilidad de nitrito a distintas temperaturas:

Se calculó el promedio de la concentración de NO_2^- (μM) de tres determinaciones en el líquido sinovial de cuatro articulaciones metacarpofalángicas NN mantenidos durante una hora a distintas temperaturas, observándose una tendencia al aumento de la concentración de NO_2^- a mayor temperatura, con excepción de la muestra 25a (tabla 7).

Tabla 7: Estabilidad de nitritos: concentraciones promedios (μM) \pm desviación estándar de nitrito de las muestras NN 25a, 25b, 10b y 38b incubadas a distintas temperaturas por una hora (hielo, temperatura ambiente y 50 °C).

Muestras NN Incubadas por 1 hora	Nitritos $\mu\text{M} \pm \text{DE}$		
	Hielo	tº amb	50°C
25 a	34.6 \pm 10.3	36.5 \pm 1.0	32.0 \pm 5.0
25 b	28.9 \pm 3.4	33.3 \pm 2.7	38.7 \pm 6.7
10 b	49.7 \pm 0.6	41.4 \pm 4.3	65.8 \pm 4.3
38 b	62.4 \pm 2.0	80.3 \pm 14.2	99.8 \pm 7.1

b) Estabilidad de nitrito en el tiempo:

Se realizó una mezcla de líquidos sinoviales de articulaciones NN la que se fraccionó en tres alícuotas a las que se les midió por triplicado la concentración de NO_2^- a distintos tiempos, calculando luego el promedio de la concentración de NO_2^- (μM) y desviación estándar. Se detectó en la primera alícuota (día 1) una concentración promedio de NO_2^- significativamente mayor en relación a las otras dos alícuotas (semana 4 y semana 8), cuyos promedios fueron bajos y semejantes (tabla 8).

Tabla 8: Estabilidad de nitritos: concentraciones promedios (μM) y desviación estándar de nitrito en líquidos sinoviales mezclados de articulaciones NN medidas a distintos tiempos de conservación a -20°C .

Tiempo de almacenamiento a -20°C	Nitritos (μM) \pm D.E.
Día 1	$45,1 \pm 6,43$
Semana 4	$14,6 \pm 0,42$
Semana 8	$18,3 \pm 3,65$

5.- Determinación y comparación de la concentración de nitrito en el líquido sinovial equino de articulaciones metacarpofalángicas normales y alteradas:

Se determinó el promedio de la cantidad de NO_2^- (μM) en los cuatro grupos de articulaciones, su desviación estándar (DE), y su error estándar (SEM). Se encontró un valor promedio de NO_2^- mayor, pero no significativo en el grupo articular alterado sólo a nivel de su membrana sinovial (NA), seguido por las articulaciones con alteración sólo a nivel de cartílago (AN), luego las articulaciones normales (NN) y por último, las articulaciones con alteraciones en membrana y cartílago articular (AA). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de articulaciones. Además se apreciaron altas desviaciones estándares en los cuatro grupos de articulaciones. (Tabla 9 y figura 6).

Tabla 9: Tabla de la distribución de la concentración de nitrito del fluido sinovial para los cuatro grupos de articulaciones metacarpofalángicas.

Articulaciones	Nitrito (μM) promedio \pm DE	SEM	n
NN	29.4 \pm 27.9	4.07	47
NA	44.4 \pm 32.6	6.8	23
AN	32.7 \pm 27	6.04	20
AA	26.3 \pm 26.1	7.24	13

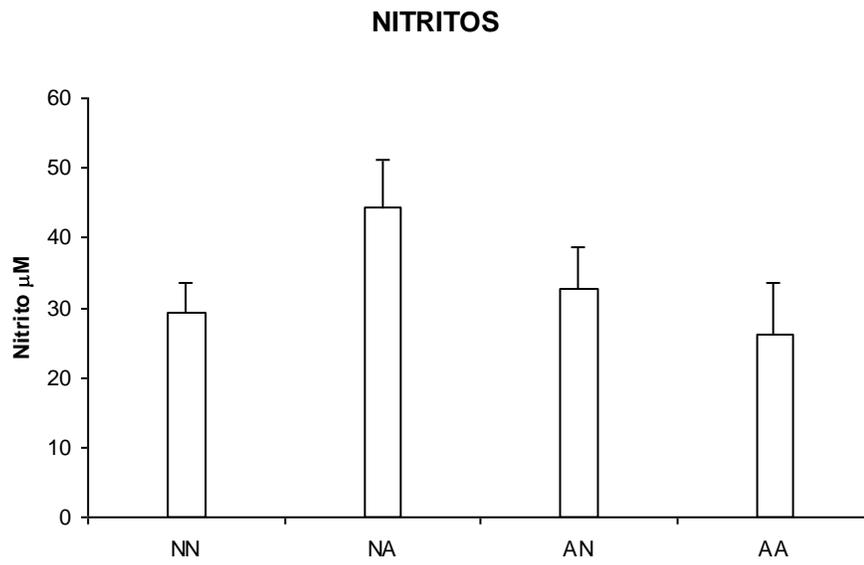


Figura 6: Gráfico de la distribución de la concentración de nitrito del fluido sinovial para los cuatro grupos de articulaciones metacarpofalángicas. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio.

DISCUSIÓN

En este trabajo, se evaluó en un modelo *in vivo* la concentración de NO_2^- , como producto final estable del NO en el líquido sinovial equino, comparando articulaciones metacarpofalángicas normales macroscópicamente con otras alteradas en diferentes grados. Los trabajos previos se han realizado *in vitro* y sólo un par de ellos en la especie equina (Frean *et al.*, 1997; Rechenberg *et al.*, 2000).

Se trabajó sólo con equinos mestizos de matadero, por lo que no se pudo tener en cuenta las características clínicas de cada individuo, como son la presencia o no de claudicación, dolor, antecedentes radiológicos y del tiempo de curso de las lesiones, que se identificaron en forma macroscópica examinando sólo una pieza inerte sobre una mesa de disección.

Nuestros resultados obtenidos en este modelo *in vivo*, podrían ser utilizados para la comparación con las concentraciones de NO_2^- de casos clínicos, con el fin de establecer el papel del NO en la fisiopatología de las distintas entidades clínicas, que afectan a las articulaciones diartrodiales de los equinos de distintas razas y disciplinas deportivas.

Recientemente la apoptosis de los condrocitos ha recibido mayor atención por su eventual participación en la patogénesis de la OA, ya que los condrocitos son las únicas células existentes en el cartílago articular y las encargadas de mantener el equilibrio entre la síntesis y la degradación de las moléculas, que componen la matriz extracelular del cartílago articular. Además, la presencia de NO y la observación de su efecto inductor de apoptosis en los condrocitos de cartílagos osteoartroticos, refuerza la idea de que en la patogenia de la OA equina es importante incorporar la cantidad y actividad de los condrocitos en el recambio de la matriz del cartílago.

La OA humana aumenta su incidencia con la edad, con cambios patológicos a nivel del cartílago articular que incluyen disminución de los condrocitos e incremento de lagunas vacías en el tejido. La apoptosis condrocitaria se considera como una de las principales causas de estos cambios patológicos edad-dependientes y está correlacionada con la incidencia de OA (Hashimoto *et al.*, 1998). La patogénesis de la apoptosis edad-dependiente no está completamente dilucidada.

Recientemente Chen *et al.* (2001) describieron que la apoptosis de los condrocitos se detectó en el cartílago articular dañado por impacto mecánico. Por esto es posible que el incremento de la apoptosis en la población humana de mayor edad, pueda resultar del continuo estrés mecánico sobre sus articulaciones durante su vida.

Como una extensión de la hipótesis anterior, en los equinos de carrera jóvenes sujetos a intenso entrenamiento, la OA se podría asociar con apoptosis condrocitaria causada por el estrés mecánico precoz e intenso.

Cabe recordar que en nuestro estudio se utilizaron equinos mestizos no destinados a uso deportivo, por lo que se observaron distribuciones de alteraciones articulares más similares a los encontrados en poblaciones humanas, es decir, con una mayor frecuencia de OA en edades maduras.

De acuerdo a los datos obtenidos en nuestro trabajo es posible establecer que, en los individuos de menor edad es más frecuente encontrar cartílagos articulares normales, pudiendo encontrarse la membrana sinovial tanto normal como alterada.

Diferente es el caso de los grupos de mayor edad en los que se encontró frecuentemente, alteración del cartílago con o sin alteración de la membrana sinovial.

Lo anterior se podría explicar porque los animales de mayor edad tienen un mayor tiempo de utilización de sus articulaciones, siendo dañadas por traumas de baja intensidad y repetitivos durante más tiempo, así como también una menor respuesta reparativa al daño articular, en comparación a los más jóvenes.

En relación a la concentración de proteína, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados, observándose una tendencia a la disminución en el grupo AA (10.8 ± 5.4 mg/mL) con respecto al grupo NN (15.2 ± 6.3 mg/mL), lo que se podría asociar a que en el grupo AA el daño crónico de la membrana sinovial alteraría la función de ultrafiltración del plasma. Además, el menor contenido de matriz extracelular y de condrocitos que se ha descrito en el cartílago en los procesos de OA, y el menor recambio molecular detectado a medida que aumenta la edad, constituirían factores que también podrían explicar el menor contenido proteico en el grupo AA.

La determinación de NO_2^- por el método de Griess, requirió una etapa de estandarización, puesto que no se ha descrito su realización previamente en el líquido sinovial.

Para ello se utilizó NaNO_2 0.1 mM como solución estándar para la curva de calibración, debido a que en las pruebas con concentraciones mayores a ésta, las concentraciones de NO_2^- de los líquidos sinoviales equinos quedaron por debajo del valor mínimo de la curva.

Además, fue necesario eliminar las proteínas del líquido sinovial que interfieren con la reacción colorimétrica de Griess, y para ello se optó por utilizar etanol p. a. como agente precipitante de proteínas en una dilución de 1:7; que resultó más sensible al medir la concentración de NO_2^- en comparación con otro agente precipitador, como es el acetonitrilo.

Se estableció en nuestro protocolo de trabajo, la utilización de una solución de sulfanilamida al 2% en HCl al 5% para preparar el reactivo de Griess, no encontrándose diferencia al preparar la solución de sulfanilamida al 2% en H_3PO_4 al 5%. En esta decisión se consideró el hecho que el HCl era de menor costo que el H_3PO_4 .

En relación a la estabilidad de NO_2^- , la incubación del líquido sinovial con distintas temperaturas demostró, a través de la reacción colorimétrica de Griess, un aumento del contenido de NO_2^- a los 50°C debido probablemente al efecto concentrador producido por la evaporación del agua del líquido sinovial con el aumento de la temperatura. Se consideró sobre la base de este resultado, efectuar los ensayos a temperatura ambiente.

Con respecto al tiempo de almacenamiento a -20°C de una mezcla de líquidos sinoviales provenientes de articulaciones normales (NN), esto se evaluó a intervalos de cuatro semanas, encontrándose que la concentración de NO_2^- al día uno sin congelar ($45.1 \pm 6.43 \mu\text{M}$) fue más alta que la de la semana 4 ($14.6 \pm 0.42 \mu\text{M}$) y de la semana 8 ($18.3 \pm 3.65 \mu\text{M}$), siendo estas últimas semejantes entre ellas.

Esto sugiere, que existe la posibilidad de que parte del NO_2^- , a través del tiempo y/o con los procesos de congelación y descongelación, pueda reaccionar con algún componente del líquido sinovial como grupos sulfidrilos o con oxígeno ambiental, transformándose en algún compuesto no detectable en la reacción colorimétrica de Griess, como por ejemplo, NO_3^- .

Por esta razón, en nuestro estudio las muestras se mantuvieron congeladas entre 24 a 48 horas, para realizar las determinaciones de NO_2^- .

Con respecto a la medición de NO_2^- de articulaciones metacarpofalángicas normales y alteradas macroscópicamente, cabe recordar que la concentración de NO_2^- del líquido sinovial como producto final estable de la síntesis de NO, depende especialmente de la actividad de la iNOS de los condrocitos que es inducida por citoquinas proinflamatorias. Este hecho explicaría la distribución de su concentración en los distintos grupos de articulaciones.

Por los datos obtenidos, se puede concluir que las articulaciones metacarpofalángicas equinas presentan niveles detectables de NO_2^- en su líquido sinovial, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos analizados.

Así, se puede señalar que las articulaciones con cartílago y membrana normales (NN) presentaron un promedio de concentración detectable de NO_2^- “basal” ($29.4 \pm 27.9 \mu\text{M}$), mientras que en las articulaciones con cartílago normal y membrana sinovial alterada (NA), se observó un promedio mayor ($44.4 \pm 27.9 \mu\text{M}$), pero no significativo en la concentración de NO_2^- , lo que se podría explicar debido a que la alteración de la membrana se asocia con el aumento de citoquinas en el medio intraarticular, las que estimularían en los condrocitos la inducción de la iNOS para la producción de NO.

Además, en las articulaciones con alteración de cartílago se encontraron concentraciones de NO_2^- en promedio bajas (AN: $32.7 \pm 27\mu\text{M}$), e incluso menores en el caso AA ($26.3 \pm 26.1\mu\text{M}$), aunque no significativas, a los detectados en las articulaciones NN, ya que posiblemente la pérdida de cartílago y los procesos de apoptosis podrían implicar una disminución de los condrocitos responsables de la producción de NO intraarticular, dado que la principal fuente de NO sería el propio condrocito.

Cabe indicar la gran dispersión reflejada en las altas desviaciones estándares obtenidas en todos los grupos, las que no pueden ser atribuidas a la metodología de laboratorio, ya que cada una de las muestras fue analizada por triplicado, no observándose tales diferencias a este nivel.

La dispersión observada se podría asociar a que en este modelo *in vivo*, clasificado macroscópicamente, no se dispone de antecedentes clínicos que pudiesen indicar si la alteración articular se encuentra ya sea en una fase aguda, o en remisión. Además, los animales de matadero, pueden estar sujetos a distintos niveles de trauma articular como consecuencia del transporte y del proceso del beneficio en sí.

Con lo anterior es posible sugerir para futuros modelos experimentales *in vivo*, con el fin de controlar la dispersión de los resultados, utilizar equinos con historia clínica conocida, con lo que seguramente se obtendrían diferencias más claras entre grupos.

Estos resultados a pesar de no ser significativos se comportan similar a los encontrados por Rechenberg *et al.*, (2000) en cultivos de explantes de membrana sinovial y cartílago articular normales y osteoartríticos moderados y severos de equinos.

De este modo, se puede señalar que los resultados de este estudio, se asemejan aunque no significativamente con lo descrito en las investigaciones realizadas *in vitro*, hasta ahora escasas en la especie equina, sugiriendo un comportamiento similar, pero mucho más disperso del NO *in vivo*, de acuerdo al compromiso articular.

Debido a los antecedentes y resultados descritos, la medición de la concentración de NO_2^- del líquido sinovial de la articulación equina podría servir como una forma de evaluar *in vivo* el compromiso del cartílago articular y de su respuesta a las terapias utilizadas sólo si se pudiera determinar previamente su concentración en las distintas entidades patológicas considerando el grado y curso de ellas. De esta forma, altos niveles de NO_2^- en el líquido articular podrían ser indicativos de una mayor integridad y función del cartílago articular, debido a sus condrocitos funcionales, mientras que bajos niveles en los procesos crónicos indicarían erosión del cartílago articular y pérdida funcional de condrocitos.

CONCLUSIONES

ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA:

Se estableció una curva de calibración entre 0.9 μ moles a 10 μ moles de NaNO_2 0.1mM.

Se estableció la precipitación de proteínas del líquido sinovial en una dilución 1:7 con etanol absoluto.

Para realizar la reacción colorimétrica de Griess se utilizó la sulfanilamida al 5% en HCl al 2%.

Debido a la inestabilidad del NO_2^- , se realizó su determinación a temperatura ambiente luego de 24 a 48 horas de obtenidas y congeladas las muestras de líquido sinovial.

DETERMINACIONES EXPERIMENTALES:

Las articulaciones sin alteración macroscópica de cartílago (NN y NA) se encontraron en los animales más jóvenes, mientras que aquellas con daño del cartílago correspondieron generalmente a equinos de mayor edad (AN y AA).

La concentración de proteínas del líquido sinovial no mostró diferencias significativas entre los grupos, observándose sólo una tendencia a disminuir en el grupo de con mayor alteración articular.

La concentración de NO_2^- no mostró diferencias significativas entre los grupos, encontrándose una tendencia a aumentar en los grupos NA y AN, lo que indicaría una mayor capacidad de respuesta en las etapas iniciales e intermedias del proceso inflamatorio.

BIBLIOGRAFÍA

- **BLANCO, F. J.; OCHS, R. L.; SCHWARZ, H.; LOTZ, M.** 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.*146:75-85.
- **BLANCO, F. J.; GUITIAN, R.; VAZQUEZ-MARTUL, E.; TORO, F.; GALDO, F.** 1998. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. *Arthr. Rheum.* 41:284-289.
- **BREDT, D. S.; HWANG, S. H.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H.** 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-420 reductase. *Nature.* 351:714-718.
- **CANTLEY, C. E. L.; FIRTH, E. C.; DELAHUNT, J. W.; PFIEFFER, D. W.; THOMPSON, K. G.** 1999. Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses. *Equine vet. J.* 31:73-80.
- **CHEN, C. T.; BURTON-WURSTER, N.; BORDEN, C.; HUEFFER, K.; BLOOM, S. E.; LUST, G.** 2001. Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *J. Orthop. Res.*19:703-711.
- **CLANCY, R. M.; AMIN, A. R.; ABRAMSON S. B.** 1998. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthr. Rheum.* 41:1141-1151.
- **FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R.; PALMER, R. M.; MONCADA, S.** 1992. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 51:1219-1222.
- **FREAN, S. P.; BRYANT, C. E.; FROELING, I. L.; ELLIOT, J.; LEES, P.** 1997. Nitric oxide production by equine articular cells *in vitro*. *Equine vet. J.* 29:98-102.
- **FURCHGOTT, R. F.; ZAWADSKI, J. V.** 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:273-276.
- **GOLDRING, M. B.** 2000. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthr. Rheum.* 43 (9): 1916-1926.

- **GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R.** 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*126:131-138.
- **HASHIMOTO, S.; TAKAHASHI, K.; AMIEL, D.; COUTTS, R.; LOTZ, M.** 1998. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthr. Rheum.* 41:1266-1274.
- **HILLIQUIN, P.; BORDERIE, D.; HERNVANN, A.; MENKES, C.; EKINDJIAN, O.** 1997. Nitric oxide stimulates tumor necrosis factor production by synoviocytes in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cart.* 5:43.
- **HOF, R. J. van; HOCKING, L.; WRIGHT, P. K.; RALSTON, S. H.** 2000. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology* 39:1004-1008.
- **IGNARRO, L. J.; FUKUTO, J. M.; GRISCAVAGE, J. M.; ROGERS, N. E.; BYRNS, R. E.** 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with Enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8103-8107.
- **JANG, D; MURRELL G. A. C.**1998. Nitric oxide in arthritis. *Free Radical Biol. and Med.* 24. (9):1511-1519.
- **KAMMERMANN, J. R.; KINCAID, S. A.; RUMPH, P. F.; BAIRD, D. K.; VISCO, D. M.** 1996. Tumor necrosis factor - α (TNF- α) in canine osteoarthritis: immunolocalization of TNF- α , stromelysin and TNF receptors in canine osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cart.* 4: 23-34.
- **KIM, D. Y.; TAYLOR H. W.; MOORE, R. M.; PAULSEN, D. B.; CHO, D. Y.** 2003. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. *The Vet. J.* 166:52-57.
- **KOSHLAND, D. E.** 1992. The molecule of the year. *Science.* 258:1861.
- **LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHEL, T.** 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6348-6352.
- **LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.** 1951.

Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

- **McILWRAITH, C. W.** 1982. Current concepts in equine degenerative joint disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180:1246-1248.
- **McILWRAITH, C. W.** 1996. General pathobiology of the joint and response to injury. In: *Joint disease in the Horse*. Eds. C. McIlwraith and M. Trotter, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, USA. pp. 40-69.
- **MONCADA, S; HIGGS, A.** 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England J. Med.* 329:2002-2012.
- **MOROZ, L. L.; PARK, J. H.; WINLOW, W.** 1993. Nitric oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroreport.* 4:643-646.
- **NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B.** 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3:65-70.
- **PELLETIER, J.-R.; JOVANOVIC, D. V.; LASCAU-COMAN, V.; FERNANDES, J. C.; MANNING, P. T.; CONNOR, J. R.** 2000. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo. Possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase-3 level. *Arthr. Rheum.* 43: 1290-1299.
- **PLATT, D.** 1996. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In: *Joint disease in the Horse*. Eds. C. McIlwraith and M. Trotter, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, USA. pp. 29-39.
- **RECHENBERG, B. V.; McILWRAITH, C. W.; AKENS, M. K.; AUER, J. A.** 1997. Spontaneous production of nitric oxide and prostaglandin in media of explant cultures of equine synovial membranes and articular cartilage. *Vet. Surg.* 26:258.
- **RECHENBERG, B. V.; McILWRAITH, C. W.; AKENS, M. K.; FRISBIE, D. D.; LEUTENEGGER, C.; AUER, J. A.** 2000. Spontaneous production of nitric oxide, prostaglandin and neutral metalloproteinases in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Equine Vet. J.* 32(2): 140-150.

- **RICHARDSON, J.** 1997. Ageing horses, an illustrated guide. *Equine Pract.* Oct. 486-489.
- **SCHULZ, R.; NAVA, E.; MONCADA, S.** 1992. Induction and potential biological relevance of a Ca (2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *British J. Pharmacol.* 105:575-580.
- **STADLER, J.; STEFANOVIC-RACIC, M.; BILLIAR, T. R.; CURRAN, R. D.; MCINTYRE, I. A.; GEORGESCU, H. L.; EVANS, C. H.** 1991. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 147:3915-3920.
- **TODHUNTER, R. J.; LUST, G.** 1992. Synovial joint anatomy, biology and pathobiology. In: Auer, J. A. (ed.), *Equine Surgery*. W. B. Saunders Company Ltd., Philadelphia, PA, USA. pp. 844-866.
- **TUNG, J. T.; VENTA, P. J.; CARON, J. P.** 2002. Inducible nitric oxide expression in equine articular chondrocytes: effects of antiinflammatory compounds. *Osteoarthritis Cart.* 10: 5-12.
- **WARD, S. M.; XUE, C.; SHUTTLEWORTH, C. W.; BRETT, D. S.; SNYDER, S. H.; SANDERS, K. M.** 1992. NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *Am. J. Physiol.* 263:G277-G284.
- **XIE, Q. W.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J.; MUNFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. F.** 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228.